UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA AMAZONÍA PERUANA

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

"ACTIVIDAD ANTIMALÁRICA DE LOS EXTRACTOS DE 10 ESPECIES VEGETALES AMAZÓNICAS"

TESIS

Para optar el Título de:

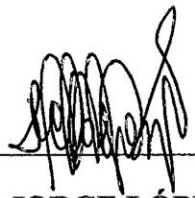
BIÓLOGO

Autor:

RORY NELSON GARCÍA SÁNCHEZ

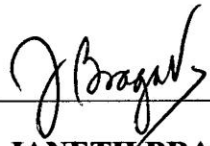
IQUITOS – PERÚ

2003



Dr. JORGE LÓPEZ VÁSQUEZ

PRESIDENTE



Blga. MSc. JANETH BRAGA VELA

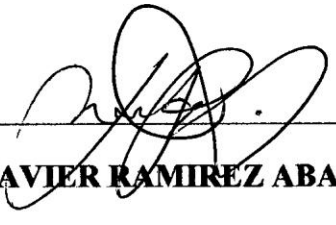
MIEMBRO

Blga. CARMEN REÁTEGUI BARDALES

MIEMBRO

Dra. LASTENIA RUIZ MESIA

ASESORA



Blgo. JAVIER RAMIREZ ABANTO

ASESOR

Dedico este trabajo a mis padres NELSON y NANCY por darme la vida, la oportunidad de ser profesional y convertirme en una persona de bien, a RICHELMY, mi hermano, cuya ausencia terrenal se ha transformado ahora en la compañía permanente dentro de nuestros corazones, a YSABEL, la mujer que amo y que está a mi lado en los momentos buenos y malos, finalmente a ERIC, mi hijo querido, la luz que guiará mi camino.

AGRADECIMIENTOS

- Al Instituto de Investigaciones de la Amazonía Peruana, por la valiosa oportunidad de realizar un trabajo de investigación de las características del presente estudio.
- A la Blga. Elsa Rengifo Salgado investigadora del Instituto de Investigaciones de la Amazonía Peruana, responsable del Proyecto Conjunto UNAP-IIAP "Aprovechamiento sostenible de Plantas Medicinales y Biocidas para Malaria", por la confianza depositada en mi para emprender esta investigación.
- A la Dra. Lastenia Ruiz Mesía, experta en química de productos naturales, responsable del Laboratorio de Productos Naturales "Gabriel de la Fuente Martins" de la Facultad de Ingeniería Química – UNAP, por su confianza en mi, su asesoramiento y apoyo desinteresado en todo momento.
- Al Dr. Eric Deharo, investigador del Institut de Recherche pour le Développement de Francia, por los conocimientos puestos a mi disposición, su continuo asesoramiento y amistad.
- Al Dr. Michel Sauvain, investigador principal del Institut de Recherche pour le Développement de Francia, por su colaboración y la valiosa información proporcionada.
- Al Dr. Alberto Gimenez Turba, Director del Instituto de Investigaciones Fármaco Bioquímicas de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Mayor de San Andrés en la Paz – Bolivia, por la enorme colaboración y disposición para la realización de este estudio, su amistad y sus enseñanzas.
- Al Blgo. Javier Ramírez Abanto, catedrático de la Facultad de Ciencias Biológicas de la UNAP, por su colaboración y asesoramiento.
- A la Srta. Patricia Oporto Carrasco, gran amiga, experta en cultivo in vitro de *Plasmodium falciparum*, quien supo con paciencia proporcionarme los conocimientos necesarios para el manejo de las técnicas.
- A la Srta. Grace Ruiz, excelente compañera de trabajo, experta en el manejo de *Plasmodium* de Roedores, quien a pesar de mis limitaciones logró adiestrarme en el manejo de las técnicas.

