



UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA

COORDINACIÓN GENERAL ACADÉMICA

Coordinación de Bibliotecas

Biblioteca Digital

La presente tesis es publicada a texto completo en virtud de que el autor ha dado su autorización por escrito para la incorporación del documento a la Biblioteca Digital y al Repositorio Institucional de la Universidad de Guadalajara, esto sin sufrir menoscabo sobre sus derechos como autor de la obra y los usos que posteriormente quiera darle a la misma.

Universidad de Guadalajara

Centro Universitario de ciencias de la salud



“Efecto antiparasitario de extractos de *Agave maximiliana* y *Agave angustifolia* sobre *Giardia lamblia* y su mecanismo de acción”.

Tesis de la Maestría en Microbiología Médica que presenta:

Carlos Andrés Contreras Salazar

Director de tesis:

Dra. Araceli Castillo Romero

Codirector de tesis:

Dr. Armando Pérez Rangel

Guadalajara, Jal., de junio de 2023

Universidad de Guadalajara

Centro Universitario de ciencias de la salud



“Efecto antiparasitario de extractos de *Agave maximiliana* y *Agave angustifolia* sobre *Giardia lamblia* y su mecanismo de acción”.

Tesis de la Maestría en Microbiología Médica que presenta:

Carlos Andrés Contreras Salazar

Asesor

Dr. Rafael Cortés Zárate

Sinodales

Dra. Claudia Lisette Charles Niño

Dr. Leopoldo Portillo Gómez

Guadalajara, Jal., de junio de 2023

Dedicatoria

Este trabajo es para toda mi familia, mis hermanas Andrea, Michel, mi hermano Pablo y mis padres Andrés y Olga, mis hermanos de otra familia Spencer, Isra, Nene y Efrén, a mis tías, principalmente mi tía Lety, mi abuelita Carmen, y mi abuelito que en paz descanse Refugio ya que ellos me inspiraron a seguir estudiando y ser mejor cada día.

También a la Dra. Rosy y el Dr. Armando quienes me han inspirado a querer ser Doctor.

A Isra y Efrén que hemos estado en este camino juntos.

Agradecimientos

Principalmente a mí, ya que no me rendí a pesar del momento tan difícil que pase y que aun después de todo sigo queriendo más y más.

Agradezco a mi familia por su apoyo incondicional y amor:

A mi hermano Godpevlo por brindarme tiempo a diario para jugar videojuegos, platicar y acompañarme en mis tratamientos.

A mi Madre y Padre por su apoyo durante el tratamiento y mi maestría. Por escucharme aconsejarme y no perder la fe en mí cuando yo sí lo hice.

A mis hermanas Andrea y Michel por escucharme y hablar cuando lo necesitaba.

A mi ex novia Bris que ya no está conmigo, pero siempre me apoyó, escuchó, cuidó, aconsejó, tengo tanto que agradecerle.

A mi tía Lety y mi abuelita madre, gracias por apoyarme y por mostrarme que, aunque me vaya mi familia siempre estará conmigo.

A mis compañeros de laboratorio Martin, Daniel, Panchito, por enseñarme técnicas que no sabía, ser pacientes y apoyarme tanto.

A mis compañeros de maestría Jorge en especial, mis grandes amigas Jennifer, Carolina y Karen y mi amigo Ernesto, no pude haber pedido una generación mejor.

También a mi compañera Janneth, Ana, a Mirian, a Victoria y aunque no lo trate tanto a Mauro.

A la Dra. Araceli, que a pesar de todo no se rindió conmigo, agradezco su paciencia y su apoyo.

A los Dres. Armando y Rosy, fueron mis asesores en licenciatura y puedo decir que ahora son parte de mi familia.

A mi familia escogida, es decir, mis amigos que más que amigos son hermanos Spencer, Israel, Efrén, Nene, gracias por apoyarme en esas salidas, agradezco que a pesar de los años sigan siendo mis mejores amigos.

Índice

Introducción.....	6
Marco teórico.....	10
<i>Giardia lamblia</i>	10
Ciclo de vida.....	10
Tratamiento.....	17
Agave.....	21
Hipótesis.....	28
Objetivo general.....	28
Material y métodos.....	29
Diseño experimental.....	29
Extractos etanólicos liofilizados de especies de Agave.....	29
Cultivo y mantenimiento de trofozoítos de <i>Giardia lamblia</i>	29
Determinación del efecto de los extractos de <i>Agave angustifolia</i> y <i>Agave maximiliana</i> en el crecimiento de los trofozoítos de <i>Giardia lamblia</i>	30
Determinación del efecto de los extractos de <i>Agave angustifolia</i> y <i>Agave maximiliana</i> en la adhesión de los trofozoítos de <i>Giardia lamblia</i>	30
Determinación del efecto de los extractos de <i>Agave angustifolia</i> y <i>Agave maximiliana</i> en la viabilidad de los trofozoítos de <i>Giardia lamblia</i>	31
Análisis estadístico.....	32
Resultados.....	33
Discusión.....	42
Anexos.....	44
Bibliografía.....	47

Resumen

La giardiasis es una enfermedad parasitaria intestinal provocada por el protozoario *Giardia lamblia*. Anualmente se reportan 280 millones de casos en el mundo. En lo que va del 2023, México reportó 477 casos nuevos de giardiasis. El tratamiento consiste en fármacos derivados de la molécula 5-nitroimidazol, principalmente el Metronidazol. Sin embargo, los efectos adversos asociados a los tratamientos farmacológicos y la aparición de cepas resistentes han provocado un aumento de fracasos terapéuticos, que han propiciado la búsqueda de nuevas alternativas terapéuticas. Actualmente, la medicina tradicional representa una alternativa importante de tratamiento para diferentes enfermedades. En este proyecto evaluamos el efecto antiparasitario de extractos etanólicos de las hojas de *Agave maximiliana* y *Agave angustifolia*. Se obtuvo una curva de crecimiento en presencia de DMSO, 0, 100, 300 y 600 µg/ml de cada extracto, empezando por *A. angustifolia* los resultados obtenidos muestran una marcada disminución en la proliferación del parásito, de manera similar con *A. maximiliana*, sin embargo, este último mostró una tendencia a perder dicho efecto. Posteriormente fueron tomadas microscopias de barrido donde ninguno de los extractos mostró que provocaran daños grotescos en las células, por lo que se procedió a evaluar la capacidad de adhesión y su viabilidad, donde se encontró que ambos extractos afectaban negativamente dichas características, lo cual, en conjunto al no haber daños en la morfología, pero si una reducción en su número nos hizo teorizar que el efecto puede ser durante la duplicación del parásito. Finalmente, se evaluó la capacidad de enquistamiento para descartar que al afectar su adhesión pudieran influir en generar una mayor infectividad, ambos extractos resultaron adecuados ya que redujeron el número de células enquistadas.

Palabras clave: *Giardia lamblia*, *Agave*, *maximiliana*, *angustifolia*, Metronidazol, citocinesis

Abstract

Giardiasis is a parasitic intestinal disease caused by the protozoan *Giardia lamblia* (*G. lamblia*). Annually 280 million cases are reported in the world; in 2023 in Mexico 477 cases have been reported. The treatment consists of drugs derived from the 5-nitroimidazol molecule, mainly Metronidazole. However, the adverse effects associated with pharmacological treatments and the appearance of resistant strains have led to an increase in therapeutic failures, which have led to the search for new therapeutic alternatives. The study of traditional medicine is booming and seeks different applications or alternatives in medicine for native plant species from various regions. This project seeks to evaluate a possible antiparasitic effect of agave leaves: *Agave maximiliana* and *Agave angustifolia* were made ethanolic extracts of the leaves. Cultures were performed using TYI -S-33 growth medium, cell counting was performed in Neubauer chamber. The trophozoites were contacted with each extract at concentrations of 0, 100, 300 and 600 µg/ml, of each extract, starting with *A. angustifolia* the results obtained show a marked decrease in the proliferation of the parasite, similarly with *A. maximiliana*, however, the latter must have a tendency to lose this effect. Subsequently scanning microscopes were taken where none of the extracts showed that they caused grotesque damage to the cells, so we proceeded to evaluate the adhesion capacity and its viability, where both extracts were found to negatively affect these characteristics, which, taken together with no damage to the morphology, but if a reduction in their number made us theorize that the effect may be during duplication of the parasite. Finally, the ability to encyst was evaluated to rule out that affecting its adhesion could influence the generation of greater infectivity, both extracts were suitable as they reduced the number of cystic cells.

Keywords: *Giardia lamblia*, *Agave*, *maximiliana*, *angustifolia*, Metronidazole, cytokinesis

Introducción

La organización Mundial de la salud (WHO, por sus siglas en inglés) ha definido a la giardiasis, como una enfermedad provocada por el protozoo *Giardia lamblia*, como un problema de salud global, estableciendo alertas para los viajeros. El parásito se transmite habitualmente por vía fecal-oral. Afecta principalmente a la población infantil y es especialmente común en zonas con condiciones de saneamiento deficiente e instalaciones de tratamiento de agua limitadas. La prevalencia de la giardiasis suele oscilar entre el 20% y 30% en los países emergentes y entre el 3% y 7% en los países desarrollados ⁽⁵⁷⁾.

En Latino América, Asia y África se han reportado millones de infecciones sintomáticas, se estiman 183 millones de casos de giardiasis. A nivel nacional, en lo que va del año 2023 se han reportado 477 casos nuevos, de los cuales, 18 corresponden al estado de Jalisco ⁽³⁴⁾.

Hoy en día se conocen diferentes medicamentos que son clínicamente efectivos para erradicar esta afección, los más comunes son derivados de la molécula 5-nitroimidazol como metronidazol, tinidazol y nitaxozanida, todos ellos muestran eficacias variables y están relacionados con diversos efectos secundarios, como cefalea, náuseas, sabor metálico, entre otros. Actualmente se tienen reportes sobre la prevalencia de la resistencia adquirida entre los anaerobios que ha permanecido en general baja. Sin embargo, con *Giardia* ya se ha reportado resistencia a metronidazol y a otros 5-nitroimidazoles ⁽⁵⁵⁾. Fernandez A. y col, reportaron que actualmente el 38% de pacientes tratados con metronidazol presentan fallo del tratamiento dando como consecuencia una recaída⁽²⁹⁾. Otros estudios han reportado un pequeño aumento desde el descubrimiento de los 5-nitroimidazoles, correspondiente a (<3%) en la mayor parte del mundo, en España (4.8%), Sudáfrica (8.7%) y Pakistán (16%)⁽³⁾. Un medicamento alternativo a metronidazol es el tinidazol, sin embargo, cuando el uso de algún nitroimidazol es contraindicado, los médicos recetan paromomicina, nitazoxanida o los benzimidazoles antihelmínticos. Aunque las opciones son limitadas, existen terapias alternativas como algunos antibióticos y actualmente la medicina tradicional ⁽⁷⁷⁾.

Recientemente, el estudio con plantas medicinales se ha intensificado, reportándose efectos antimicrobianos contra bacterias, hongos y parásitos. El uso del género *Agave* en México data de más de 10 mil años, su uso principal ha sido como fuente de bebidas alcohólicas y medicinales, estas últimas en la mayoría de los casos, sin sustento científico. Si bien, el uso del agave representa un impacto económico positivo, al desecharse más del 60% de la planta su impacto ambiental es severo. El uso de extractos obtenidos de pencas de agave representa una alternativa biológica y amigable al medio ambiente. En el estado de Jalisco se ha reportado la existencia de 28 tipos de *Agave*, pero solo 5 son esenciales en la producción de tequila y aguamiel. Entre algunas de las especies reconocidas por su potencial antimicrobiano podemos mencionar a *Agave fructans*, que a concentración de 10% inhibe el crecimiento de *Salmonella Typhimurium* ⁽⁵⁹⁾. Otras, como, *A. picta*, *A. lecheguilla*, *A. scabra* y *A. lophanta* demostraron tener un efecto antifúngico ⁽⁸²⁾. En 2010 Domingues-Ferreira y colaboradores reportaron que *A. sisalana* muestra actividad antihelmíntica frente a *Haemonchus contortus*, *Oesophagostomum columbianum* y *Trichostrongylus colubriformis*; ya que redujo la proliferación de los nemátodos adultos. En 2007 Orestes-Guerra y colaboradores reportaron que las saponinas extraídas de *Agave brittoniana* (Agavaceae) a concentraciones de 10, 100 y 500 µg/mL tenían la misma eficiencia que MTZ 2 µg/mL eliminando al parásito *Trichomona vaginalis*. En *Entamoeba histolytica*, Quintanilla y colaboradores (2014) reportaron que *Agave lechuguilla* ejerce un efecto antiamebiano reduciendo su población en un 69.7% ^(66, 74).

Hasta el momento no hay estudios sobre la actividad de *Agave* en *Giardia lamblia*, por lo que en este trabajo se evaluó la actividad anti^{giardiásica} de *A. maximiliana* y *A. angustifolia*, las cuales junto con *A. tequilana* son de las más abundantes en el estado y se comparó su eficacia con un medicamento clínicamente efectivo: Metronidazol.

Marco teórico

Giardia lamblia

Giardia lamblia es un protozoo binucleado que habita el intestino delgado superior de sus huéspedes vertebrados, es causante de diversas enfermedades diarreicas en todo el mundo. En 1681 el científico Van Leeuwenhoek describió a este organismo, por primera vez, en sus heces diarreicas. En el año 1859 el médico Vilem Lamb describió con mayor detalle a este organismo, sin embargo, erróneamente creyó que pertenecía al género *Cercomonas* y decidió llamarlo *Cercomonas intestinalis*. Fue hasta 1883, que Kunstler mientras investigaba renacuajos encontró un organismo que llamó *Giardia*. Y en 1888, el investigador Blanchard sugirió el nombre de *Lamblia intestinalis*, sin embargo, el científico Stiles lo cambió a *G. duodenalis* en 1902. Posteriormente, Kofoed y Christiansen propusieron el nombre de *G. lamblia* en 1915 ⁽²⁾.

Giardia lamblia es el organismo eucariota más primitivo conocido en la escala evolutiva entre los procariotas y eucariotas. La forma vegetativa del parásito carece de organelos típicos de células eucariotas tales como mitocondrias, peroxisomas, retículo endoplasmático y aparato de Golgi. Presenta, rRNA y enzimas metabólicas bacterianas que son características exclusivas de organismos procariotas ⁽⁸³⁾.

