

CAPÍTULO 7

Giardia lamblia/G. duodenalis/G. intestinalis (parásito intestinal patógeno)

M. Lorena Zonta, Andrea Servián y Graciela T. Navone

Clasificación

Phylum: Sarcomastigophora

Subphylum: Mastigophora

Clase: Zoomastigophora

Orden: Diplomonadida

Familia: Diplomonadidae

Giardia lamblia, también conocida como *G. duodenalis* o *G. intestinalis*, es un protozoo entérico patógeno que infecta a humanos, animales domésticos y silvestres en todo el mundo. Es el principal agente etiológico de la diarrea no viral en humanos y otros mamíferos, enfermedad conocida con el nombre de giardiosis. Habita y se reproduce en la parte superior del intestino delgado (duodeno) adherido al epitelio intestinal con un prominente disco adhesivo ventral. Aunque tiene una distribución cosmopolita, *G. lamblia* es más frecuente en países en desarrollo donde la sanidad es deficiente. Debe tenerse en cuenta también, que la giardiosis puede ser confundida con la enfermedad celíaca y en algunos casos se indica una biopsia duodenal para obtener un diagnóstico diferencial.

Morfología

Los **trofozoítos** presentan forma piriforme, con dos axonemas que le otorgan la simetría bilateral; dos cuerpos curvos de forma cilíndrica llamados "cuerpos medianos" situados en la porción posterior y transversal en el citoplasma. Estos cuerpos son exclusivos del género y también se los suele llamar "cuerpos parabasales, cinetoplastos o cuerpos cromatoides", aunque no son lo mismo. Su función es incierta, si bien se ha sugerido que pueden funcionar como estructuras de sostén o estar involucrados en el metabolismo energético. Poseen dos núcleos con cariosoma (= endosoma) grande y de posición central sin cromatina periférica.

Los trofozoítos están aplanados dorsoventralmente y son convexos en la superficie dorsal. La superficie ventral aplanada tiene un disco adhesivo bilobulado cóncavo, que en realidad es una estructura rígida, reforzada por microtúbulos y cintas fibrosas, rodeadas por un borde de citoplasma estriado, probablemente con función contráctil y flexible, que le ayuda a adherirse al epitelio mucoso intestinal. Poseen ocho flagelos (dos anterolaterales, dos posterolaterales, dos ventrales y dos caudales), todos dirigidos posteriormente, con una porción citoplásmica y otra libre, cuya función es la motilidad del trofozoíto. Cada flagelo se origina en un cinetosoma y su movimiento solo es visible en el trofozoíto vivo. Si bien no hay axostilo, se observa una estructura formada por los axonemas intracitoplasmáticos de los flagelos ventrales y grupos asociados de microtúbulos. Tampoco hay cuerpos de Golgi, lisosomas ni retículo endoplásmico liso. Carecen de mitocondrias, pero poseen mitosomas⁶. El tamaño varía entre 10-20 µm, y el promedio es entre 12-15 µm. El trofozoíto es la forma patógena y se destruye rápidamente en el ambiente (Fig. 1).

Los **quistes** tienen forma ovalada o elíptica. Aquellos que son inmaduros presentan dos núcleos y los quistes maduros cuatro y restos flagelares. Los cuerpos medianos están duplicados con respecto al trofozoíto. El tamaño varía entre 8-19 µm y el promedio es entre 10-12 µm. El quiste es la forma infectante (Fig. 2).