ÍNDICE GENERAL

JURADOS Y ASESORES..... i

DEDICATORIA..... ii

AGRADECIMIENTOS..... iii

ÍNDICE GENERAL..... iv

ÍNDICE DE CUADROS Y TABLAS..... xii

ÍNDICE DE FIGURAS..... xiii

I INTRODUCCIÓN..... 16

II FUNDAMENTO TEÓRICO..... 19

2.1 SITUACIÓN DE LA MALARIA EN EL MUNDO..... 19

2.2 LA MALARIA EN EL PERÚ Y LA REGIÓN LORETO..... 24

2.3 LOS PLASMODIUM EN HUMANOS..... 27

2.3.1. CICLO EVOLUTIVO DE LOS PLASMODIUM EN HUMANOS..... 27

2.3.1.1. Ubicación Taxonómica..... 27

2.3.2. CARACTERÍSTICAS DE LOS PLASMODIUM EN HUMANOS..... 33

2.3.2.1. *Plasmodium vivax*..... 33

2.3.2.2. *Plasmodium ovale*..... 34

2.3.2.3. *Plasmodium malariae*..... 34

2.3.2.4. *Plasmodium falciparum*..... 35

2.4 LOS PLASMODIUM EN ROEDORES..... 36

2.4.1. CARACTERÍSTICAS DE LOS PLASMODIUM EN ROEDORES..... 37

2.4.1.1. *Plasmodium vinckei*..... 37

2.4.1.2. *Plasmodium chabaudi*..... 38

2.4.1.3. *Plasmodium berghei*..... 38

2.4.1.4. *Plasmodium yoelii*..... 38

2.5 TÉCNICAS PARA LA EVALUACIÓN DE ACTIVIDAD ANTIMALÁRICA..... 38

2.5.1. TÉCNICAS *IN VITRO*..... 38

2.5.1.1. Cultivo de Estadíos Intraeritrocitarios de *Plasmodium falciparum*..... 40

2.5.1.1.1. Descongelación..... 41

2.5.1.1.2. Congelación..... 42

2.5.1.2. Método Visual para la Evaluación de la Actividad Antimalárica In Vitro de Productos Naturales y /o de Síntesis. 42

2.5.1.3. Test de Inhibición de la Biomineralización de la Ferroprotoporfirina IX (FBIT)..... 44

2.5.2. TÉCNICAS *IN VIVO*..... 45

2.5.2.1 Mantenimiento de las cepas..... 46

2.5.2.2. Evaluación de la Actividad Antimalárica In Vivo Mediante el Test Supresivo de 4 Días o "Test de Peters"..... 46

2.6 PRODUCTOS NATURALES ANTIPALÚDICOS EN AMÉRICA LATINA..... 46

2.6.1 SELECCIÓN DE PLANTAS MEDICINALES..... 46

2.6.2 ALCALOIDES..... 47

2.6.3 COMPUESTOS GRASOS..... 50

2.6.4 TERPENOS..... 51

III MATERIALES Y MÉTODOS..... 53

3.1. MATERIALES..... 53

3.1.1 PREPARACIÓN DE LOS EXTRACTOS HIDROALCOHÓLICOS..... 53

3.1.1.1 Material Biológico..... 53

3.1.1.2 Materiales de Vidrio..... 53

3.1.1.3 Otros Materiales..... 53

3.1.1.4 Reactivos Químicos..... 53

3.1.1.5 Equipos..... 53

3.1.2 EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMALÁRICA IN VITRO MEDIANTE EL TEST DE INHIBICIÓN DE LA BIOMINERALIZACIÓN DE LA FERROPROTOPORFIRINA IX (FBIT)..... 53

3.1.2.1 Material Biológico..... 53

3.1.2.2 Materiales de Plástico..... 54

3.1.2.3 Otros Materiales..... 54

3.1.2.4 Reactivos Químicos..... 54

3.1.2.5 Equipos..... 54

3.1.3 CULTIVO DE LOS ESTADÍOS INTRAERITROCITARIOS DE *Plasmodium falciparum* Y EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMALÁRICA IN VITRO..... 54

3.1.3.1 Material Biológico..... 54

3.1.3.2 Materiales de Vidrio..... 55

3.1.3.3 Materiales de Plástico..... 55

3.1.3.4 Otros Materiales..... 55

3.1.3.5 Reactivos Químicos..... 55

3.1.3.6 Equipos..... 56

3.1.4 MANTENIMIENTO DE LA CEPA DE *Plasmodium berghei* Y EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMALÁRICA IN VIVO..... 57