Ciclo de vida

Giardia cuenta con dos etapas en su ciclo de vida, conocidas como quiste (forma inactiva e infectiva) y trofozoíto (forma vegetativa). La infección inicia cuando el huésped ingiere agua o alimentos contaminados con quistes, seguido por el desenquistamiento y colonización del intestino delgado por trofozoítos, principalmente en el centro del yeyuno. Los trofozoítos son arrastrados por el bolo alimenticio y los movimientos peristálticos a la parte inferior del intestino delgado iniciando así el proceso de enquistamiento, usualmente, *in vitro* este proceso se replica sometiendo a los trofozoítos a un medio con pH de 7.8 y concentraciones

elevadas de sales biliares. Una vez enquistados, son expulsados de su huésped a través de las heces y continúa el ciclo ^(83, 84).

Trofozoíto

Los trofozoítos tienen forma de pera miden de 12 a 15 μm de largo y 5 a 9 μm de ancho. En el citoplasma se localizan vacuolas lisosomales, así como gránulos ribosomales y glucogénicos. Tiene dos núcleos que se duplican a la vez y ambos son transcripcionalmente activos, ambos tienen las mismas cantidades de material genético: ADN y ARN ribosomal y la misma cantidad de genes y de cromosomas⁽²⁾. Cuenta con un citoesqueleto formado por estructuras microtubulares conocidas como disco ventral, flagelos, y funis (Fig. 1); cruciales en la división y diferenciación celular. Se conoce que estas estructuras están relacionadas directamente con la adhesión a células del huésped, así que se teoriza que están directamente implicados en la patogénesis de la infección ⁽³²⁾.

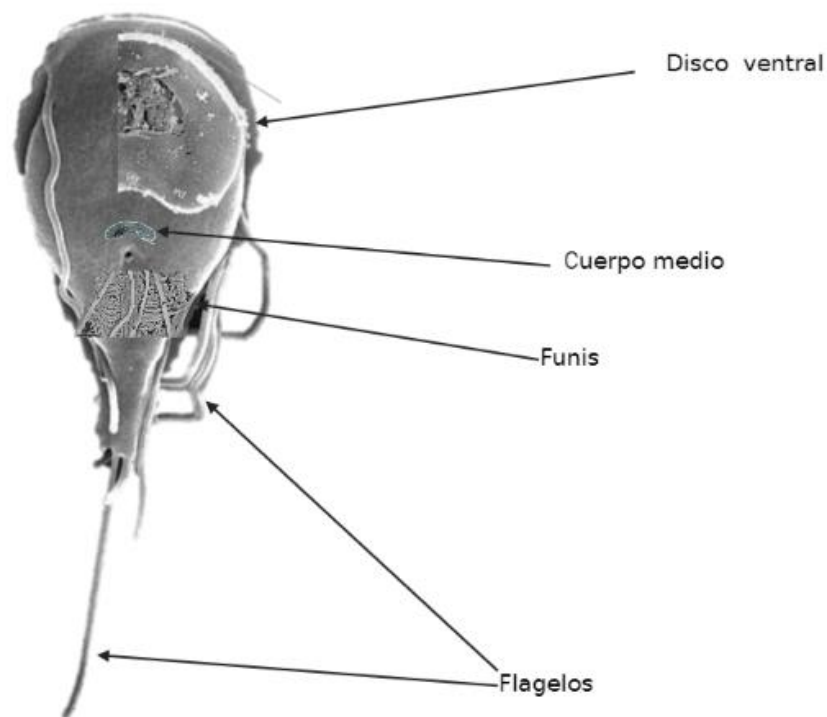


Fig. 1.- Trofozoíto de *Giardia lamblia* (Imagen modificada de Benchimol y col. 2017) ⁽³²⁾.

Citoesqueleto

Giardia tiene un citoesqueleto constituido por un conjunto de proteínas, las cuales forman estructuras como: el cuerpo medio, cuatro pares de flagelos (anterior, posterior, caudal y ventral) y un componente conocido como disco ventral, que se define como una estructura cóncava con una profundidad máxima de 0.4 μm que se encuentra en la parte ventral del parásito⁽²⁾.

Cuerpo medio

Es una estructura que presenta diferencias en su conformación, lo cual permite ser utilizado como herramienta para la clasificación entre especies. *G. lamblia* presenta 2 cuerpos medios formados por 2 orgánulos cilíndricos. Se localizan en la línea media del citoesqueleto, perpendicular al funis. Se sugiere que participa como reservorio de proteínas del disco ventral y los flagelos de células hijas ⁽³²⁾.

Flagelos

Los trofozoítos presentan 4 pares de flagelos, denominados anterolaterales, postero-laterales- ventrales y caudales que emergen con sus respectivos cuerpos basales. El parásito cuenta con 8 cuerpos basales conocidos como cinetosomas flagelares, que son el punto de nucleación de los axonemas, localizados en la zona anterior de la célula en medio de los dos núcleos. Los flagelos son importantes para la motilidad del parásito y su capacidad de adhesión ⁽³²⁾.

Disco ventral

Es una estructura de gran tamaño que participa en la adhesión de los trofozoítos a la superficie de los enterocitos del epitelio o a superficies inertes. Está conformado por proteínas contráctiles, actina, miosina y tropomiosina, las cuales facilitan la contracción del disco, y un grupo de proteínas que no se han encontrado en otros parásitos, denominadas giardinas⁽⁶⁹⁾. Los microtúbulos del disco ventral, así como los de los flagelos se componen de α y β -tubulina. La adherencia de los trofozoítos

a las microvellosidades es crucial para la supervivencia del parásito; evitan el arrastre de los trofozoítos más allá del yeyuno y le permite obtener la mayor parte de sus nutrientes. ⁽²⁾.

Giardinas

Las giardinas se identificaron por primera vez como un par de proteínas con un peso aproximado de 30 kDa, sin embargo, recientemente se han definido como un grupo de proteínas citoesqueléticas de 29-38 kDa (α -giardina, β -giardina, γ -giardina y δ -giardina), que son específicas del disco ventral y los flagelos ⁽⁴⁾. Los filamentos de la proteína tienen una estructura en forma de varilla que es consistente con las estructuras helicoidales de α - y β -giardina ⁽⁶⁹⁾.

Tubulina

Es una proteína globular organizada en heterodímeros formados por dos monómeros: α - tubulina y β -tubulina, es un componente fundamental de los microtúbulos en eucariontes. Cada monómero tiene un peso molecular de 55 kDa y unos 500 aminoácidos. Cada uno de ellos lleva ligado un GTP, aunque el de la tubulina β se hidroliza a GDP al incorporarse al microtúbulo. Las tubulinas son muy semejantes en todas las especies animales, los microtúbulos son unos de los componentes celulares que menos han evolucionado ⁽²⁵⁾.

Ciclo celular de *G. lamblia*

En *Giardia* el ciclo consiste en una secuencia de eventos ordenada y regulada que tiene la finalidad de producir dos células hijas. Este ciclo consta de dos fases principales; *Interfase la cual* se subdivide en las fases: **G1**: la célula se incrementa su volumen y sintetiza componentes para la síntesis de ADN, **S**: la célula replica su ADN y **G2**: la célula reproduce sus organelos y sigue creciendo en tamaño. Al finalizar la fase G2, la célula continúa con el proceso de mitosis, se subdivide en;

profase: se produce el montaje del huso mitótico, así como su unión al ADN condensado y replicado (cromátidas hermanas), metafase: los cromosomas se alinean entre los polos del huso, anafase: las cromátidas se separan sincrónicamente, y cada una migra hacia los polos, telofase, los dos conjuntos de cromosomas llegan a los polos del huso y se descondensan. Finalmente, ocurre una etapa conocida como: citocinesis en la que el citoplasma se divide en dos para dar origen dos células hijas (Fig. 2)⁽⁵¹⁾.

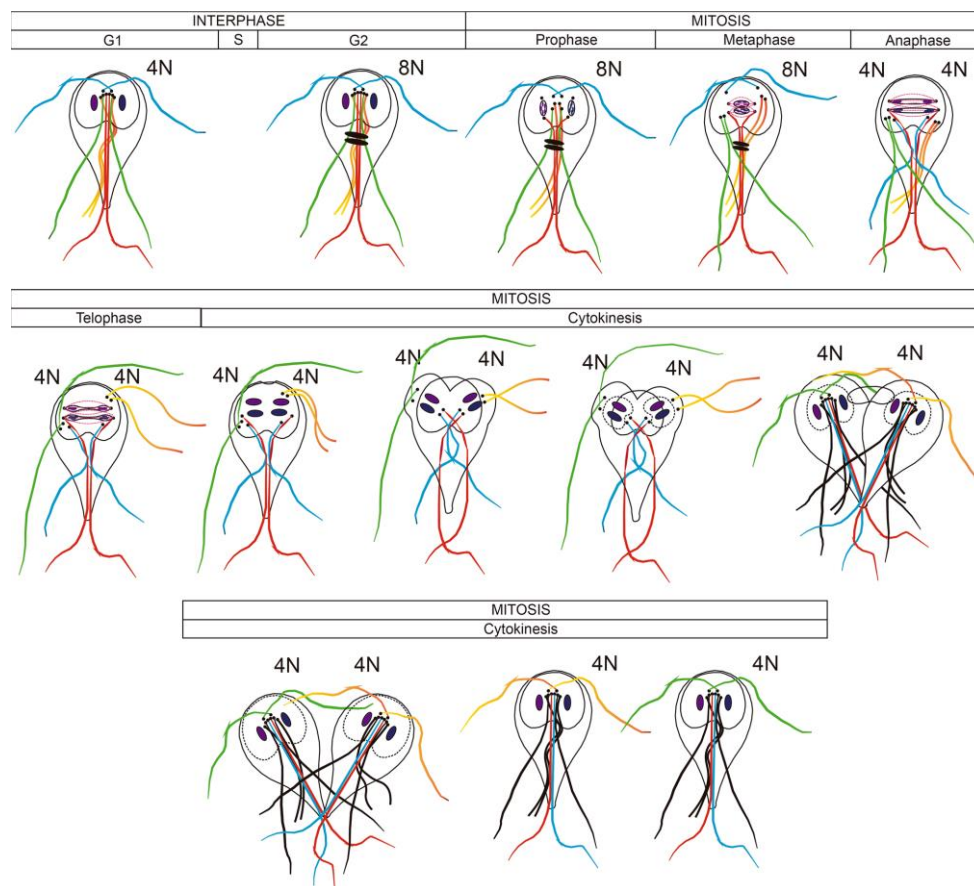


Fig. 2.- Ciclo celular de *G. lamblia* ⁽⁵¹⁾

Arresto celular

Al igual que muchas células eucariontes, *G. lamblia* puede sufrir diversos procesos por el efecto de diferentes drogas. Se ha reportado que nocodazol y afidicolina arrestan el ciclo celular del parásito en las fases G1 y G2 respectivamente ⁽⁷²⁾.

Además se ha reportado que dicho arresto celular provocado con afidicolina evita la duplicación y puede generar daño a nivel ADN ⁽⁴³⁾. Se ha reportado que para que haya un arresto celular se involucran la ciclina B así como la proteína tubulina, esenciales para que se lleve a cabo la mitosis ⁽⁴³⁾.

Quiste

La otra forma básica del parásito son los quistes, los cuales, se definen como una forma de protección/resistencia o infecciosa del parásito ante un cambio de pH, condiciones ambientales, temperatura, entre otros. Su tamaño es de 5-8 μm de ancho por 8-12 μm de longitud y están cubiertos por una pared de 0.3 a 0.5 μm de espesor la cual está compuesta por una capa filamentosa exterior y una capa membranosa interior con dos membranas. La pared del quiste es refráctil y su porción externa presenta una estructura fibrilar compuesta de 7 a 20 filamentos, que les permite ser resistentes al medio ambiente. En la parte exterior de la pared celular se ha identificado la N-acetilgalactosamina, carbohidrato mayoritario que ocupa el 90% de la composición; proveniente de la vía del metabolismo de la glucosa, donde la fructosa-6-fosfato se convierte en Glucosamina-6-fosfato por Glucosamina-6-fosfato-isomerasa⁽⁸³⁾. Cabe destacar que al momento del proceso de enquistamiento los núcleos se duplican a la par, dejando al quiste maduro con cuatro núcleos ⁽²⁾.

Enquistamiento

El enquistamiento se produce después de que los trofozoítos son expuestos a secreciones biliares. Las condiciones específicas para replicar este comportamiento *in vitro* son un pH más elevado (7.8) y sales biliares conjugadas más ácidos grasos⁽²⁴⁾. Sin embargo, se ha reportado la generación de quistes a un pH de 7.5. Se sabe que la proteína de la pared del quiste se expresa 90 minutos después de exponer al trofozoíto a un medio con suero deficiente de lipoproteínas. Es por esto que se ha determinado que existe una importante relación entre la adición y eliminación de sales biliares y ácidos grasos con el enquistamiento ⁽⁸³⁾.

Para su estudio, el proceso de enquistamiento se ha dividido en dos fases: temprana y tardía, las cuales tienen una duración de 10 y 16 h respectivamente. Al iniciar las condiciones de enquistamiento, dado que son cultivos asincrónicos, no todos los trofozoítos entran en dicha fase. La fase temprana consiste en la síntesis de nuevos antígenos; proteínas de la pared del quiste (CPW's, por sus siglas en inglés "Cyst Wall proteins") y GalNac, y la formación de nuevos orgánulos secretores (ESV's y ECV's, por sus siglas en inglés "Encystation Specific Vesicles" y "Encystation Carbohydrate Vesicles", respectivamente). La segunda etapa se inicia con la aparición de los primeros antígenos (en forma de racimos de aproximadamente 15 nm) en la superficie del prequiste. Una vez que se completa el enquistamiento, la motilidad desaparece, la parte exterior de la pared se vuelve ovalada y filamentosa, y los organismos ya no están adheridos a una superficie, desaparecen las ESV, y la porción interna incluye dos trofozoítos con cuatro núcleos que aún no han completado la citocinesis ⁽²⁴⁾.

Los datos reportados anteriormente sugieren que el enquistamiento se produce a través de un punto de restricción en la fase G2. Lo cual beneficia la eficiencia de enquistamiento si el cultivo se sincroniza⁽⁸⁵⁾.