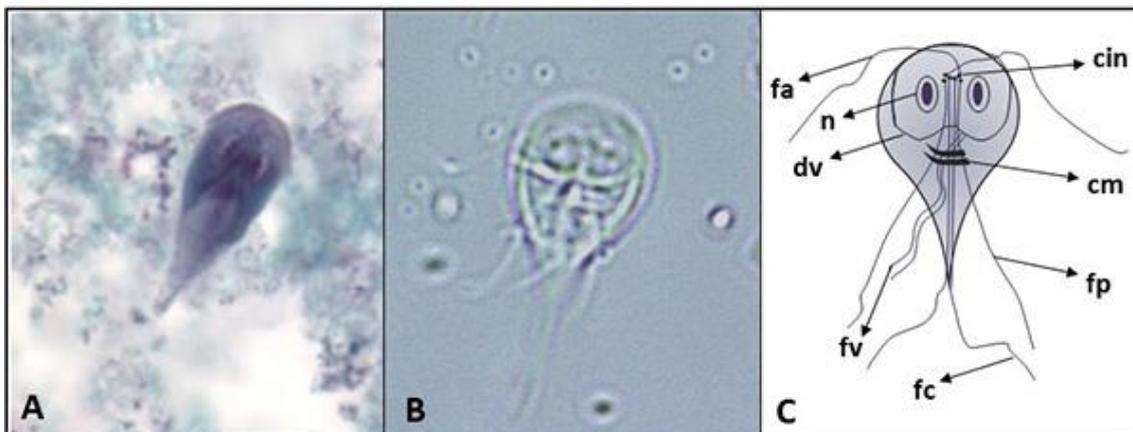


Figura 1. *Giardia lamblia*. (A) Imagen de un trofozoíto con tinción tricrómica. Gentileza de DPDx, Centers for Disease Control and Prevention (<https://www.cdc.gov/dpdx>). (B) Imagen de un trofozoíto sin teñir. (Objetivo 40 X). (C) Esquema de un trofozoíto. Abreviaturas: cin, cinetosomas; cm, cuerpos medianos; dv, disco ventral; fa, flagelos anteriores; fc, flagelos caudales; fp, flagelos posteriores; fv, flagelos ventrales; n, núcleo.

⁶ El mitosoma es una organela citoplasmática presente en algunos organismos eucariotas, generalmente anaerobios o microaerofílicos, que carecen de mitocondrias, como *Entamoeba histolytica* y *Trichomonas vaginalis*.

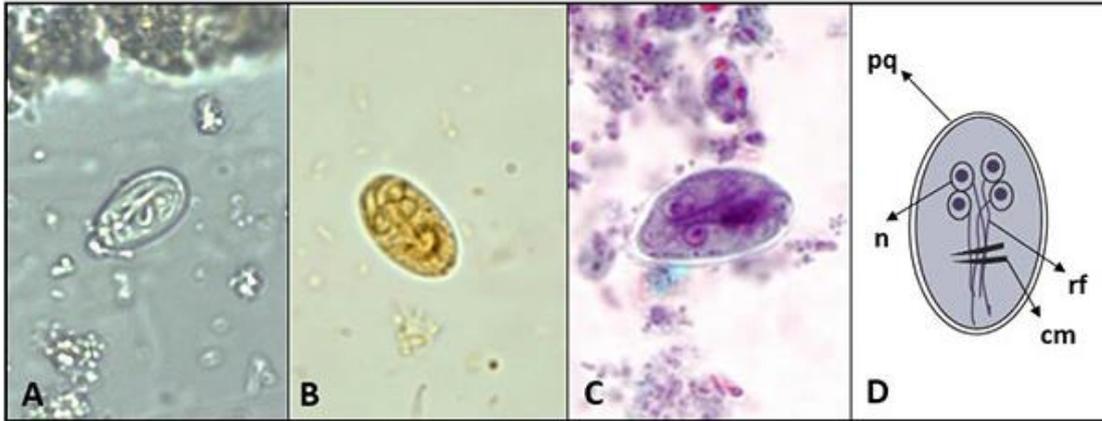


Figura 2. *Giardia lamblia*. **(A)** Imagen de un quiste sin teñir (Objetivo 40 X). **(B)** Imagen de un quiste con solución de lugol. **(C)** Imagen de un quiste con tinción tricrómica. **(B)** y **(C)** Gentileza de DPDx, Centers for Disease Control and Prevention (<https://www.cdc.gov/dpdx>). **(D)** Esquema de un quiste. Abreviaturas: cm, cuerpos medianos; n, núcleo; pq, pared del quiste; rf, restos flagelares.