3.1.4.1 Material Biológico..... 57

3.1.4.2 Materiales de Vidrio..... 57

3.1.4.3 Materiales de Plástico..... 57

3.1.4.4 Otros Materiales..... 57

3.1.4.5 Reactivos Químicos..... 57

3.1.4.6 Equipos..... 58

3.1.5 FRACCIONAMIENTO DEL EXTRACTO DE *Geissospermun reticulatum*..... 58

3.1.5.1 Material Biológico..... 58

3.1.5.2 Materiales de Vidrio..... 58

3.1.5.3 Otros Materiales..... 58

3.1.5.4 Reactivos Químicos..... 58

3.1.5.5 Equipos..... 59

3.2. MÉTODOS..... 60

3.2.1 PRESELECCIÓN Y SELECCIÓN DE LAS ESPECIES..... 60

3.2.2 COLECTA Y PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS..... 60

3.2.3 PREPARACIÓN DE LOS EXTRACTOS HIDROALCOHÓLICOS..... 61

3.2.4 EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMALÁRICA IN VITRO MEDIANTE EL TEST DE INHIBICIÓN DE LA BIOMINERALIZACIÓN DE LA FERROPROTOPORFIRINA IX (FBIT)..... 64

3.2.5 CULTIVO DE LOS ESTADÍOS INTRAERITROCITARIOS DE *Plasmodium falciparum* Y EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMALÁRICA IN VITRO..... 66

3.2.5.1 Cultivo de los Estadíos Intraeritrocitarios de *Plasmodium falciparum* (Cepa F–32, Cloroquina Sensible)..... 66

3.2.5.1.1 Preparación del material biológico..... 66

3.2.5.1.1.1 Glóbulos rojos lavados..... 66

3.2.5.1.1.2 Suero humano descomplementado..... 66

3.2.5.1.1.3 Medio RPMI-1640 (Roswell Park Memorial Institute)..... 67

3.2.5.1.2 Descongelación..... 67

3.2.5.1.3 Adaptación al cultivo..... 69

3.2.5.1.4 Congelación..... 71

3.2.5.2 Evaluación de la Actividad Antimalárica In Vitro Contra *Plasmodium falciparum* (Cepa F–32, Cloroquina Sensible)..... 73

3.2.5.2.1 Sincronización (concentración de parásitos en el estadío de anillo)..... 73

3.2.5.2.2 Evaluación de la actividad antimalárica in vitro mediante el método visual..... 75

3.2.5.2.2.1 Preparación de las soluciones de extractos hidroalcohólicos..... 74

3.2.5.2.2.2 Preparación de la placa..... 74

3.2.5.2.2.3 Realización del frotis..... 76

3.2.5.2.3 Determinación de la IC_{50}..... 77

3.2.6 CULTIVO DE LOS ESTADÍOS INTRAERITROCITARIOS DE *Plasmodium berghei* Y EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMALÁRICA IN VIVO 79

3.2.6.1 Cultivo de los Estadíos Intraeritrocitarios de *Plasmodium berghei* (Cepa NK–65)..... 79

3.2.6.1.1 Descongelación de la cepa a partir de sangre infectada congelada..... 79

3.2.6.1.2 Mantenimiento in vivo de la cepa..... 80

3.2.6.1.3 Congelación de la cepa..... 81

3.2.6.2 Evaluación de la Actividad Antimalárica In Vivo Contra *Plasmodium berghei* (Cepa NK–65), Test Supresivo de 4 días o "Test de Peters"..... 82

3.2.6.2.1 Cálculo del volumen y preparación de la suspensión de sangre parasitada para infectar los ratones..... 82

3.2.6.2.2 Cálculo del volumen y preparación de las suspensiones de extractos..... 85

3.2.6.2.3 Infección y administración de las drogas..... 88

3.2.6.2.4 Determinación de los porcentajes de inhibición.... 89

3.2.7 FRACCIONAMIENTO DE *Geissospermun reticulatum*

3.2.7.1 Extracto Hexánico..... 90

3.2.7.2 Extracto Acetato de Etilo..... 90

3.2.7.3 Extracto Etanólico..... 90

3.2.7.4. Extractos Alcaloidales..... 91

3.2.7.4.1 Extracto alcaloidal ácido pH 2..... 91

3.2.7.4.2 Extracto alcaloidal básico pH 10..... 91

3.2.7.4.3 Extracto alcaloidal de bases cuaternarias..... 91

3.2.8 EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMALÁRICA IN VITRO DE LAS FRACCIONES OBTENIDAS DE *Geissospermun reticulatum*..... 92