Desenquistamiento

En el huésped mamífero, el desenquistamiento inicia con la exposición de los quistes al contenido del intestino delgado proximal después de pasar a través del ambiente del estómago el cual tiene un pH ácido de 1.3 a 2.7, *in vitro* este pH se ajusta a 4. La exposición a estas condiciones tiene una duración de 30 min. Una vez iniciado el desenquistamiento, parecen desarrollarse uno o dos pares de protrusiones citoplasmáticas en la parte ventral del quiste. A medida que el trofozoíto emergente se separa de la pared del quiste, el espacio peritrófico y el flanco preventral se agrandan. Los flagelos emergen de uno de los polos del quiste. El trofozoíto emergente cuenta con cuatro núcleos y cuatro pares de flagelos ya que la cariocinesis ocurre durante el enquistamiento. Después de 15 a 30 min del inicio de desenquistamiento el trofozoíto de forma oval se vuelve más redondo y da paso

a un proceso de citocinesis de modo que se forman dos trofozoítos a partir de un quiste ^(2, 11).

Giardiasis

La giardiasis es una enfermedad diarreica producida por el parásito zoonótico *Giardia lamblia* el cual es el agente etiológico más frecuentemente identificado en brotes asociados a la ingesta de agua contaminada. Para que se lleve a cabo una infección solo es necesaria la ingesta de 10 a 20 quistes. La infección puede cursar mayoritariamente de manera asintomática. Las manifestaciones clínicas más características de la enfermedad son esteatorrea y diarrea acuosa. La diarrea aguda es resultado de la adhesión de los trofozoítos a la parte superior del intestino delgado, lo que provoca la interrupción de la función de la barrera epitelial, acortamiento difuso de microvellosidades, malabsorción intestinal y mal digestión. Otras alteraciones son deshidratación, molestia abdominal y pérdida de peso. La giardiasis se considera aguda o crónica dependiendo de la duración, en niños puede producir un retraso del crecimiento y consecuencias a largo plazo ⁽²⁾.

Tratamiento

Hoy en día se conocen diferentes tratamientos farmacológicos efectivos contra la giardiasis como:

Metronidazol

Es un profármaco derivado de la molécula 5-nitroimidazol, se considera uno de los medicamentos de primera línea. En *G. lamblia*, las proteínas piruvato: ferredoxina oxidoreductasa y ferredoxina actúan juntas con el fin de metabolizarlo y que pueda ejercer su actividad biológica; la cual es generar un radical de anión nitro que causa daño oxidativo a varias macromoléculas celulares, especialmente ADN y proteínas, provocando una desestabilización como se muestra en la Fig. 3. Esto provoca alteraciones en la duplicación celular y por ende la muerte del parásito. Cabe

destacar que actualmente se han reportado, otras dos proteínas que actúan en la activación de MTZ: Nitroreductasa-1 (NR-1) y tiorredoxina reductasa. Algunos efectos secundarios reportados son náuseas, dolor abdominal y diarrea. La resistencia al metronidazol y otros 5-nitroimidazoles es relativamente fácil de inducir en el laboratorio al exponer a *Giardia* a dosis crecientes del fármaco⁽¹⁰⁾. Adicionalmente, ya se ha reportado un fallo terapéutico en un 15% de los casos de pacientes con giardiasis refractaria ^(40, 55, 58).

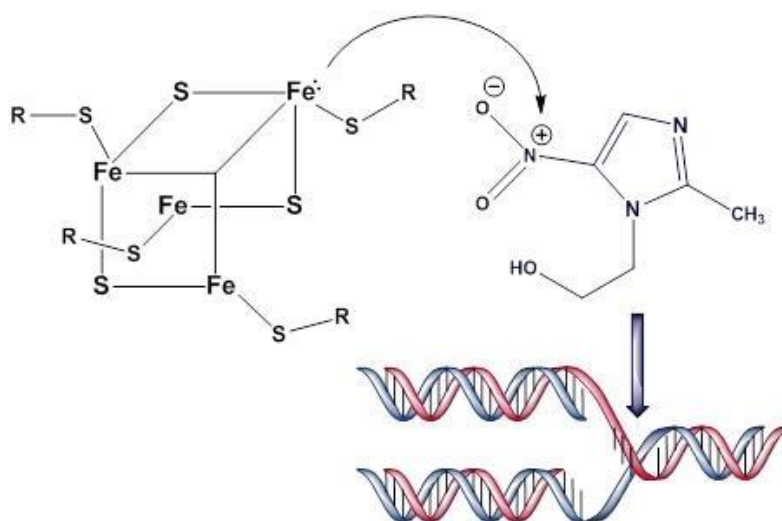


Figura. 3.— Actividad biológica del medicamento MTZ ⁽⁵⁸⁾.

Nitazoxanida

Es un medicamento antiparasitario, descubierto en la década de los 80's. Derivado del nitrotiazol. Su fórmula química es 2-acetiloxil-N-(5-nitro-2-tiazolil) benzamida (Fig. 4). Tanto nitazoxanida como metronidazol tienen un grupo Nitro en la posición 5 del anillo heterocíclico. La actividad antiparasitaria debe su efecto a la interferencia con la enzima dependiente de Ferredoxina Oxidorreductasa ⁽⁵⁸⁾ necesaria en el metabolismo energético anaeróbico de los parásitos. Fue aprobada por la FDA en 2014 para usarla como tratamiento de giardiasis en humanos. Ha demostrado ser efectiva contra *Trichomonas spp.*, *Entamoeba histolytica*, *Clostridium difficile*, *Clostridium perfringens*, *Helicobacter pylori*, y *Campylobacter jejuni*. Tiene una eficacia similar comparable al metronidazol, con menos efectos secundarios

principalmente dolor abdominal el cual se ha reportado solo en el 6.1 % de los casos y no se reportan ineficacias o fallas en el tratamiento ^(62, 75, 76).

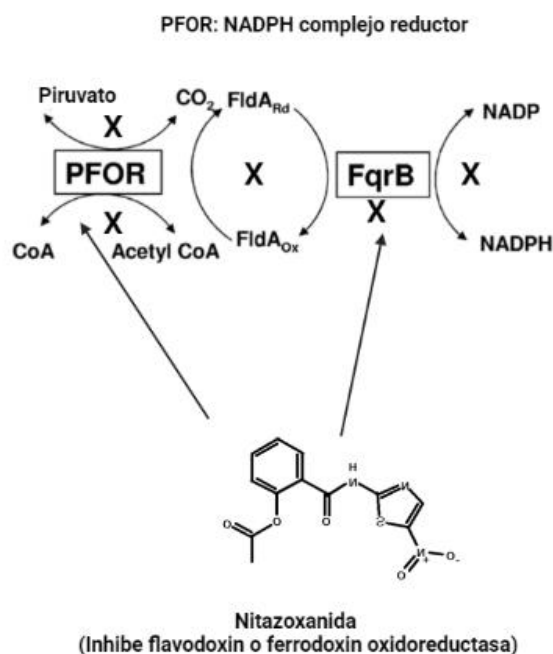


Figura. 4. – Mecanismo de acción de nitazoxanida, modificado ^(16, 81).

Tinidazol

Es un medicamento similar a metronidazol y activo contra bacterias anaeróbicas y parásitos. En 2005, en estados unidos, se aprobó su uso clínico por la FDA en el tratamiento de tricomoniasis, giardiasis y amebiasis. Al igual que otros 5-nitimidazoles, es un pro fármaco que debe ser metabolizado para convertirse en una forma citotóxica. Después de su ingreso a la célula objetivo es reducido en su grupo nitro por la enzima ferredoxina, generando radicales tóxicos que se unen al ADN, resultando en daño de material genético provocando que se pierda la estructura helicoidal e impidiendo la replicación (Fig. 5) ⁽³⁰⁾. Entre los efectos

adversos reportados para el Tinidazol están: gusto metálico, náuseas, dolores de cabeza, mareos, vértigo, irritabilidad, erupción, parestesia, flatulencias, convulsiones y, raramente, orina de color marrón rojizo o amarillenta, leucopenia, hepatitis, colangitis y anorexia ⁽²³⁾.

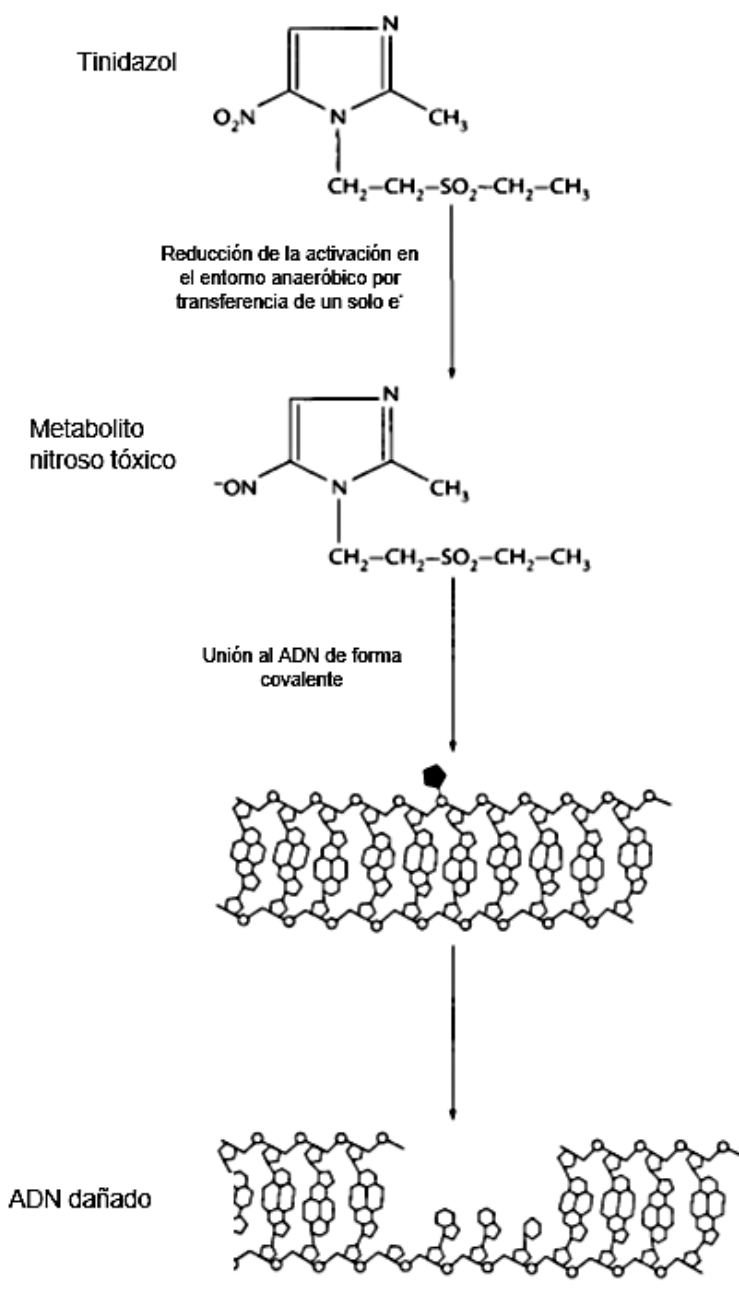


Fig.- 5.- Mecanismo de acción propuesto para tinidazol
(modificado de Fung H.B. 2005) ⁽³⁰⁾.

En la búsqueda de tratamientos alternativos que den respuesta a la resistencia microbianas, se han investigado diversos compuestos naturales, derivados de la medicina tradicional mexicana.

Agave

Los agaves conocidos en la cultura popular como “magueyes” pertenecen al orden *Aparagales*, dentro de la familia *Agavacea* son un grupo de plantas suculentas que proliferan en climas áridos o semiáridos. El género *Agave* incluye 210 especies, de las cuales 159 son endémicas de México ⁽⁶⁴⁾.

El agave es usado principalmente para la producción de bebidas alcohólicas destiladas o no destiladas, como Tequila, Mezcal, Bacanora, Raicilla y Pulque. La producción de tequila ha ido en aumento conforme pasan los años. En 2010 se produjeron 257.5 millones de litros, sin embargo, para 2019 hubo un aumento de 37%, es decir, 351.7 millones de litros ⁽⁷⁰⁾.

Durante la elaboración de tequila se genera una cantidad considerable de residuos que se catalogan como desechos y su aprovechamiento es limitado; las hojas de agave, que representan aproximadamente el 60% de la planta, se descartan como residuos ⁽¹⁷⁾. En estos residuos se han identificado diversas moléculas con actividad biológica como: alcaloides, saponinas, taninos, compuestos fenólicos y flavonoides. Estos componentes han mostrado actividad antimicrobiana, anti fúngica y antiparasitaria ^(21, 73, 82, 84).

Saponinas

Son glucósidos que incluyen un grupo diverso de compuestos caracterizados por su estructura que contiene una aglicona esteroide o triterpenoide y una o más cadenas de azúcar (Fig. 6). Tienen propiedades fisicoquímicas y biológicas, que se usan en aplicaciones tradicionales como jabones e industriales ⁽¹⁶⁾. Adicionalmente,

se ha reportado que estos compuestos tienen una actividad antiparasitaria al afectar la membrana celular de los organismos ⁽²²⁾.

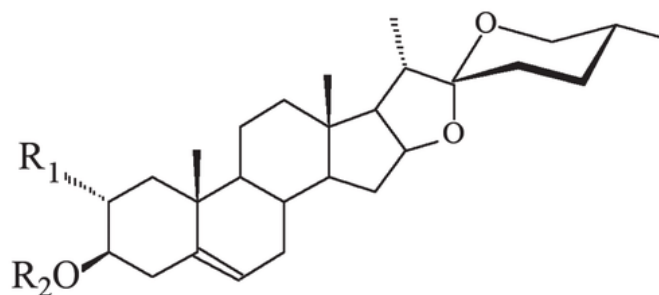


Fig. 6.- Estructura química de las saponinas (Imagen obtenida de Google.com)

Compuestos fenólicos

Los compuestos fenólicos son compuestos aromáticos naturales o artificiales, pueden ser de origen natural o artificial (algunas variedades son los alquifenoles, fenoles halogenados, nitrofenoles o más complejos como terpenos, flavonoides o alcaloides). Una gran parte de estos son tóxicos; se estudian sus efectos mutagénicos, cancerígenos y teratogénicos.