Caracterización molecular

Los aislamientos de *Giardia lamblia* de diferentes especies hospedadoras no pueden ser distinguidos por su morfología, pero el estudio de diferentes marcadores moleculares ha permitido identificar una gran diversidad genómica en esta especie. Se determinó que dicha diversidad genética se organiza en grupos denominados **ensamblajes** o **genotipos**. Estos ensamblajes se identifican en base al análisis de secuencia de *loci genéticos*⁷ conservados. Actualmente, se reconocen ocho ensamblajes designados de la A a la H. Los ensamblajes A y B son los más generalistas en cuanto a las especies hospedadoras que parasitan, desde humanos hasta perros, gatos, ganado vacuno y otros mamíferos silvestres. El ensamblaje A, que está constituido a su vez de los subgrupos AI y AII, y el ensamblaje B, con los subgrupos BIII y BIV, son los únicos que infectan humanos. Los ensamblajes C y D han sido encontrados en perros, mientras que el E en mamíferos ungulados, el F en gatos y el G en roedores. Por su parte, el ensamblaje H está asociado a infecciones de animales marinos (Lasek-Nesselquist et al., 2010).

⁷ El término *loci genético* refiere a lugares específicos del cromosoma donde está localizado un gen u otra secuencia de ADN.

Ciclo biológico

Los quistes infectivos son expulsados junto con las heces. Al ser ingeridos por un hospedador susceptible (hombre y otros mamíferos), llegan al duodeno donde se disuelve la pared quística, dando lugar a un organismo tetranucleado que se divide inmediatamente en dos trofozoítos binucleados, los cuales viven adheridos a las microvellosidades intestinales por medio de los discos adhesivos. Allí, se reproducen por fisión binaria longitudinal hasta que el contenido intestinal inicia el proceso de deshidratación, momento en el que comienza el enquistamiento del trofozoíto. De esta manera, pierde los flagelos, adquiere forma ovalada, se rodea de una pared quística y finalmente se produce una cariocinesis de los dos núcleos que pasan a ser cuatro y le confieren al quiste el estado de madurez, para liberarse al ambiente con las heces, cerrando así el ciclo vital. Los trofozoítos también pueden ser eliminados con la materia fecal, en general en heces diarreicas, pero no resisten las condiciones ambientales por fuera del hospedador. Los quistes expulsados ya son infectantes, aunque no resisten la desecación ni temperaturas por encima de los 50°C. Sin embargo, en un suelo sombrío los quistes son viables por más de tres meses. Con respecto al agua son resistentes a la cloración y a la filtración en las plantas potabilizadoras por su flexibilidad, no así a la floculación. Se mantienen viables por encima de los dos meses. Los reservorios animales son importantes para la infección en el ser humano.