IV RESULTADOS..... 93

4.1 EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMALÁRICA IN VITRO MEDIANTE EL TEST DE INHIBICIÓN DE LA BIOMINERALIZACIÓN DE LA FERROPROTOPORFIRINA IX (FBIT)..... 93

4.2 EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMALÁRICA IN VITRO CONTRA *Plasmodium falciparum* (CEPA F–32, CLOROQUINA SENSIBLE)..... 94

4.3 EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMALÁRICA IN VIVO CONTRA *Plasmodium berghei* (CEPA NK – 65), TEST SUPRESIVO DE 4 DÍAS O "TEST DE PETERS"..... 95

4.4 EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMALÁRICA IN VITRO CONTRA *Plasmodium falciparum* y EL TEST DE INHIBICIÓN DE LA BIOMINERALIZACIÓN DE LA FERROPROTOPORFIRINA (FBIT) DE LAS FRACCIONES DE *Geissospermun reticulatum*..... 98

V DISCUSIÓN..... 99

VI CONCLUSIONES..... 107

VII RECOMENDACIONES..... 109

VIII RESUMEN..... 110

IX REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... 111

ANEXOS

ANEXO I : PREPARACIÓN DE SOLUCIONES DIVERSAS..... 119

1.1 BUFFER ACETATO DE SODIO..... 119

1.2 SOLUCIONES DE DESCONGELACIÓN..... 119

1.2.1 Solución A: Cloruro de Sodio al 12%..... 119

1.2.2 Solución B: Cloruro de Sodio al 1.6 %..... 119

1.2.3 Solución C: Cloruro de Sodio 0.9 %, Dextrosa 0.2 %..... 119

1.3 SOLUCIÓN DE CONGELACIÓN..... 119

1.4 SOLUCIÓN DE SINCRONIZACIÓN..... 120

1.5 SOLUCIÓN MADRE GIEMSA..... 120

1.6 BUFFER FOSFATO..... 120

1.7 ANTICOAGULANTE ACD (ÁCIDO CÍTRICO, CITRATO Y DEXTROSA)..... 120

ANEXO II : CÁLCULO DE LA IC_{50}..... 121

ANEXO III : EJEMPLO PARA LA EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMALÁRICA IN VIVO DE UN EXTRACTO CONTRA *PLASMODIUM BERGHEI* MEDIANTE EL "TEST SUPRESIVO DE 4 DÍAS O TEST DE PETERS" A UNA DOSIS DE 250 MG/KG 122

ANEXO IV : CARACTERÍSTICAS DE LAS 10 ESPECIES VEGETALES SELECCIONADAS PARA LA EVALUACIÓN DE ACTIVIDAD ANTIMALÁRICA..... 126

ÍNDICE DE CUADROS Y TABLAS

Cuadro Nro. 1 : Actividad antimalárica *in vitro* en el Test de Inhibición de la Biomineralización de la Ferroprotoporfirina IX (FBIT) de 10 extractos hidroalcohólicos de plantas de la amazonía peruana..... 93

Cuadro Nro. 2 : Actividad antimalárica *in vitro* contra *Plasmodium falciparum* cepa F-32 cloroquina sensible, de 10 extractos hidroalcohólicos de plantas de la amazonía peruana..... 94

Cuadro Nro. 3 : Actividad Antimalárica *in vivo* contra *Plasmodium berghei* cepa NK-65, en el Test Supresivo de 4 días o "Test de Peters", de 10 extractos hidroalcohólicos de plantas de la amazonía peruana..... 95

Cuadro Nro. 4 : Cuadro comparativo de las especies que mostraron actividad antimalárica *in vitro* y/o *in vivo*..... 97