Alcaloides

Son un grupo de compuestos muy diverso que están relacionados solo por la presencia de un átomo de nitrógeno en un anillo heterocíclico (Fig. 7). Se estima que las plantas producen aproximadamente 12,000 alcaloides diferentes los cuales pueden organizarse en grupos de acuerdo con sus estructuras de carbono. La biosíntesis alcaloide en plantas involucra muchos pasos catalíticos, catalizados por enzimas que pertenecen a una amplia gama de familias de proteínas ⁽⁸⁶⁾.

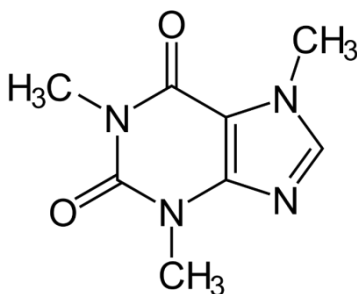


Fig. 7.- Estructura química de los alcaloides
(Imagen obtenida de Google.com)

Terpenos

Conocidos también como isoprenoides (Fig. 8) son la clase más diversa de productos naturales ya que se encuentran en casi todas las formas de vida. Cumplen diversas funciones desde estructurales (colesterol en las membranas celulares) a funcionales (carotenoides en la fotosíntesis; retinal en la visión; quinonas en la transferencia de electrones). Esencialmente todos se originan a partir de sustratos C5 como difosfato de dimetilalilo (DMAPP) y difosfato de 7 (IPP) (Fig. 9) ⁽²⁸⁾.

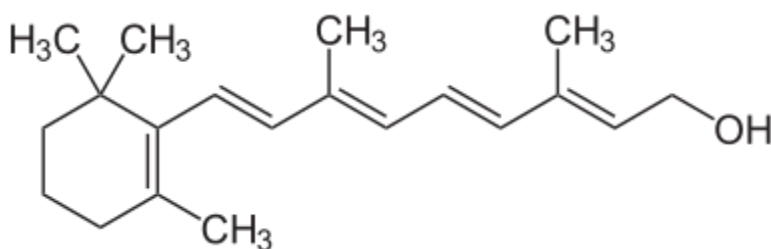


Fig. 8.- Estructura química de los terpenos (Imagen obtenida de Google.com)



Fig. 9.- Estructuras químicas de DMAPP e IPP. ⁽²⁸⁾.

Flavonoides

Son compuestos con un gran número de pequeñas moléculas con estructuras similares como un anillo de benceno vinculado a un anillo de pirona, que en la posición 2 o 3 toma un anillo de fenilo como sustituto; más de 15,000 flavonoides han sido aislados e identificados de las plantas. En plantas, frutas y semillas son responsables de las características de color, fragancia y sabor. Además, realizan diversas funciones como regular el ciclo celular, atraer polinizadores y proteger contra diferentes factores de estrés, funcionan como moléculas señal, filtros UV, recolectan especies reactivas de oxígeno y tienen un papel importante en la deshidratación, tolerancia calor o al congelamiento.

Pueden clasificarse en diversos grupos, como isoflavonoides, flavonoides, flavonas y antocianidinas (Fig. 10) ⁽⁸⁷⁾.

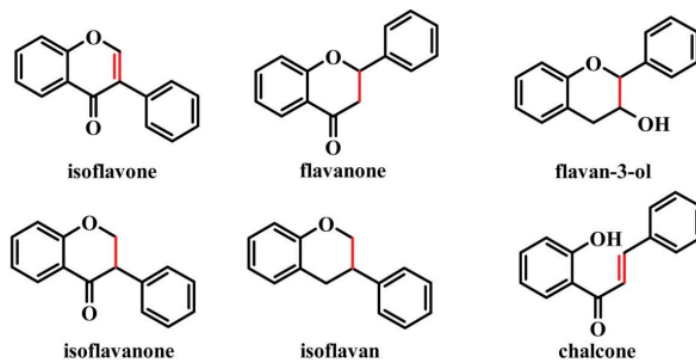


Fig. 10.- Estructuras de flavonoides ⁽⁸⁷⁾.

Agave maximiliana

Su uso principal es para fabricar las bebidas alcohólicas llamadas mezcal y raicilla. También la savia se utiliza como medicamento y sus flores sirven como alimento. Comúnmente es llamado *Agave lechuguilla* ⁽³³⁾.

Por medio de HPLC se comprobó que, dependiendo de su lugar de origen, *A. maximiliana* puede tener una variación entre los componentes fitoquímicos, pero en general presenta flavonoides como flavonona, kaempferol, apigenina, entre otros (Tabla 1) ^(63, 71).

Tabla 1 – Cuantificación de flavonoides (µg/g) por HPLC-UV, en extractos etanólicos (EtOH) y metanólicos (MetOH) de *A. lechuguilla* de tres regiones de México ⁽⁷¹⁾.

*

Pico máximo	Compuesto	Concentración (µg/g DW)					
		Matehuala		Cosme		Tuxtepec	
		MetOH	EtOH	MetOH	EtOH	MetOH	EtOH
1	Flavonona **	520.13 ± 39.98	276 ± 16.35	359.86 ± 55.98	224.78 ± 19.59	214.10 ± 24.10	284.01 ± 10.61
2	Isorhamnentina **	1416.70 ± 150.32	753.97 ± 48.25	981.55 ± 89.85	614.3 2 ± 24.94	1251.9 6 ± 58.24	752.80 ± 2.91
4	Catechina *	2.79 ± 0.26	1.80 ± 0.07	3.98 ± 1.30	4.97 ± 2.26	7.91 ± 2.62	4.3 8 ± 0.50
5	Cianidina **	0.00	0.00	0.00	3.53 ± 0.22	0.00	10.48 ± 2.61
6	Delfinidina **	0.00	0.00	0.00	11.42 ± 0.32	0.00	21.55 ± 3.79
7	Hesperidina **	32.60 ± 4.54	4.00 ± 0.13	32.96 ± 3.73	4.05 ± 0.29	34.23 ± 0.95	4.69 ± 0.19
8	Quercetina *	12.08 ± 0.69	11.65 ± 0.66	13.24 ± 0.80	13.73 ± 0.25	15.57 ± 2.47	13.48 ± 0.32
9	Apigenina *	6.93 ± 0.29	7.88 ± 0.33	7.95 ± 0.54	7.85 ± 0.84	9.70 ± 1.96	9.25 ± 0.61
10	Kaempferol	12.29 ± 1.37	12.78 ± 0.75	12.82 ± 0.27	12.77 ± 0.43	13.71 ± 1.01	13.48 ± 0.31
11	Apigenina *	1.26 ± 0.08	1.43 ± 0.07	1.45 ± 0.10	1.43 ± 0.15	1.76 ± 0.36	1.68 ± 0.11
	Total	2005.08	1069.70	1413.56	898.85	1548.94	1115.80

* p < 0.001

** p < 0.005

Agave angustifolia

Es una especie común de México y Panamá, con notable adaptación a la sequía, el calor y los entornos fríos. Se utiliza comúnmente para la producción de un tipo de

bebida fermentada y destilada conocida como “bacanora”. La fibra derivada de las hojas tiene un contenido de 67% de celulosa ⁽⁸⁸⁾.

Se ha reportado la presencia de flavonoides, terpenos, saponinas y glucósidos cardiotónicos en extractos acuosos y etanólicos (Tabla 2) ⁽¹⁵⁾.

Tabla 2 - Composición fitoquímica cualitativa de extractos hidroalcohólicos y acuosos de hojas de *Agave angustifolia* ⁽¹⁵⁾.

	<i>A. angustifolia</i> Haw	
Metabolitos	Et	Ac
Flavonoides	++	+
Terpenos	++	++
Antocianinas	-	-
Esteroides	+	-
Saponinas	++	+
Taninos	+	-
Cumarinas	-	+
Flobatininos	-	-
Gluc. Cardiotónicos	+	+
Antraquinonas	-	-
Emodinas	-	-
Presencia: +++ abundante, ++: moderado, +: bajo, -: ausencia		

Agave angustifolia y *maximiliana* son especies utilizadas ampliamente en México como ingrediente en alimentos dulces y bebidas fermentadas; la bebida derivada de la especie *angustifolia* se conoce como bacanora, también se utiliza en la medicina tradicional para tratar el dolor de heridas y el daño reumático, y como un remedio para la psoriasis, aproximadamente de la abundancia total de esta planta en Jalisco, esta especie representa el 21%^(45, 49). *A. maximiliana* se usa en la producción de raicilla, sin embargo, *A. angustifolia* también puede usarse para su producción. Esta especie solo representa un 10% del total de la abundancia de la planta de agave en Jalisco⁽⁴¹⁾.

Justificación

La giardiasis afecta a una gran parte de la población mundial (280 millones de infecciones por año), los medicamentos existentes tienen una falla terapéutica cada vez mayor y generan efectos secundarios desagradables que culminan en el abandono de los tratamientos generando cepas resistentes. Es por ello que se buscan nuevas alternativas que sean tan efectivas como los tratamientos existentes. Existe una gran variedad de plantas con efectos antiparasitarios como: *Lippia graveolens* (Oregano) y *Ruta chalepensis* (Ruda) también se han reportado varios efectos benéficos en especies de agave. El estado de Jalisco cuenta con 28 especies de agave, de las cuales solo 5 se utilizan en la producción de tequila y aguamiel, de estas plantas solo se utiliza la parte basal, por lo que aproximadamente el 60% (hojas y penca) se desperdicia. El agave contiene importantes fitoquímicos con actividades biológicas altamente diversas, que ejercen beneficios para la salud. Las especies *A. lecheguilla*, *A. sisalana* y *A. brittoniana* han mostrado actividad antiparasitaria. Resulta importante evaluar si otras especies de Agave como *A. angustifolia* y *A. maximiliana* tienen actividad anti-giardiasis. Los resultados que se obtengan permitirán la propuesta de un posible uso de los desechos de agave como terapia alternativa y/o adyuvante en el tratamiento de la giardiasis.

Hipótesis

Los extractos de *Agave angustifolia* y *Agave maximiliana* tienen actividad biológica contra el parásito *Giardia lamblia*.

Objetivo general

Evaluar el efecto antiparasitario contra *Giardia lamblia* de los extractos de *Agave maximiliana* y *Agave angustifolia*.

Objetivos particulares

1. Determinar el efecto anti*giardiásico* de extractos etanólicos de *Agave angustifolia* y *Agave maximiliana* en trofozoítos de *G. lamblia*.
2. Evaluar los daños morfológicos por efecto de los extractos de *Agave*.
3. Determinar el efecto anti*giardiásico* de extractos etanólicos de *Agave angustifolia* y *Agave maximiliana* en el enquistamiento.

Material y métodos

Diseño experimental

Extractos etanólicos liofilizados de especies de Agave

Los extractos etanólicos de *Agave angustifolia* (Lotes 242, 243, 244 recolectados del predio “las piedras” el 7 de noviembre de 2020) o *Agave maximiliana* (Lotes 251, 252 recolectados de predio “la mesa” y chiquilistlan respectivamente y lotes 254 255 recolectados de predio “el saltillo” el 17 y 19 de noviembre de 2020 respectivamente) utilizados en este trabajo fueron aislados en el Laboratorio Química de Extraíbles del Centro Universitario de Ciencias Exactas e Ingenierías, por la Dra. Lucia Barrientos Ramírez y donadas por el Dr. Ramón Reynoso Orozco del Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias. Para la extracción, 100g de hojas secas congeladas, se “deshebraron” y, para facilitar la extracción las fibras resultantes se cortaron en 2 o 3 partes (alrededor de 2 cm), se les adicionaron 600 mL de etanol y se dejaron macerar en agitación a 150 rpm por 48 h a temperatura ambiente (TA). Posteriormente, se filtró para eliminar cualquier fibra presente en el extracto. Se vaciaron 200 mL del filtrado en el matraz del rotavapor (Rotavapor® R-300, Buchi) para su condensación a 40°C, hasta su reducción a un volumen de 100 mL, La muestra resultante, se vació en placas de liofilización, las cuales se congelaron a -20°C por al menos 48 h. Una vez congelada, se liofilizó por al menos otras 48 h a -36°C siguiendo las instrucciones del fabricante del equipo Scirntz-10N Freeze Dryer, una vez finalizado el proceso, se recuperó la muestra, se colocó en tubos de 1.5 mL o en un tubo Falcón según el volumen, se almacenó a 4°C hasta su uso.

Cultivo y mantenimiento de trofozoítos de *Giardia lamblia*

El cultivo y mantenimiento de los trofozoítos de *Giardia lamblia* (aislado WB C6) se realizó a 37° C en tubos de borosilicato (11 x 120 mm) con medio de crecimiento

(TYI-S-33 a pH 7.0, suplementado con 0.5 mg/mL de bilis bovina y 10% de suero fetal bovino (Gibco® 16000-044)(26). El cultivo se conservó realizando subcultivos (0.5×10^5 trofozoítos/mL) dos veces por semana. Los cultivos se incubaron en agua hielo por 30 min para provocar el desprendimiento de los trofozoítos de los tubos y el conteo de células se realizó en cámara de Neubauer. Para todos los experimentos, se utilizaron cultivos en fase exponencial de crecimiento.

Determinación del efecto de los extractos de *Agave angustifolia* y *Agave maximiliana* en el crecimiento de los trofozoítos de *Giardia lamblia*

Para evaluar el efecto de los extractos de *Agave angustifolia* o *Agave maximiliana* en el crecimiento de *Giardia lamblia*: 10,000 trofozoítos/mL se crecieron a 37° C por 24, 48 y 72 h en medio TYI-S-33 el cual contenía 0, 100, 300 y 600 µg/mL de cada extracto. Dimetil sulfóxido (DMSO, SigmaAldrich®, 276855) al 0.4% y Metronidazol (1mM), se utilizaron como control negativo y positivo, respectivamente. Al término de cada tiempo los trofozoítos se colectaron por enfriamiento y se realizó el conteo de la población en cámara de Neubauer. El efecto en el crecimiento se realizó estableciendo el porcentaje de inhibición del crecimiento del parásito respecto al control positivo, el cual se definió como el 100% de crecimiento. Por último, con el software GraphPad versión 6.01 para Windows se calculó la IC₅₀. Se realizaron 3 ensayos independientes por triplicado de cada uno.