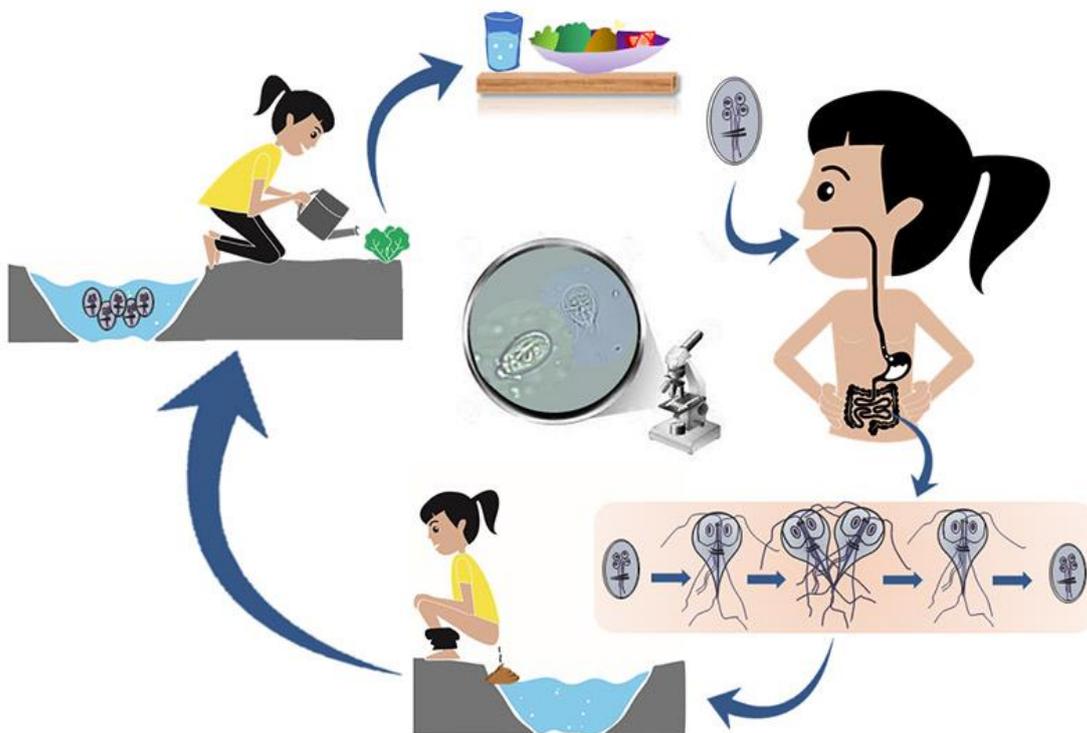


Figura 3. Ciclo de vida de *Giardia lamblia*.

Patogenicidad, sintomatología y tratamiento

La adhesión de *G. lamblia* a las microvellosidades de la mucosa intestinal provoca irritación mecánica y malabsorción de grasas, vitamina A y B12 y azúcares. En las infecciones sintomáticas las heces son diarreicas, acuosas, amarillentas, esteatorreicas (con abundantes grasas). En los pacientes con infección intensa se pueden presentar dolor abdominal, flatulencias, vómitos y pérdida de peso. Aproximadamente el 50% de las infecciones leves pueden cursar en forma asintomática. La mayoría de las infecciones sintomáticas son autolimitadas en duración; especialmente en adultos, sin embargo, algunas personas pueden experimentar una reaparición de los síntomas o desarrollar complicaciones a largo plazo. El periodo de incubación es de 3-25 días (mediana 7-10 días). Una persona con giardiosis puede eliminar 900 millones de quistes/día.

La patología se presenta más en lactantes, niños e inmunocomprometidos. En los niños no es una enfermedad autolimitada, tiende a la cronicidad, pudiendo afectar el crecimiento y estado nutricional por cuanto provoca retardo (retraso) lineal del crecimiento. La infección crónica evoluciona con malestar, lasitud, dolor abdominal difuso, malestar relacionado con la ingesta, y a veces, cefalea. Alternan periodos de diarrea con otros de constipación o hábitos normales. El síndrome de malabsorción (proteínas, lactosa, vitaminas A y B12) es una complicación.

En la leche materna se han aislado elementos antimicrobianos (lisozimas, IgA, interferones y leucocitos) que tendrían acción tóxica sobre los trofozoítos de *G. lamblia*.

La capa de moco del intestino tiene un efecto protector importante, así como una motilidad intestinal importante otorga cierta resistencia a la infección.

Uno de los mecanismos que utiliza *Giardia* sp. para evadir la respuesta inmune del hospedador es la variación de sus antígenos de superficie. Esto es posible debido a que cada trofozoito expresa una sola proteína variable de superficie (VSP), pero frente a la respuesta del hospedador produce el recambio de las VSP, evadiendo el ataque inmunológico y causando infecciones crónicas y/o recurrentes. Investigadores de la Universidad de Córdoba investigaron el mecanismo involucrado en este proceso que logró dilucidar la expresión simultánea en la superficie de *Giardia* sp. de varias o todas las VSPs codificadas en el genoma del parásito. El trabajo desarrollado concluyó en la primera vacuna efectiva generada contra un protozoo y la primera vacuna oral compuesta solo de proteínas solubles (Carranza y Lujan, 2010; Serradell et al., 2016).