Cuadro Nro. 5 : Actividad Antimalárica *in vitro* en el Test de Inhibición de la Biomineralización de Ferroprotoporfirina IX y contra *Plasmodium falciparum* cepa F-32 cloroquina sensible, de las fracciones obtenidas de *Geissospermun reticulatum*..... 98

Tabla Nro. 1 : Plantas seleccionadas para la evaluación de actividad antimalárica *in vivo* e *in vitro*..... 63

INDICE DE FIGURAS

Figura 1	:	Mosquito hembra del género *Anopheles* (vector de la malaria), alimentándose de sangre humana.....	20
Figura 2	:	Mapa de distribución de la malaria en el mundo.....	22
Figura 3	:	Mapa de distribución de la malaria en el Perú.....	24
Figura 4	:	Ciclo evolutivo de los *Plasmodium* en humanos: a) fase sexual en el insecto, b) fase asexual en el vertebrado.....	28
Figura 5	:	Centenares de ooquistes adheridos a la pared externa del estómago del mosquito.....	30
Figura 6	:	Esporozoitos siendo liberados de los ooquistes. Estos se alojarán luego en las glándulas salivales del mosquito.....	30
Figura 7a	:	Complejo apical del merozoito.....	32
Figura 7b	:	Merozoito invadiendo un glóbulo rojo.....	32
Figura 8	:	Características diferenciales de las 4 especies de *Plasmodium* en humanos en su fase eritrocitaria.....	35
Figura 9	:	Mapa de ubicación de las zonas donde se descubrieron las especies de *Plasmodium* en roedores	37
Figura 10	:	Ciclo biológico intraeritrocitario de *Plasmodium falciparum*.....	41
Figura 11	:	Frotis teñido con Giemsa observado al microscopio con objetivo de 100 X. Se observa la presencia de estadíos jóvenes de *Plasmodium falciparum*.....	43
Figura 12	:	Señalado con las flechas se observan pequeños cúmulos de hemozoina diseminados en el citoplasma de glóbulos rojos parasitados.....	44

Figura 13	:	Representación gráfica de la ruta metabólica de la hemoglobina.....	45
Figura 14	:	Quinina, alcaloide quinolínico aislado de especies del género *Cinchona*.....	48
Figura 15	:	Tubulosina, alcaloide indólico aislado de especies de género *Pogonopus* y *Strychnos*.....	49
Figura 16	:	Krukovina, alcaloide aislado de *Abuta grandifolia*.....	50
Figura 17	:	Quinolinas substituidas en 2.....	50
Figura 18	:	Sergeolido aislado de *Picrolemma pseudocoffea*.....	51
Figura 19	:	Glaucarubinona, terpeno aislado de *Simarouba amara*.....	52
Figura 20	:	Gedunina, terpenoide aislado de *Cedrela odorata*.....	52
Figura 21	:	Eliminación del solvente de los extractos hidroalcohólicos mediante rotaevaporación al vacío...	61
Figura 22	:	Localización de las zonas de colecta de las muestras en Iquitos.....	62
Figura 23	:	Esquema de la metodología del Test de Inhibición de la Biomineralización de la Ferroprotoporfirina IX.....	65
Figura 24	:	Esquema de la técnica de descongelación.....	68
Figura 25	:	Cambio de medio del cultivo continuo en caja petri de *Plasmodium falciparum*.....	69
Figura 26	:	Desecador o candel jar conteniendo cajas petri y placas de 96 pozos con cultivo de *Plasmodium falciparum*. La atmósfera de microaerofilia es proporcionada al consumirse la llama de la vela que está en su interior.....	70
Figura 27	:	Esquema de la técnica de congelación.....	72
Figura 28	:	Esquema de la técnica de sincronización.....	73