Determinación del efecto de los extractos de *Agave angustifolia* y *Agave maximiliana* en la adhesión de los trofozoítos de *Giardia lamblia*

Para evaluar el efecto de las especies de *Agave* sobre la capacidad de adhesión de los trofozoítos a las paredes del tubo de borosilicato, se cultivaron 10,000 trofozoítos/mL en medio de crecimiento, conteniendo 100, 300 y 600 µg/mL de *A. maximiliana* y *angustifolia*, por 24, 48 y 72 h. Al término de cada período de incubación, se retiró el medio que contenía a los trofozoítos que no se adhirieron a

las paredes de los tubos. Para despegar a la población adherida, los tubos se llenaron con solución amortiguadora de fosfatos (PBS) fría y se incubaron por 30 minutos en baño de agua-hielo; el frío ocasiona la contracción del disco de adhesión de *G. lamblia* lo que provoca su desprendimiento. El efecto sobre la adherencia se expresó como porcentaje de trofozoítos no adheridos en relación con el número total de células, los resultados obtenidos se compararon con cultivos control de DMSO. El conteo de las células se realizó en cámara de Neubauer.

Determinación del efecto de los extractos de *Agave angustifolia* y *Agave maximiliana* en la viabilidad de los trofozoítos de *Giardia lamblia*

Para evaluar la viabilidad de los trofozoítos de *G. lamblia* expuestos a ambas especies de agave se empleó el método de tinción por exclusión de azul de tripano. 10 μ L de los cultivos expuestos a las diferentes concentraciones de Agave se pusieron en una cantidad igual del colorante azul de tripano al 0.4% (Gibco BRL 15250-061), se contaron un total de 100 células, incluyendo aquellos que no estaban teñidos y se calculó la viabilidad celular como el porcentaje de células viables en las muestras en relación con las células tratadas con DMSO.

Efecto de extractos de agave en la morfología de *G. lamblia*

Para evaluar los posibles daños morfológicos causados por los extractos de Agave, muestras de parásitos expuestos a 300 μ g/mL de cada extracto, por 24, 48 y 72 h, se procesaron para microscopia electrónica de barrido. Al término de cada tiempo los parásitos se colectaron por centrifugación, se lavaron con PBS y se fijaron por 1 h con glutaraldehído al 2.5% en PBS (buffer de fosfatos) (Sigma-aldrich). Se permitió la adherencia de las células fijadas en portaobjetos previamente cubiertos con una solución de poli-L-lisina al 0.1%. Se lavaron 3 veces con PBS y se fijaron por 2 h con una solución de tetróxido de osmio al 2%. Posteriormente, se lavaron 3 veces con PBS y se deshidrataron en gradiente de etanol (50-100%). Finalmente,

se secaron a punto crítico con dióxido de carbono (CO₂) y se recubrieron con una capa delgada de oro por pulverización catódica. Las muestras se analizaron con el equipo JEOL-JSM6510LV.

Determinación del efecto de los extractos de *Agave angustifolia* y *Agave maximiliana* en el enquistamiento de *G. lamblia*

Para evaluar el efecto de los extractos de *Agave angustifolia* y *Agave maximiliana* en el enquistamiento, 150,000 trofozoítos/mL se crecieron a 37° C por 24h en medio TYI-S-33 el cual contenía DMSO, 0, 100, 300 y 600 µg/mL de extracto de agave. Pasado este tiempo, se sustituyó el medio de crecimiento por medio de enquistamiento G5 (bilis bovina 10 mg/mL, pH 7.8) y se incubó por 48h(36). El número de formas quísticas se determinó por conteo en cámara de Neubauer, el rendimiento de quistes viables se determinó por incubación en Agua 24 h a 4°C y cámara de Neubauer.

Análisis estadístico

Se realizó la prueba de normalidad Shapiro-Wilk. Todos los datos fueron analizados mediante el ANOVA de dos vías y posteriormente con la prueba de comparación múltiple de Tukey. $p < 0.05$ se consideró estadísticamente significativo. Para realizar el análisis se empleó el software GraphPad versión 8.1 para Windows.

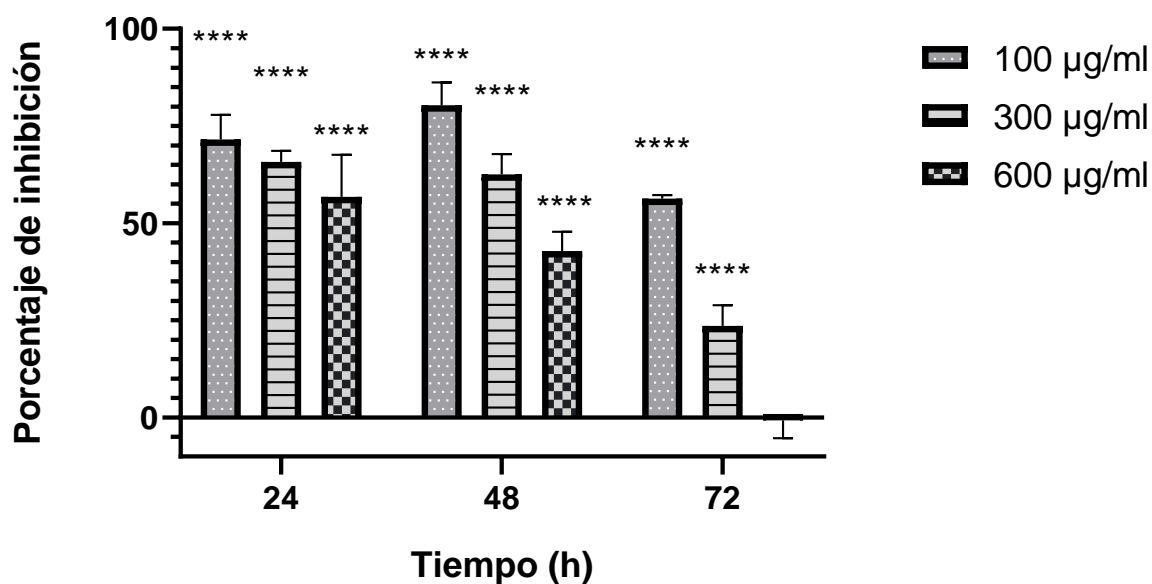
Resultados

Agave angustifolia y *Agave maximiliana* afectan el crecimiento de los trofozoítos de *Giardia lamblia*

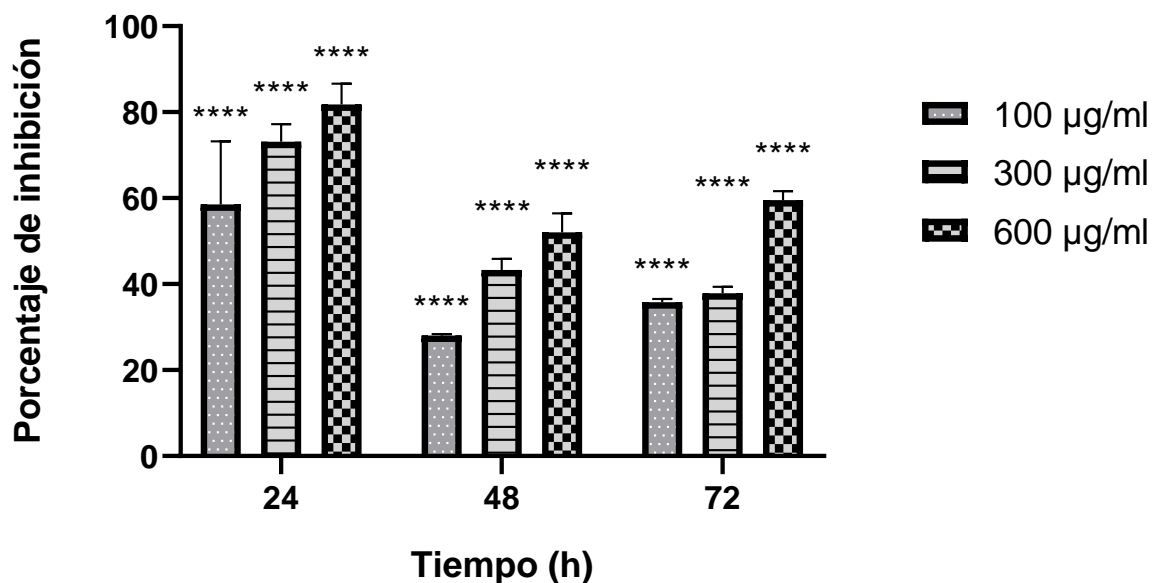
Para evaluar el efecto de los extractos de Agave en el crecimiento de los trofozoítos de *G. lamblia*, se realizaron ensayos espacio-temporal en presencia de 100, 300 y 600 µg/mL de cada extracto. La primera especie evaluada fue *A. maximiliana*, en la Gráfica 1 es posible observar que el mayor porcentaje de inhibición en el crecimiento fue a las 48 h con 100 µg/mL (80%), a las 72 h con esta misma concentración se sigue presentando un efecto inhibitorio mayor que con las concentraciones de 300 y 600 µg/mL de Agave, pero, este fue solo del 50%. Otro elemento a destacar sucede con 600 µg/mL, cuyo crecimiento fue ligeramente superior al de los controles, a las 72 h.

En el caso de *Agave angustifolia*, éste mostró una inhibición significativa en el crecimiento de *Giardia*, se aprecia que el mayor efecto fue con 600 µg/mL con una inhibición de 81.77%. Este efecto se mantuvo durante las 48 y 72 h, resultando al final del ensayo inhibiciones en el crecimiento de 35.77%, 37.87% y 59.53% para las concentraciones 100, 300 y 600 µg/mL, respectivamente (Gráfica 2).

No se observó una diferencia estadísticamente significativa entre los cultivos sin tratamiento y los tratados con DMSO.



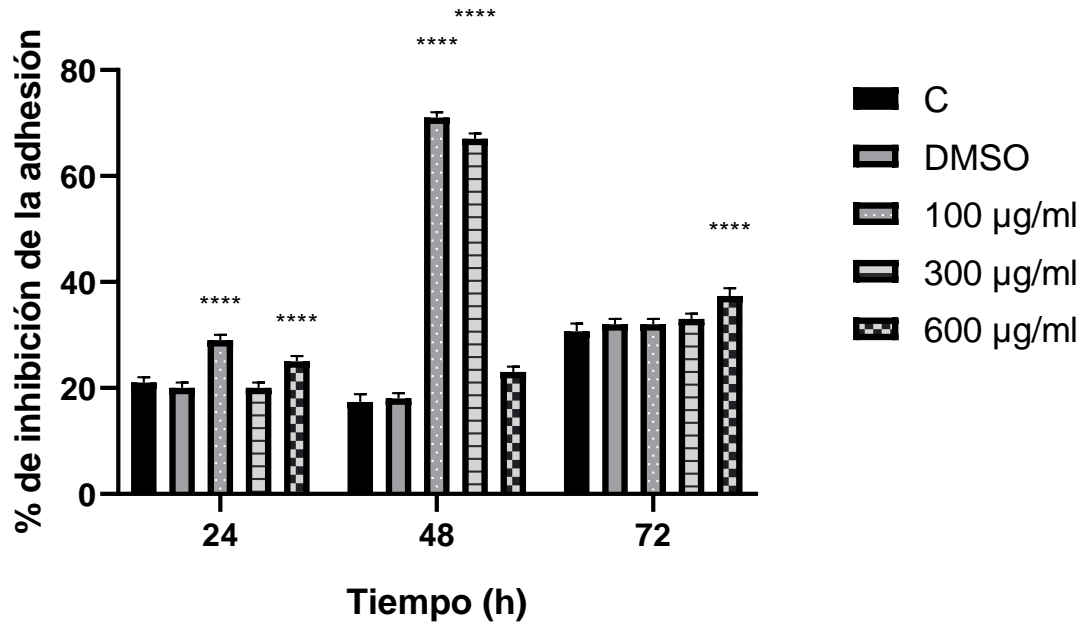
Gráfica 1.- Porcentaje de inhibición del crecimiento de *G. lamblia* por efecto del extracto etanólico de *Agave maximiliana*, respecto a DMSO. Se muestra el promedio de tres ensayos independientes por triplicado y la desviación estándar (**** $p < 0.0001$)



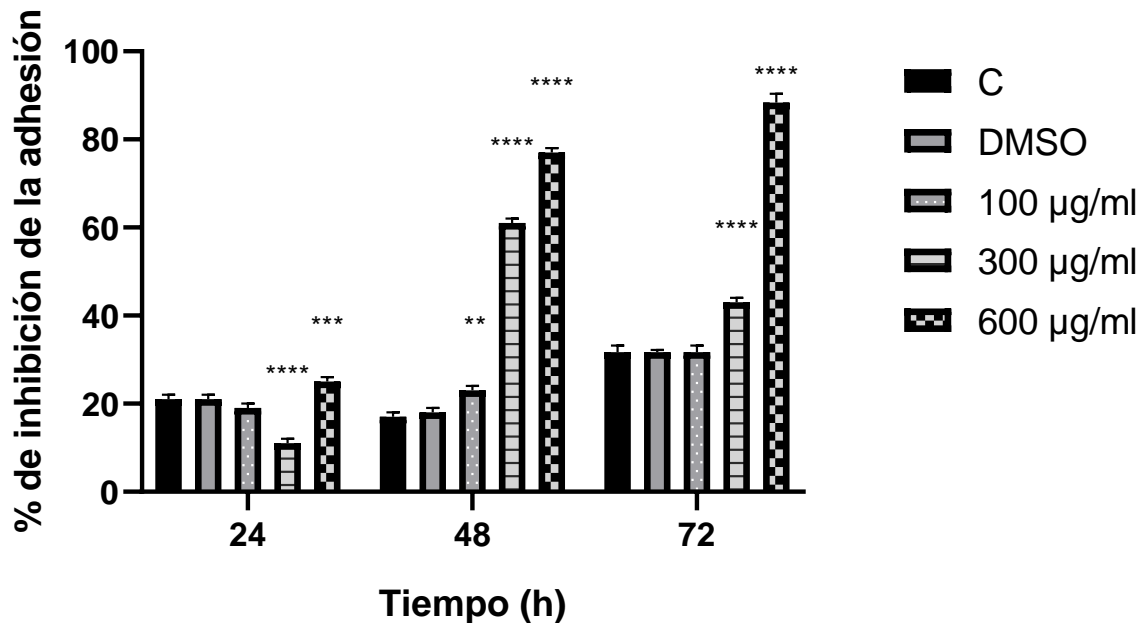
Gráfica 2.- Porcentaje de inhibición del crecimiento de *G. lamblia* por efecto del extracto etanólico de *Agave angustifolia*, con respecto a DMSO. Se muestra el promedio de tres ensayos independientes por triplicado y la desviación estándar (**** $p < 0.0001$).