La quinacrina (análogo sintético de la quinina) y el albendazol son las drogas de mayor efectividad. Aunque también se recomiendan el metronidazol, el tinidazol, la nitazoxanida y la furazolidona.

Epidemiología

Se trata de una especie de distribución cosmopolita, pero es más frecuente en regiones con climas cálidos y en los países en desarrollo. Se han descrito más de 40 especies de *Giardia*, pero solo cinco se consideran válidas: *G. duodenalis* (= *intestinalis*; = *lamblia*) y *G. muris* de mamíferos, *G. ardeae* y *G. psittaci* de aves y *G. agilis* de anfibios.

La prevalencia de la giardiosis varía entre el 1% y el 60% según la región. En países en desarrollo la prevalencia podría estar subestimada, pero oscila entre el 10% y el 50%, siendo la población infantil la más afectada. En los países desarrollados, varía entre el 2% y el 5%, y los niños de guarderías y residentes de hogares de ancianos constituyen las poblaciones de mayor riesgo (Quispe Gutiérrez, 2017). Estudios llevados a cabo por nuestro grupo de trabajo en diferentes poblaciones de provincias argentinas (Buenos Aires, Chubut, Corrientes, Entre Ríos, Formosa, La Pampa, Mendoza, Misiones y Salta) muestran que las prevalencias de infección de *G. lamblia* varían entre 6,3%-37,7%, presentándose los mayores porcentajes en las provincias del norte argentino, menores valores en el sur y valores intermedios en el centro (Navone et al., 2017; Zonta et al., 2019; Cociancic et al., 2021). En nuestra región, los valores de prevalencia fluctúan entre 17,6%-24% en poblaciones del periurbano productivo y no productivo del Partido de La Plata (Zonta et al., 2016; Cociancic et al., 2020; Falcone et al., 2020). En otras poblaciones de las provincias de Córdoba, Misiones y Tucumán, se reportaron valores de prevalencia entre el 25%-29% (Bracciaforte et al., 2010; Dib et al., 2015; Rivero et al., 2017).

La infección por *Giardia* sp. está directamente relacionada con las condiciones sanitarias y socioeconómicas deficientes de cada población. Con frecuencia se producen brotes por contaminación del agua. De esta manera, es importante resaltar el tratamiento adecuado del agua, ya sea por ebullición, por filtración, desinfección química por cloración u ozonación, como los métodos más eficaces para evitar la propagación de esta especie.

Su incidencia es mayor en niños debido a su predisposición a ingerir alimentos o líquidos infectados. Se estima que unos 280 millones de seres humanos son infectados anualmente por este parásito. Es una parasitosis reemergente y potencialmente zoonótica. Numerosos animales, incluyendo castores, perros, gatos y ovejas, actuarían como reservorios.

El estudio de la posible transmisión zoonótica de la giardiosis se ha profundizado con el empleo de herramientas de diagnóstico molecular que permiten identificar los genotipos asociados. Hasta ahora, sólo los ensamblajes A y B han sido definitivamente asociados con infecciones humanas. Como ambos conjuntos A y B también infectan a los animales, se sospecha que la transmisión zoonótica desempeña un papel en la epidemiología de la giardiosis humana (Sugiyama et al., 2013).

Aunque el ensamblaje A es considerado el genotipo más importante de esta especie involucrado en la infección zoonótica, los datos de genotipificación obtenidos hasta ahora no apoyan ocurrencia generalizada de transmisión zoonótica. Los dos subtipos más comunes de ensamblaje A, A-I y A-II, difieren significativamente en la preferencia de la especie hospedadora. La mayoría de los humanos están infectados con A-II, por el contrario, los animales están mayoritariamente infectados con A-I, aunque hay excepciones a esta observación (Xiao & Fayer, 2008).