Figura 29	:	Llenado de la placa de 96 pozos con la suspensión de glóbulos rojos parasitados.....	75
Figura 30	:	Esquema de distribución de los extractos en la placa de 96 pozos.....	75
Figura 31	:	Estufa básica con el desecador en su interior conteniendo los cultivos de *P. falciparum*.....	76
Figura 32	:	Esquema detallado para la realización de un frotis a partir de sedimento globular o sangre total.....	77
Figura 33	:	Esquema de la técnica de descongelación de sangre total de ratones parasitados con *Plasmodium berghei*.....	79
Figura 34	:	Esquema de la técnica de mantenimiento in vivo de la cepa de *Plasmodium berghei*.....	80
Figura 35	:	Esquema de la técnica de congelación de sangre total de ratones parasitados con *Plasmodium berghei*.....	81
Figura 36 a	:	Material de numeración.....	82
Figura 36 b	:	Cámara de Thoma.....	82
Figura 37 a	:	Formación de los grupos de ratones colocados en las cubetas de acuerdo al peso promedio.....	85
Figura 37 b	:	Distribución de las cubetas en la sala de infección....	86
Figura 38	:	Técnica para la inoculación por vía intraperitoneal de la suspensión globular de sangre parasitada y de las suspensiones de droga.....	88
Figura 39	:	Preparación de extractos alcaloidales de *Geissospermun reticulatum* mediante extracción por partición utilizando peras de decantación.....	92

I INTRODUCCIÓN

La malaria es una enfermedad parasitaria transmitida a través de la picadura del mosquito hembra del género *Anopheles* y causada por protozoos de género *Plasmodium*, los cuales infectan al ser humano y al insecto alternadamente.

Esta enfermedad, catalogada actualmente como una de las más importantes enfermedades infecciosas a nivel mundial, se ha convertido en un grave problema de salud pública que afecta a poblaciones enteras, provoca la muerte de alrededor de 2 millones de personas y se conoce que entre 300 a 500 millones de casos clínicos se registran cada año en el mundo. Esto se debe principalmente a que la mayoría de la población mundial, está distribuida en zonas altamente endémicas, que corresponden a zonas tropicales y subtropicales del planeta. (CYTED, 2000).

En el Perú, según datos proporcionados por la Oficina General de Estadística e Informática del Ministerio de Salud y la Organización Mundial de la Salud, en 1999 se registraron un total de 212599 casos confirmados (OPS - MPS, 1999). En el departamento de Loreto entre el 2000 y el 2001 se registraron un total de 65956 casos confirmados de los cuales 17116 fueron por *Plasmodium falciparum* (DISA-LORETO, 2001).

La situación de la malaria en el mundo tropical se agrava cada año por tres razones principales: a) la disminución de los esfuerzos de lucha contra la malaria en muchos países debido a la crisis económica, así como al precio de los medicamentos antimaláricos, fuera del alcance de las poblaciones que viven en zonas endémicas, b) el desarrollo de resistencia de los vectores a los insecticidas por el mal uso de estos químicos en la agricultura en regiones endémicas y c) la expansión de la resistencia del parásito a la cloroquina y a la mayoría de otros antipalúdicos utilizados.

Desafortunadamente las perspectivas de una vacuna ideal no son inmediatas y el control de la malaria se basa esencialmente en medicamentos antipalúdicos. Existen varios medicamentos eficaces contra la malaria, sin embargo, las personas infectadas deben recibirlos tres o cuatro veces por año, y la mayoría de ellas no tienen dinero suficiente para pagar este tratamiento; sin contar el hecho de que en muchos lugares son insuficientes y que principalmente los niveles de reacciones adversas que presentan, son en algunos casos inaceptables y en regiones donde la

infección es endémica, como en la amazonía, se han diseminado cepas de *Plasmodium falciparum* resistentes a la cloroquina, actualmente el antimalárico más usado y a la sulfadoxina/pirimetamina, en algunas regiones de África donde aumentó el empleo de esa combinación de medicamentos.

La investigación médica y farmacéutica contra las grandes enfermedades parasitarias (malaria, leishmaniasis, tripanosomiasis, etc.), ha disminuido desde hace varios años en casi todas las empresas farmacéuticas internacionales. En Europa y América del Norte se dedica escasa atención a la malaria, dado que esta enfermedad no es un problema de salud pública importante en sus países, además de la vida comercial muy corta de los medicamentos antipalúdicos a causa del rápido establecimiento de la resistencia y a los bajos ingresos económicos provenientes de la venta de estos medicamentos.