Agave angustifolia* y *Agave maximiliana* afectan la capacidad de adhesión de los trofozoítos de *Giardia lamblia

Para determinar si los extractos de Agave afectaban la adhesión de los trofozoítos a los tubos de borosilicato, se realizó la cuenta de población libre y población adherida, después de estar en contacto con las diferentes concentraciones de los extractos de Agave (100, 300 y 600 µg/mL) por 24, 48 y 72 h. El comportamiento observado muestra que ambas especies de Agave afectaron de manera significativa la capacidad de adhesión de los trofozoítos, en todos los tiempos y concentraciones evaluados. El efecto más dramático se observó con 100 y 300 µg/mL de *A. maximiliana* cuya inhibición de la adhesión fue mayor al 70%, solo a las 48 h de iniciado el ensayo (Gráfica 3). En este mismo tiempo, con 300 y 600 µg/mL de *A. angustifolia* se inhibió la capacidad de adhesión de los trofozoítos en un 60 y 78%, respectivamente. A las 72 h solo la concentración máxima de *A. angustifolia* mantuvo su efecto inhibitorio (Gráfica 4). En los cultivos que no recibieron tratamiento alguno y los tratados con DMSO más del 80% de la población se adherida hasta las 48h, a las 72 h el 50% de la población estaba despegada de las paredes del tubo de borosilicato.



Gráfica 3.- Representación en gráfica de barras de los porcentajes de inhibición de la adhesión, obtenidos en el experimento con *Agave maximiliana* vs *G. lamblia* respecto a DMSO. El promedio y los valores de desviación estándar de tres replicas son mostrados (**** $p < 0.0001$).



Gráfica 4.- Representación en gráfica de barras de los porcentajes de inhibición de la adhesión, obtenidos en el experimento con *Agave angustifolia* vs *G. lamblia* respecto a DMSO. El promedio y los valores de desviación estándar de tres replicas son mostrados (**** $p < 0.0001$, *** $p < 0.0007$, ** $p < 0.01$).

***Agave angustifolia* y *Agave maximiliana* no afectan la viabilidad de los trofozoítos de *Giardia lamblia*.**

Dado el gran número de células que tuvieron afectada la capacidad de adhesión, y a la presencia de células con aparente daño morfológico realizamos un ensayo de exclusión con azul de trypano, para determinar si las células eran viables. Las células teñidas con el colorante fueron contadas en un microscopio invertido y fueron corregidas o normalizadas con los resultados de los cultivos control. Los resultados mostrados en la tabla 2 señalan que solo 4 células del total de 100 células contadas mostraron penetración de color por daño a su membrana, por efecto de los extractos de Agave.

Tabla 3.- Resultados obtenidos en el ensayo de viabilidad (porcentaje de células no viables).

Tiempo de evaluación/ Tratamiento	Control	DMSO	<i>A. maximiliana</i>	<i>A. angustifolia</i>
48 h	1 ± 1.33	1 ± 1.6	4 ± 0.47 *	4 ± 0.94 *
* $p = 0.0301$				

Los extractos de Agave Provocan alteraciones morfológicas en los trofozoítos de *G. lamblia*.

Para evaluar las alteraciones morfológicas, ocasionadas por los extractos de Agave en trofozoítos, los parásitos se procesaron para microscopia electrónica de barrido SEM. Las imágenes de SEM mostraron alteraciones morfológicas mínimas. Con *A. angustifolia*, se observaron parásitos con protuberancias en la membrana y una retracción de la región posterior del parásito, además de aparente acortamiento de los flagelos caudales (Fig. 11 e, f). Con *A. maximiliana* se observaron parásitos con plegamientos en la parte posterior (Fig. 11 g y h). Los parásitos que no recibieron tratamiento alguno y los tratados con DMSO muestran la morfología piriforme normal, resaltan sus 8 pares de flagelos, sus dos núcleos y el disco ventral (Fig. 11 a-d).

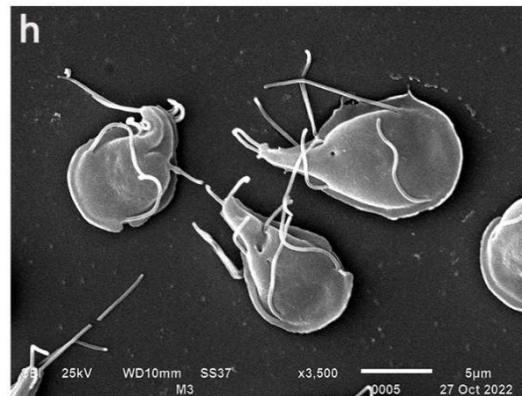
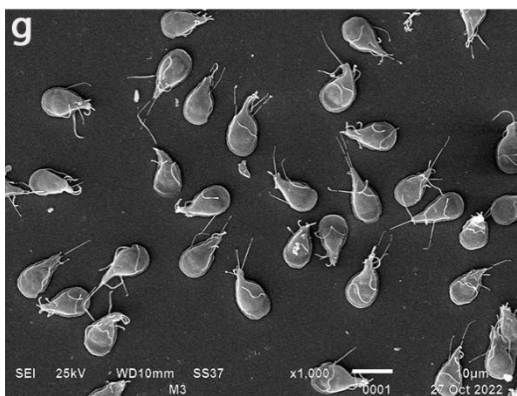
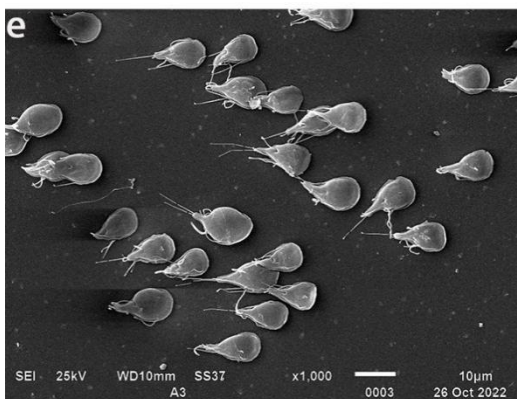
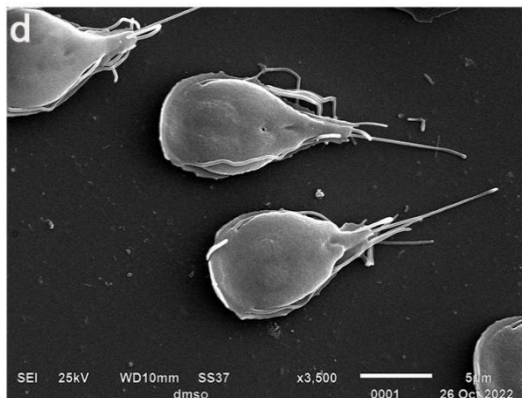
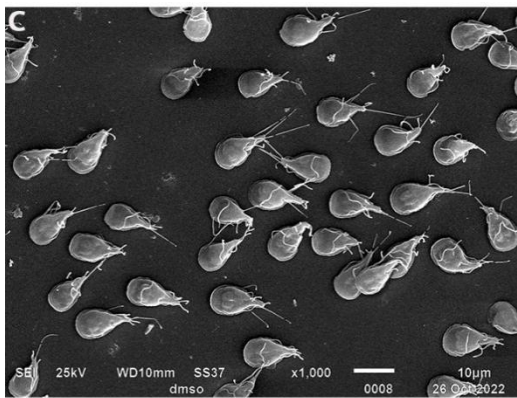
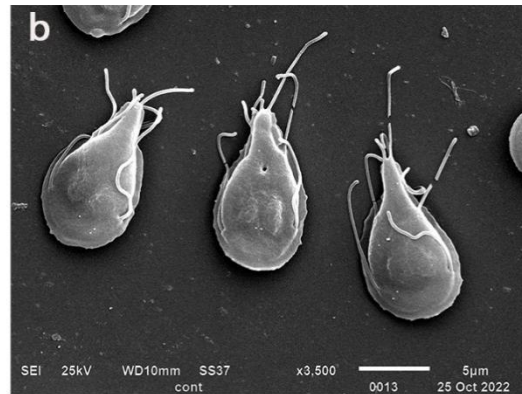
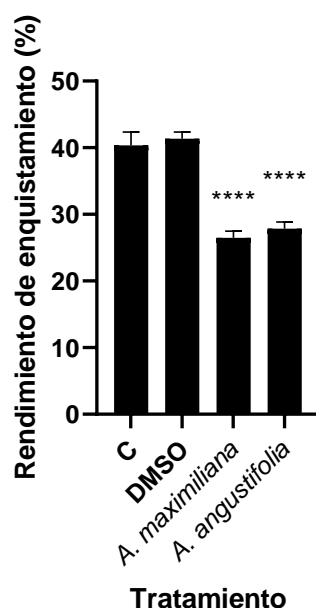


Fig. 11.- Microscopía de barrido de células control y tratadas con los extractos de Agave: a y b representan al grupo sin tratamiento, c y d representan a DMSO, e y f representan a *A. angustifolia* 300 µg/mL y g y h representan a *A. maximiliana* 300 µg/mL.

Identificación del efecto de *Agave angustifolia* y *Agave maximiliana* en el enquistamiento de *G. lamblia*.

Dado que uno de los primeros eventos del proceso de enquistamiento es el desprendimiento del trofozoíto de su sustrato, y como en los análisis realizados en células tratadas con diferentes extractos, observamos que una gran cantidad de *Giardias* no se adhirieron a los tubos, se evaluó el efecto de los extractos en el proceso de enquistamiento. Con ambas especies se observó un decremento en la eficiencia de enquistamiento respecto al grupo control/DMSO. El promedio de enquistamiento *in vitro* es del 40%, sin embargo, con los tratamientos de extractos de agave a cultivos de *Giardia* con medio de enquistamiento, esta se redujo hasta un 20% (Gráfica 6).



Gráfica 6.- Enquistamiento de *G. lamblia* en presencia 300 µg/mL de *A. maximiliana* y *A. angustifolia*. El

promedio y los valores de desviación estándar de tres replicas son mostrados, **** $p < 0.0001$.

Discusión

G. lamblia es un parásito flagelado causante de la giardiasis, se calcula que alrededor de 200 millones de personas se infectan en todo el mundo anualmente. Los medicamentos actuales para su tratamiento presentan una ineffectividad cada vez mayor, es por eso que diferentes extractos naturales han sido evaluados. Está bien descrito que las plantas llevan a cabo una serie de reacciones químicas para sintetizar sustancias/metabolitos que le permiten adaptarse a diferentes condiciones ambientales y de defensa contra diversos patógenos. Lo anterior ha llevado a considerarlos como una alternativa de tratamiento contra patógenos que afectan al ser humano. En este estudio encontramos que extractos etanólicos de *A. maximiliana* y *A. angustifolia* presentaron diferente grado de inhibición del crecimiento de *Giardia lamblia*, siendo el más eficaz el extracto de *A. angustifolia*. Es importante mencionar que el contenido, tipo y concentración de metabolitos primarios y secundarios presentes en las plantas pueden variar dependiendo de la parte utilizada, de la especie y la edad, entre muchos otros factores, y que esto compromete su actividad biológica ⁽⁶⁴⁾. Con el fin de dar respuesta al efecto variable por parte de los extractos de agave, utilizando un sistema de detección UV-Vis de longitud de onda variable se analizó la composición fitoquímica de los extractos, los espectros UV/VIS obtenidos exhiben un máximo de absorción a las longitudes de onda entre 270 y 700 nm; característicos de los principios activos de las plantas. Un grupo de compuestos orgánicos corresponden a antocianinas que se han reportado entre 270 y 290 nm, también se encontró la presencia de quinolinas a 313 nm aproximadamente. En la longitud de onda 291 y 310-370 nm se encuentran algunos flavonoides. Entre 400-500 nm se encuentra la presencia de carotenoides, entre 428-453 y 650-675 se tiene la presencia de clorofila. Por otro lado, en 488 nm se ha reportado la presencia de terpenos (Ver anexo Figura I)^(56, 68, 79, 80, 89). Adicionalmente, el grupo de la Dra. Lucia Barrientos del CUCEI, realizó un tamizaje fitoquímico de extractos de 4 diferentes especies de Agave, entre los que se encontraban *A. maximiliana* y *A. angustifolia*. Se encontró a *A. angustifolia* como la

especie con mayor concentración de Flavonoides, terpenos y esteroides (Ver anexo Tabla I), lo que justificaría su mayor actividad anti*giardiásica*. Flavonoides como el “kaempferol” ya han mostrado actividad anti*giardiásica* inhibitoria; este flavonoide produce un arresto celular en *Giardia* ^(6, 89). Otras moléculas que han reportado tener un efecto anti*giardiásico* es el terpeno llamado timol y acorde con Toychiev y col. (el esteroide 20-hidroxiecdisona demostró tener un efecto inhibitorio en el 100% de los casos ^(69, 70). En especies de Agave como *A. sisalana* ya se ha reportado la presencia de “kaempferol” ^(78, 90). Con células tratadas con *Agave maximiliana* se observó una pérdida del efecto anti*giardiásico* con el paso del tiempo, lo cual nos habla de una aparente adaptación del parásito. En relación al efecto de recuperación en el crecimiento observado con *A. maximiliana*, acorde con el espectro UVvis y al tamizaje éste tiene una mayor cantidad de saponinas y menos flavonoides y esteroides, otros autores como Orestes Guerra y col. han utilizado bacterias y parásitos, adicionalmente han fraccionado los extractos demostrando que cuanto menos aislada esta la molécula evaluada se reduce el efecto buscado ⁽⁶⁶⁾.

Por otro lado, los parásitos tratados con los extractos de Agave mostraron afectación en su capacidad de adhesión a una superficie inerte, considerando que en *Giardia*, un mecanismo necesario en su ciclo de patogenicidad es la adhesión al intestino de su huésped, resulta importante resaltar que si bien *A. maximiliana* resultó ser el agave con menor actividad en el crecimiento, que incluso la dosis de 600 µg/mL provocó un crecimiento mayor al de los controles, solo el 50% de la población permanecía adherida. Esto se relaciona con lo reportado por Bolaños y col. en el cual *E. histolytica* perdía su capacidad de adhesión debido a un flavonoide⁽⁹⁾.