Existen pocos estudios que reportan la identificación de los genotipos de *Giardia lamblia* en Argentina. Dos estudios, llevados a cabo en La Plata y General Mansilla de la provincia de

Buenos Aires, identificaron el ensamblaje B como el más prevalente en individuos polisintomáticos⁸ con diarrea y el ensamblaje All, con baja prevalencia en personas oligosintomáticas⁹ sin diarrea. En las provincias de Mendoza y Chaco también se identificaron los genotipos B y el genotipo All, siendo el B el más prevalente (Minvielle et al., 2007; Molina et al., 2011). En estos estudios, solo la fuente de agua doméstica parecía afectar la frecuencia relativa de los genotipos. De hecho, las personas con acceso a agua de pozo presentaban principalmente el genotipo B. Estudios preliminares llevados a cabo por nuestro equipo de trabajo muestran también la presencia de los genotipos A y B en muestras humanas de las regiones de La Plata, el conurbano bonaerense y zonas rurales de la provincia de Misiones y se analizan las asociaciones significativas entre los genotipos y las variables ambientales y socio-culturales evaluadas, como la calidad de la vivienda, las condiciones de saneamiento y el hacinamiento (A Servián, comunicación personal, abril 2021).

Diagnóstico y observación

El diagnóstico en búsqueda de trofozoítos y quistes incluye:

- examen directo en preparaciones húmedas.
- examen a través de técnicas de enriquecimiento (e.g. concentración por sedimentación: formol-acetato de etilo; y por flotación: Willis: solución saturada de cloruro de sodio/ Sheather: solución sobresaturada de sacarosa).
- preparaciones temporarias con solución de yodo (lugol).
- preparaciones permanentes con tinción de hematoxilina-férrica, tricrómica.
- en ciertos casos es recomendable el examen del líquido duodenal y técnicas indirectas de ELISA.
- la reacción de PCR es importante para estudios de fuentes de contaminación, a través de la identificación de los diferentes genotipos.

Es común que los quistes se observen más frecuentemente en heces formes en fresco o concentradas, o en frotis teñidos. Pueden observarse retraídos parcial o totalmente, con un halo entre la membrana externa y el citoplasma en especial en muestras conservadas con formol. Cuando se los observan sin distorsiones, se pueden observar los cuatro núcleos, restos de axonemas y flagelos y los cuatro cuerpos medianos. Los trofozoítos son comunes de observar en preparaciones húmedas y en las heces diarreicas acuosas o blandas. En las preparaciones en fresco es posible observar el movimiento de los trofozoítos semejante al de “una hoja que cae”.

⁸ En este contexto, *polisintomáticos* refiere a individuos portadores de muchos de los síntomas que se relevaron en el estudio, como ser pérdida de apetito, dolor abdominal, trastornos del sueño, debilidad y vómitos.

⁹ En este contexto, *oligosintomáticos* refiere a individuos con pocos síntomas respecto de los relevados en el estudio, como ser sólo debilidad y pérdida de peso.

Los métodos basados en PCR permiten identificar los ensamblajes presentes en muestras clínicas y muestras de agua y alimentos. Estos métodos presentan una mayor sensibilidad de detección que la microscopía, lo que los hace aplicables para detectar un número reducido de quistes de *Giardia* en muestras de heces, agua y alimentos.

Las herramientas moleculares empleadas para la detección de *Giardia* en muestras clínicas y ambientales varían en el gen o genes utilizados, entre ellos, el gen de la subunidad menor del ARN ribosomal (ARNr SSU), el gen de la triosa fosfato deshidrogenasa (TPI) y la betagiardina (β -giardina) son los más utilizados. Las técnicas de amplificación empleadas van desde una PCR convencional, PCR anidada, fragmentos de restricción de longitud polimórfica (RFLP) y secuenciación. El gen de ARNr se usa tradicionalmente para la definición de especies y ensamblajes, mientras que el gen TPI, cuyo locus es más variable, se utiliza con frecuencia para subtipificar muestras clínicas, y el locus GDH, con una tasa de sustitución intermedia entre ellos, tiene un amplio espectro de aplicación (Wielinga et al., 2007).

Referencias

- Ash, R. L., & Orihel, T. C. (2010). Protozoos: *Giardia duodenalis* (= *G. lamblia*). En: Lawrence R. Ash, Thomas C. Orihel. Atlas de Parasitología Humana. Quinta Edición (pp. 81-86). Madrid: Editorial Panamericana
- Bracciaforte, R., Díaz, M. F., Vottero Pivetta, V., Burstein, V., Varengo, H., & Orsilles, M. A. (2010). Enteroparásitos en niños y adolescentes de una comuna periurbana de la provincia de Córdoba. *Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana*, 44(3), 353-358.
- Cacciò, S. M., Thompson, R. A., McLauchlin, J., & Smith, H. V. (2005). Unravelling *Cryptosporidium* and *Giardia* epidemiology. *Trends in Parasitology*, 21(9), 430-437.
- Carranza, P. G., & Lujan, H. D. (2010). New insights regarding the biology of *Giardia lamblia*. *Microbes and Infection*, 12(1), 71-80. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2009.09.008>.
- Center for Disease Control and Prevention (CDC). Recuperado de <https://www.cdc.gov/parasites/giardia/>.
- Cociancic, P., Torrusio, S. E., Zonta, M. L., & Navone, G. T. 2020. Risk factors for intestinal parasitoses among children and youth of Buenos Aires, Argentina. *One Health*, 9, 100116. <https://doi.org/10.1016/j.onehlt.2019.100116>.
- Cociancic, P., Torrusio, S. E., Garraza, M., Zonta, M. L., & Navone, G. T. (2021) Intestinal parasites in child and youth populations of Argentina: environmental factors determining geographic distribution. *Revista Argentina de Microbiología*, 53, 225-232. <https://doi.org/10.1016/j.ram.2020.11.004>.
- Dib, J. F., Fernandez Zenoff, M. V., Oquilla, J., Lazarte, S., & Gonzalez, S. N. (2015). Prevalence of intestinal parasitic infection among children from a shanty town in Tucuman, Argentina. *Tropical Biomedicine*, 32(2), 210-215.