Un resultado interesante a resaltar es el hecho que, por microscopia de barrido no se observaron daños morfológicos evidentes ni la presencia de desechos celulares que justificaran la inhibición en el crecimiento, por lo que suponemos que el efecto inhibitorio está causado por alteraciones en el ciclo celular. Otros autores han

demostrado que el flavonoide genisteína inhibe la correcta duplicación celular, arrestándola en la fase M/G2 ⁽⁵⁰⁾. Lo cual acorde con Lagunas-Rangel 2021, en estas fases se da la duplicación de núcleos y estos pueden observarse de manera difusa ⁽⁵¹⁾. De igual forma Kabata Dzik A. y col reportaron que una combinación de diversos flavonoides ejerce un efecto de arresto celular en fases G2/M de manera dosis dependiente ⁽⁴⁷⁾.

Finalmente, en el enquistamiento de *Giardia lamblia*, la fase G2 es la fase más larga del ciclo celular y contiene el punto de restricción para comenzar a diferenciarse en la forma de quiste ⁽⁵²⁾. Nuestros resultados muestran que los extractos de Agave inhibieron el proceso de enquistamiento, lo cual nos sugiere que los trofozoítos son arrestados en la fase G2. Otros autores han reportado que el esteroide diosgenina, es capaz de inducir detención del ciclo celular en las fases G0/G1 en células eucariotas⁽⁶⁰⁾, de acuerdo al tamizaje realizado, se encontró la presencia de esteroides en ambas especies de agave, por lo cual alguno de estos compuestos podría influir en su efecto. También el uso de flavonoides como genisteína, hesperidina, apigenina, narigenina y entre otros inducen arresto celular en células eucariotas cancerígenas, dichos flavonoides han sido reportados en especies de Agave, acorde con Kobayashi y col. y Morreuw y col., ^(47, 50, 67).

Los metabolitos presentes en los extractos de Agave podrían estar impidiendo que el parásito se replique correctamente y por consiguiente no se enquiste, sin embargo, hacen falta más estudios que permitan corroborar lo anterior.

Conclusión

Este proyecto tuvo como objetivo evaluar dos especies de agave con el fin de encontrar un efecto anti*giardiásico*. Se tiene conocimiento que dicho efecto puede requerir diversos factores, en este caso pudimos atribuir un efecto relacionado al arresto celular.

Sin duda encontramos un efecto que debe ser estudiado más a fondo. Adicionalmente se realizaron estudios sobre estas dos especies de agave, para

poder atribuir dicho efecto a alguna de ellas, sin embargo, al ser planta completa se requiere una mayor profundidad en estudios futuros, una posible perspectiva es realizar un fraccionamiento y una cromatografía más específica como HPLC.

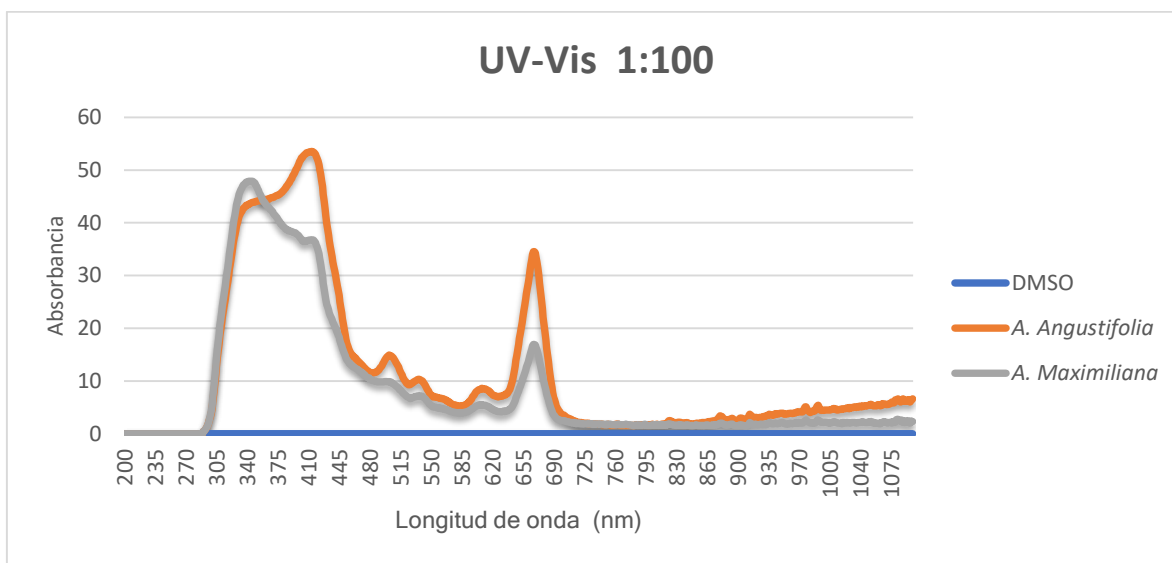
A través de la evaluación de diversas características, como inhibición, adhesión, daño morfológico y demás, se llegó a completar el objetivo previamente mencionado el cual habla sobre describir el efecto del agave en *G. lamblia*. Esto se apoyó de bibliografía previamente reportada y también funcionara como referencia para futuros trabajos.

Jalisco es un estado endémico de diferentes especies de agave y de acuerdo con nuestros resultados existe un gran potencial para evaluar su capacidad anti $giardi\acute{o}sica$.

Anexos

Identificación de grupos funcionales en los extractos de Agave.

Se realizó un estudio con espectro UV visible con el fin de comprobar la presencia de los compuestos orgánicos observados en el tamizaje de los extractos de las dos especies de agave y de esta forma poder atribuir el efecto antiparasitario a uno o un grupo de ellos.



Grafica 9: Espectro UV visible de las dos especies de agave.

La gráfica obtenida mostró picos más representativos en 270-450 nm. Un grupo de compuestos orgánicos corresponden a antocianinas que se han reportado entre 270-290 nm, también se encontró la presencia de quinolinas a 313 nm aproximadamente. En la longitud de onda 291 y 310-370 nm se encuentra el grupo fenol como algunos flavonoides. Entre 400-500 nm se encuentra la presencia de carotenoides, entre 428-453 y 650-675 se tiene la presencia de clorofila. Por otro lado, en 488 nm se ha reportado la presencia de terpenos.

Adicionalmente se realizaron pruebas fitoquímicas para la identificación de los grupos funcionales presentes en los extractos de *A. maximiliana* y *A. angustifolia*, observando algunas diferencias entre ellos. Se encontró la presencia de terpenos, flavonoides, esteroides, taninos, saponinas, entre otros, en diferentes cantidades según la especie como se muestra en la Tabla 3.

Tabla I. Tamizajes realizados en las especies *Agave angustifolia* *Agave maximiliana*

	Especie de Agave	
Compuesto orgánico	<i>Agave maximiliana</i>	<i>Agave angustifolia</i>

Flavonoides	++	+++
Terpenos	+++	+++
Esteroides	++	+++
Saponinas	+++	++
Taninos	++	++
Cumarinas	++	++
Alcaloides	-	-
Alto +++ Moderado ++ Bajo + Nulo -		

Bibliografía

1. Abdul-Wahid A, Faubert G. Characterization of the local immune response to cyst antigens during the acute and elimination phases of primary murine giardiasis. *Int J Parasitol.* 2008;38(6):691-703.
2. Adam RD. Biology of *Giardia lamblia*. *Clin Microbiol Rev.* 2001;14(3):447-75.
3. Alauzet C, Lozniewski A, Marchandin H. Metronidazole resistance and nim genes in anaerobes: A review. *Anaerobe.* 2019;55:40-53.
4. Ankarklev J, Jerlström-Hultqvist J, Ringqvist E, Troell K, Svärd SG. Behind the smile: cell biology and disease mechanisms of *Giardia* species. *Nature Reviews Microbiology.* 2010;8(6):413-22.
5. Ángeles-Arvizu A, Enriquez-Flores S, Jiménez-Gutiérrez A, Pérez-Rangel A, Luna-Arias JP, Castillo-Romero A, et al. MDR1 protein (ABC-C1) Over Expression in *Giardia Intestinalis* Incubated with Albendazole and Nitazoxanide. *Acta Parasitol.* 2021;66(4):1158-66.
6. Argüello-García R, Calzada F, García-Hernández N, Chávez-Munguía B, Velázquez-Domínguez JA. Ultrastructural and proapoptotic-like effects of kaempferol in *Giardia duodenalis* trophozoites and bioinformatics prediction of its potential protein target. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2020;115:e200127.
7. Baldim JL, de Alcântara BGV, Domingos ODS, Soares MG, Caldas IS, Novaes RD, et al. The Correlation between Chemical Structures and Antioxidant, Prooxidant, and Antitrypanosomatid Properties of Flavonoids. *Oxid Med Cell Longev.* 2017;2017:3789856.
8. Bagchi S, Oniku AE, Topping K, Mamhoud ZN, Paget TA. Programmed cell death in *Giardia*. *Parasitology.* 2012;139(7):894-903.
9. Bolaños V, Díaz-Martínez A, Soto J, Rodríguez MA, López-Camarillo C, Marchat LA, et al. The flavonoid (-)-epicatechin affects cytoskeleton proteins and functions in *Entamoeba histolytica*. *J Proteomics.* 2014;111:74-85.
10. Boreham PFL, Phillips RE, Shepherd RW. Altered uptake of metronidazole in vitro by stocks of *Giardia intestinalis* with different drug sensitivities. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene.* 1988;82(1):104-6.

11. Boucher SE, Gillin FD. Excystation of in vitro-derived *Giardia lamblia* cysts. *Infect Immun*. 1990;58(11):3516-22.
12. Brennand A, Gualdrón-López M, Coppens I, Rigden DJ, Ginger ML, Michels PA. Autophagy in parasitic protists: unique features and drug targets. *Mol Biochem Parasitol*. 2011;177(2):83-99.
13. Castaño J, Giraldo A. Antiparasitic phytotherapy perspectives, scope and current development. *Infectio*. 2019;23:189.
14. Calzada F, Correa-Basurto J, Barbosa E, Mendez-Luna D, Yopez-Mulia L. Antiprotozoal Constituents from *Annona cherimola* Miller, a Plant Used in Mexican Traditional Medicine for the Treatment of Diarrhea and Dysentery. *Pharmacogn Mag*. 2017;13(49):148-52.
15. Camacho C, Hernández MSYunel P, Valdivia Avila A, Rubio Fontanills Y, C. Leticia Fuentes-Alfonso D. Evaluación fitoquímica, antibacteriana y molusquicida de extractos de hojas de *Agave* spp. 2020;32:390-405.
16. Chacín-Bonilla L. [Current pharmacotherapy of amebiasis, advances in new drugs, and design of a vaccine]. *Invest Clin*. 2012;53(3):301-14.
17. Corbin KR, Byrt CS, Bauer S, DeBolt S, Chambers D, Holtum JAM, et al. Prospecting for Energy-Rich Renewable Raw Materials: *Agave* Leaf Case Study. *PLOS ONE*. 2015;10(8):e0135382.
18. Cushnie TP, Lamb AJ. Detection of galangin-induced cytoplasmic membrane damage in *Staphylococcus aureus* by measuring potassium loss. *J Ethnopharmacol*. 2005;101(1-3):243-8.
19. Cushnie TP, Lamb AJ. Recent advances in understanding the antibacterial properties of flavonoids. *Int J Antimicrob Agents*. 2011;38(2):99-107.
20. Di Pietro A, Conseil G, Pérez-Victoria JM, Dayan G, Baubichon-Cortay H, Tromprier D, et al. Modulation by flavonoids of cell multidrug resistance mediated by P-glycoprotein and related ABC transporters. *Cell Mol Life Sci*. 2002;59(2):307-22.
21. da Silva BP, Parente JP. A new bioactive steroidal saponin from *Agave shrevei*. *Z Naturforsch C J Biosci*. 2005;60(1-2):57-62.
22. de Brum Vieira P, Silva NLF, Menezes CB, da Silva MV, Silva DB, Lopes NP, et al. Trichomonocidal and parasite membrane damaging activity of bidesmosic saponins from *Manilkara rufula*. *PLoS One*. 2017;12(11):e0188531.
23. Domingues LF, Botura MB, Cruz AC, Yuki CC, Silva GD, Costa MS, et al. Evaluation of anthelmintic activity of liquid waste of *Agave sisalana* (sisal) in goats. *Rev Bras Parasitol Vet*. 2010;19(4):270-2.
24. Einarsson E, Svärd SG. Encystation of *Giardia intestinalis*—a Journey from the Duodenum to the Colon. *Current Tropical Medicine Reports*. 2015;2(3):101-9.
25. Elmendorf HG, Dawson SC, McCaffery JM. The cytoskeleton of *Giardia lamblia*. *Int J Parasitol*. 2003;33(1):3-28.
26. Erlandsen SL, Bemrick WJ, Wells CL, Feely DE, Knudson L, Campbell SR, et al. Axenic culture and characterization of *Giardia ardeae* from the great blue heron (*Ardea herodias*). *J Parasitol*. 1990;76(5):717-24.
27. Eumkeb G, Chukrathok S. Synergistic activity and mechanism of action of ceftazidime and apigenin combination against ceftazidime-resistant *Enterobacter cloacae*. *Phytomedicine*. 2013;20(3-4):262-9.