- Falcone, A. C., Zonta, M. L., Unzaga, J. M., & Navone, G. T. (2020). Parasitic risk factors in migrant horticultural families from Bolivia settled in the rural area of La Plata, Buenos Aires, Argentina. *One Health*, 11, 100179. <https://doi.org/10.1016/j.onehlt.2020.100179>.
- Lasek-Nesselquist, E., Welch, D. M., & Sogin, M. L. (2010). The identification of a new *Giardia duodenalis* assemblage in marine vertebrates and a preliminary analysis of *G. duodenalis* population biology in marine systems. *International Journal of Parasitology*, 40(9): 1063-74.
- Mehlhorn, H. (2016). Protozoans Attacking Humans: *Giardia lamblia* (syn. *G. duodenalis*, *G. intestinalis*). En: Heinz Mehlhorn. Human Parasites: Diagnosis, Treatment, Prevention (pp. 27-30). Switzerland: Springer International Publishing.
- Minvielle, M. C., Molina, N. B., Polverino, D., & Basualdo, J. A. (2008). First genotyping of *Giardia lamblia* from human and animal feces in Argentina, South America. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 103(1), 98-103.
- Molina, N., Polverino, D., Minvielle, M., & Basualdo, J. (2007). PCR amplification of triosephosphate isomerase gene of *Giardia lamblia* in formalin-fixed feces. *Revista Latinoamericana de Microbiología*, 49(1-2), 6-11.
- Molina, N., Minvielle, M., Grenovero, S., Salomon, C., & Basualdo, J. (2011). High prevalences of infection with *Giardia intestinalis* genotype B among children in urban and rural areas of Argentina. *Annals of Tropical Medicine & Parasitology*, 105(4), 299-309.
- Monis, P. T., Andrews, R. H., Mayrhofer, G., & Ey, P. L. (1999). Molecular systematics of the parasitic protozoan *Giardia intestinalis*. *Molecular Biology and Evolution*, 16(9), 1135-1144.
- Navone, G. T., Zonta, M. L., Cociancic, P., Garraza, M., Gamboa, M. I., Giambelluca, L. A., Dahinten, S., & Oyhenart, E. E. (2017). Estudio transversal de las parasitosis intestinales en poblaciones infantiles de Argentina. *Revista Panamericana de Salud Pública*, 41, e24.
- Quispe Gutiérrez, A. M. (2017). Chapter 2 Giardiasis Epidemiology. En: Alfonso J. Rodríguez-Morales. Current Topics in Giardiasis (p.p.13-24). London: Intech Open. <https://doi.org/10.5772/intechopen.70338>.
- Rivero, M. R., De Angelo, C., Nuñez, P., Salas, M., Motta, C. E., Chiaretta, A., Salomón O. D., & Liang, S. (2017). Environmental and socio-demographic individual, family and neighborhood factors associated with children intestinal parasitoses at Iguazú, in the subtropical northern border of Argentina. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 11(11), e0006098. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0006098>.
- Roberts, L. S., & Janovy, J. Jr. (2009). Chapter 6 Other Flagellated Protozoa. En: Gerald S Schmidt, Larry S. Roberts'. Foundations of Parasitology (pp.91-94). 8th edition. Boston: McGraw-Hill.
- Saredi, N. (2002). Protozoos: Amebas comensales en el hombre. En: Nélida G. Saredi. SAR Manual Práctico de Parasitología Médica (25-26). 1a. ed. Buenos Aires: Laboratorios Andrómaco.
- Serradell, M., Saura, A., Rupil, L., Gargantini, P. R., Faya, M. I., Furlan, P. J., & Lujan, H. D. (2016). Vaccination of domestic animals with a novel oral vaccine prevents *Giardia* infections, alleviates signs of giardiasis and reduces transmission to humans. *npj Vaccines*, 1, 16018. <https://doi.org/10.1038/npjvaccines.2016.18>.

- Sugiyama, H, Singh, T. S., & Rangsiruji, A. (2013). *Giardia*. En: Liu D, editor. Molecular Detection of Human Parasitic Pathogens (pp. 77-87). Boca Raton: CRC press.
- Wielinga, C. M., & Thompson, R. C. A. (2007). Comparative evaluation of *Giardia duodenalis* sequence data. *Parasitology*, 134(12), 1795-1821.
- World Health Organization. (2019). Bench aids for the diagnosis of intestinal parasites. Second edition. Recuperado en https://www.who.int/intestinal_worms/resources/9789241515344/en/.
- Xiao L., & Fayer R. (2008). Molecular characterization of species and genotypes of *Cryptosporidium* and *Giardia* and assessment of zoonotic transmission. *International Journal for Parasitology*, 38(11), 1239-1255.
- Zonta, M. L., Susevich, M. L., Gamboa, M. I., & Navone, G. T. (2016). Parasitosis intestinales y factores socioambientales: Estudio preliminar en una población de horticultores. *Salud(i)Ciencia*, 21, 814-822. <https://doi.org/10.21840/siic/147782>.
- Zonta, M. L., Cociancic, P., Oyhenart, E. E., & Navone, G. T. (2019). Intestinal parasitosis, undernutrition and socio-environmental factors in schoolchildren from Clorinda Formosa, Argentina. *Revista de Salud Pública*, 21(2), 224-231. <https://doi.org/10.15446/rsap.v21n2.73692>.