28. Fei HR, Chen HL, Xiao T, Chen G, Wang FZ. Caudatin induces cell cycle arrest and caspase-dependent apoptosis in HepG2 cell. *Mol Biol Rep.* 2012;39(1):131-8.
29. Fernandez A, Anand G, FriedenberG F. Factors associated with failure of metronidazole in *Clostridium difficile*-associated disease. *J Clin Gastroenterol.* 2004;38(5):414-8.
30. Fung HB, Doan TL. Tinidazole: a nitroimidazole antiprotozoal agent. *Clin Ther.* 2005;27(12):1859-84.
31. Gadelha AP, Travassos R, Monteiro-Leal LH. The evaluation of a semiautomated computer method to determine the effects of DMSO on *Giardia lamblia*-intestinal cell interaction. *Parasitol Res.* 2007;101(5):1401-6.
32. Ana Paula Rocha G, Marlene Benchimol and Wanderley de S. The Cytoskeleton of *Giardia intestinalis*. In: Alfonso JR-M, editor. *Giardiasis*. Rijeka: IntechOpen; 2017. p. Ch. 5.
33. García Mendoza A, Sandoval D, Torres-García I, Casas A, Elizondo M. *Agave maximiliana*, Lechuguilla View on www.iucnredlist.org THE IUCN RED LIST OF THREATENED SPECIES™. 2019.
34. Gabriel G-R. Boletín Epidemiológico: Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica; Sistema Único de Información. Dirección general epidemiológica. 20121203 ed2023. p. 262-9.
35. Gerbaba TK, Gupta P, Rioux K, Hansen D, Buret AG. *Giardia duodenalis*-induced alterations of commensal bacteria kill *Caenorhabditis elegans*: a new model to study microbial-microbial interactions in the gut. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2015;308(6):G550-61.
36. Gillin FD, Boucher SE, Rossi SS, Reiner DS. *Giardia lamblia*: the roles of bile, lactic acid, and pH in the completion of the life cycle in vitro. *Exp Parasitol.* 1989;69(2):164-74.
37. Güçlü-Ustündağ O, Mazza G. Saponins: properties, applications and processing. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 2007;47(3):231-58.
38. *Giardiasis*. Rijeka: IntechOpen; 2017.
39. Herrera-Ruiz M, Jiménez-Ferrer E, González-Cortazar M, Zamilpa A, Cardoso-Taketa A, Arenas-Ocampo ML, et al. Potential Use of *Agave* Genus in Neuroinflammation Management. *Plants (Basel).* 2022;11(17).
40. Hernández Ceruelos A, Romero-Quezada LC, Ruvalcaba Ledezma JC, López Contreras L. Therapeutic uses of metronidazole and its side effects: an update. *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* 2019;23(1):397-401.
41. Hernández-Cuevas LV, Salinas-Escobar LA, Segura-Castruita MÁ, Palmeros-Suárez PA, Gómez-Leyva JF. Physiological Responses of *Agave maximiliana* to Inoculation with Autochthonous and Allochthonous Arbuscular Mycorrhizal Fungi. *Plants [Internet].* 2023; 12(3).
42. Hoffman Paul S, Sisson G, Croxen Matthew A, Welch K, Harman WD, Cremades N, et al. Antiparasitic Drug Nitazoxanide Inhibits the Pyruvate Oxidoreductases of *Helicobacter pylori*, Selected Anaerobic Bacteria and Parasites, and *Campylobacter jejuni*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy.* 2007;51(3):868-76.

43. Hofštetrová K, Uzlíková M, Tůmová P, Troell K, Svärd SG, Nohýnková E. *Giardia intestinalis*: Aphidicolin influence on the trophozoite cell cycle. *Experimental Parasitology*. 2010;124(2):159-66.
44. Ibáñez-Cervantes G, León-Ávila G, Bello-López JM, Pérez-Rangel A, León-García G, Noguera-Torres B, et al. Changes in the incidence of intestinal giardiasis in Mexican population during five years (2011-2015). *Acta Parasitol*. 2018;63(1):40-7.
45. Jiménez-Ferrer E, Vargas-Villa G, Martínez-Hernández GB, González-Cortazar M, Zamilpa A, García-Aguilar MP, et al. Fatty-Acid-Rich Agave angustifolia Fraction Shows Antiarthritic and Immunomodulatory Effect. *Molecules*. 2022;27(21).
46. Jiang B, Wang X, Wang L, Lv X, Li D, Liu C, et al. Two-Step Isolation, Purification, and Characterization of Lectin from Zihua Snap Bean (*Phaseolus vulgaris*) Seeds. *Polymers (Basel)*. 2019;11(5).
47. Kabala-Dzik A, Rzepecka-Stojko A, Kubina R, Iriti M, Wojtyczka RD, Buszman E, et al. Flavonoids, bioactive components of propolis, exhibit cytotoxic activity and induce cell cycle arrest and apoptosis in human breast cancer cells MDA-MB-231 and MCF-7 - a comparative study. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)*. 2018;64(8):1-10.
48. Kee SC, Nobel PS. Concomitant changes in high temperature tolerance and heat-shock proteins in desert succulents. *Plant Physiol*. 1986;80(2):596-8.
49. Klimova A, Ruiz Mondragón KY, Molina Freaner F, Aguirre-Planter E, Eguarte LE. Genomic Analyses of Wild and Cultivated Bacanora Agave (*Agave angustifolia* var. *pacifica*) Reveal Inbreeding, Few Signs of Cultivation History and Shallow Population Structure. *Plants (Basel)*. 2022;11(11).
50. Kobayashi T, Nakata T, Kuzumaki T. Effect of flavonoids on cell cycle progression in prostate cancer cells. *Cancer letters*. 2002;176(1):17-23.
51. Lagunas-Rangel FA, Yee J, Bermúdez-Cruz RM. An update on cell division of *Giardia duodenalis* trophozoites. *Microbiological Research*. 2021;250:126807.
52. Larocque R, Nakagaki K, Lee P, Abdul-Wahid A, Faubert GM. Oral immunization of BALB/c mice with *Giardia duodenalis* recombinant cyst wall protein inhibits shedding of cysts. *Infect Immun*. 2003;71(10):5662-9.
53. Lauwaet T, Andersen Y, Van de Ven L, Eckmann L, Gillin FD. Rapid detachment of *Giardia lamblia* trophozoites as a mechanism of antimicrobial action of the isoflavone formononetin. *J Antimicrob Chemother*. 2010;65(3):531-4.
54. Lee HS, Tamia G, Song HJ, Amarakoon D, Wei CI, Lee SH. Cannabidiol exerts anti-proliferative activity via a cannabinoid receptor 2-dependent mechanism in human colorectal cancer cells. *Int Immunopharmacol*. 2022;108:108865.
55. Leitsch D. Drug Resistance in the Microaerophilic Parasite *Giardia lamblia*. *Curr Trop Med Rep*. 2015;2(3):128-35.
56. Lenzi J, Costa TM, Filho H, Alberton MD, Goulart JAG, Tavares LBB. Antiprotozoal Activity of Mycelial Extracts of Several Medicinal Agaricomycetes Mushrooms against *Giardia duodenalis*. *Int J Med Mushrooms*. 2022;24(12):37-46.
57. Leung AKC, Leung AAM, Wong AHC, Sergi CM, Kam JKM. Giardiasis: An Overview. *Recent Pat Inflamm Allergy Drug Discov*. 2019;13(2):134-43.
58. Lopes-Oliveira LAP, Fantinatti M, Da-Cruz AM. In vitro-induction of metronidazole-resistant *Giardia duodenalis* is not associated with nucleotide

alterations in the genes involved in pro-drug activation. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2020;115:e200303.

59. Martínez-Ortega EA, López-Briones JS, Rodríguez-Hernández G, Ramírez-Orozco RE, Franco-Robles E. Antibacterial activity of agave fructans against salmonella typhimurium. Natural Product Research. 2020;34(18):2639-41.

60. Moalic S, Liagre B, Corbière C, Bianchi A, Dauça M, Bordji K, et al. A plant steroid, diosgenin, induces apoptosis, cell cycle arrest and COX activity in osteosarcoma cells. FEBS Lett. 2001;506(3):225-30.

61. Morán-Velázquez DC, Monribot-Villanueva JL, Bourdon M, Tang JZ, López-Rosas I, Maceda-López LF, et al. Unravelling Chemical Composition of Agave Spines: News from Agave fourcroydes Lem. Plants (Basel). 2020;9(12).

62. Moron-Soto M, Gutierrez L, Sumano H, Tapia G, Alcala-Canto Y. Efficacy of nitazoxanide to treat natural Giardia infections in dogs. Parasites & vectors. 2017;10(1):52-.

63. Morreeuw ZP, Castillo-Quiroz D, Ríos-González LJ, Martínez-Rincón R, Estrada N, Melchor-Martínez EM, et al. High Throughput Profiling of Flavonoid Abundance in Agave lechuguilla Residue-Valorizing under Explored Mexican Plant. Plants (Basel). 2021;10(4).

64. Nava-Cruz NY, Medina-Morales MA, Martinez JL, Rodriguez R, Aguilar CN. Agave biotechnology: an overview. Crit Rev Biotechnol. 2015;35(4):546-59.

65. Oldfield E, Lin FY. Terpene biosynthesis: modularity rules. Angew Chem Int Ed Engl. 2012;51(5):1124-37.

66. Orestes Guerra J, Meneses A, Simonet AM, Macías FA, Nogueiras C, Gómez A, et al. Saponinas esteroidales de la planta Agave brittoniana (Agavaceae) con actividad contra el parásito Trichomona vaginalis. Revista de Biología Tropical. 2008;56:1645-52.

67. Ortega-Barria E, Ward HD, Keusch GT, Pereira ME. Growth inhibition of the intestinal parasite Giardia lamblia by a dietary lectin is associated with arrest of the cell cycle. J Clin Invest. 1994;94(6):2283-8.

68. Palomo-Ligas L, Estrada-Camacho J, Garza-Ontiveros M, Vargas-Villanueva JR, Gutiérrez-Gutiérrez F, Nery-Flores SD, et al. Polyphenolic extract from Punica granatum peel causes cytoskeleton-related damage on Giardia lamblia trophozoites in vitro. PeerJ. 2022;10:e13350.

69. Peattie DA. The giardins of Giardia lamblia: genes and proteins with promise. Parasitol Today. 1990;6(2):52-6.

70. Pérez-Zavala ML, Hernández-Arzaba JC, Bideshi DK, Barboza-Corona JE. Agave: a natural renewable resource with multiple applications. J Sci Food Agric. 2020;100(15):5324-33.

71. Persaud L, Bheemanahalli R, Seepaul R, Reddy KR, Macoon B. Low- and High-Temperature Phenotypic Diversity of Brassica carinata Genotypes for Early-Season Growth and Development. Front Plant Sci. 2022;13:900011.

72. Poxleitner Marianne K, Dawson Scott C, Cande WZ. Cell Cycle Synchrony in Giardia intestinalis Cultures Achieved by Using Nocodazole and Aphidicolin. Eukaryotic Cell. 2008;7(4):569-74.

73. Puente-Garza CA, Meza-Miranda C, Ochoa-Martínez D, García-Lara S. Effect of in vitro drought stress on phenolic acids, flavonols, saponins, and antioxidant activity in Agave salmiana. Plant Physiol Biochem. 2017;115:400-7.

74. Quintanilla-Licea R, Mata-Cárdenas BD, Vargas-Villarreal J, Bazaldúa-Rodríguez AF, Kavimngeles-Hernández I, Garza-González JN, et al. Antiprotozoal activity against *Entamoeba histolytica* of plants used in northeast Mexican traditional medicine. Bioactive compounds from *Lippia graveolens* and *Ruta chalepensis*. *Molecules*. 2014;19(12):21044-65.
75. Rodríguez García R, Aguilar Ye A, Puig Sosa P, Rodríguez Guzmán LM, Esteban Vaz JE. [Nitazoxanide: adverse effects]. *Salud Publica Mex*. 2004;46(6):496-7.
76. Romero Cabello R, Guerrero LR, Muñoz García MR, Geyne Cruz A. Nitazoxanide for the treatment of intestinal protozoan and helminthic infections in Mexico. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 1997;91(6):701-3.
77. Stover KR, Riche DM, Gandy CL, Henderson H. What would we do without metronidazole? *Am J Med Sci*. 2012;343(4):316-9.
78. Touil YS, Fellous A, Scherman D, Chabot GG. Flavonoid-induced morphological modifications of endothelial cells through microtubule stabilization. *Nutr Cancer*. 2009;61(3):310-21.
79. Toychiev A, Kerimov F, Islamova J, Shaislamova M, Mirzakhmedov M, Davis N, et al. Antiprotozoal effect of steroid hormone 20-hydroxyecdysone in giardiasis patients. *Ann Parasitol*. 2022;68(3):605-15.
80. Xavier FJS, Lira AB, Verissimo GC, de SSFS, de Oliveira Filho AA, de Souza-Fagundes EM, et al. Morita-Baylis-Hillman adducts derived from thymol: synthesis, in silico studies and biological activity against *Giardia lamblia*. *Mol Divers*. 2022;26(4):1969-82.
81. Nitazoxanide: a guide to its use in gastrointestinal infections. *Drugs & Therapy Perspectives*. 2008;24(1):5-8.
82. Verástegui Á, Verde J, García S, Heredia N, Oranday A, Rivas C. Species of *Agave* with antimicrobial activity against selected pathogenic bacteria and fungi. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 2008;24(7):1249-52.
83. Svärd SG, Hagblom P, Palm JE. *Giardia lamblia* -- a model organism for eukaryotic cell differentiation. *FEMS Microbiol Lett*. 2003;218(1):3-7.
84. Shegute T, Wasihun Y. Antibacterial Activity and Phytochemical Components of Leaf Extracts of *Agave americana*. *J Exp Pharmacol*. 2020;12:447-54.
85. Reiner DS, Ankarklev J, Troell K, Palm D, Bernander R, Gillin FD, et al. Synchronisation of *Giardia lamblia*: identification of cell cycle stage-specific genes and a differentiation restriction point. *Int J Parasitol*. 2008;38(8-9):935-44.
86. Ziegler J, Facchini PJ. Alkaloid biosynthesis: metabolism and trafficking. *Annu Rev Plant Biol*. 2008;59:735-69.
87. Xiao J. Dietary flavonoid aglycones and their glycosides: Which show better biological significance? *Crit Rev Food Sci Nutr*. 2017;57(9):1874-905.
88. Qin X, Yang X, Huang X, Jin G, Wu M, Chen T, et al. The complete chloroplast genome of *Agave angustifolia*. *Mitochondrial DNA B Resour*. 2021;6(11):3236-7.
89. Ticona JC, Bilbao-Ramos P, Amesty Á, Flores N, Dea-Ayuela MA, Bazzocchi IL, et al. Flavonoids from *Piper* Species as Promising Antiprotozoal Agents against *Giardia intestinalis*. *Structure-Activity Relationship and Drug-Likeness Studies. Pharmaceuticals (Basel)*. 2022;15(11).
90. Santos JD, Vieira IJ, Braz-Filho R, Branco A. Chemicals from *Agave sisalana* biomass: isolation and identification. *Int J Mol Sci*. 2015;16(4):8761-71.