Los antimaláricos actualmente utilizados en nuestro sistema de salud son producto de esa escasa investigación desarrollada por otras naciones. Descubrimos entonces que la dependencia en la provisión de sustancias activas contra la malaria se torna crítica. Esto empeora al no existir una línea de investigación en nuestro país orientada a la búsqueda, obtención y validación de nuevos agentes antimaláricos, lo cual muestra la imperiosa necesidad de establecer una línea de investigación prioritaria en nuevos fármacos con estructuras originales accesibles a las poblaciones afectadas, que en su mayor parte son de escasos recursos.

En nuestra basta flora amazónica, existe un gran número de especies utilizadas de modo tradicional por el poblador de la región para el tratamiento de diversas enfermedades, incluyendo la malaria. En tal sentido la información etnobotánica disponible proporciona una larga lista de especies vegetales utilizadas como antimaláricos, lo cual nos da grandes posibilidades de encontrar nuevos compuestos con la capacidad de brindar una alternativa para el tratamiento de esta enfermedad.

Por las razones mencionadas, el presente trabajo de investigación tiene como objetivo determinar la actividad antiplasmodial de los extractos de 10 especies vegetales amazónicas, en modelo *in vitro* mediante el Test de Inhibición de la Biomineralización de la Ferroprotoporfirina IX y contra la cepa F-32 cloroquina sensible de *Plasmodium falciparum* e *in vivo* contra la cepa NK-65 de

Plasmodium berghei, así como también fraccionar uno de los extractos activos y evaluar la actividad in vitro en el Test de Inhibición de la Biomineralización de la Ferroprotoporfirina IX y contra la cepa F-32 cloroquina sensible de *Plasmodium falciparum*, de cada una de las fracciones.

II FUNDAMENTO TEÓRICO

2.1 SITUACIÓN DE LA MALARIA EN EL MUNDO

La malaria es una enfermedad que afecta aproximadamente al 46% de la población mundial (TRIGG & KONDRACHINE, 1999). Seguida de la TBC y el SIDA, es responsable de la muerte de 1 a 2 millones de personas todos los años. (WORLD HEALT ORGANIZATION, 2000). Ampliamente distribuida en el mundo entero, la malaria se confina ahora principalmente en África, Asia y América Latina. Los problemas para controlar la malaria en estos países se agravan por la inadecuada infraestructura de salud y la pobre condición socioeconómica de sus habitantes. La situación se ha puesto aún más compleja durante los últimos años con el aumento de la resistencia a las drogas comúnmente usadas para combatir al parásito causante de la enfermedad (WORLD HEALT ORGANIZATION).

De las cuatro especies de protozoarios causantes de la enfermedad en todas sus formas, *Plasmodium falciparum* es el más extendido y peligroso. Puede mostrar un cuadro clínico muy variado que incluye escalofríos, fiebre, sudoración, tos, diarrea, dificultad respiratoria, cefalalgia, y sin tratamiento puede evolucionar hasta llegar a mostrar ictericia, defectos de coagulación, shock, insuficiencia renal y hepática, encefalopatía aguda, edema pulmonar y cerebral producida por los glóbulos rojos infectados que obstruyen los vasos sanguíneos del cerebro, coma y muerte. Las recaídas verdaderas después de períodos sin parasitemia pueden surgir a intervalos regulares. Las infecciones palúdicas pueden persistir toda la vida, con crisis febriles recurrentes (WORLD HEALT ORGANIZATION).

Los parásitos de la malaria se transmiten de una persona enferma a otra sana a través de la picadura del mosquito hembra del género *Anopheles* (**Figura 1**). Existe aproximadamente 380 especies de mosquitos del género *Anopheles*, pero sólo 60 pueden transmitir el parásito y entre estas especies la sensibilidad a los insecticidas es muy variable (WORLD HEALT ORGANIZATION).

Figura 1 : Mosquito hembra del género *Anopheles* (vector de la malaria), alimentándose de sangre humana.

La malaria se diagnostica a través de los síntomas clínicos propios de la enfermedad y del examen microscópico de gota gruesa o frotis de sangre. Normalmente se puede curar con medicamentos y los síntomas: escalofríos, fiebre, sudoración, dolor de cabeza y de las articulaciones, desaparecen rápidamente una vez que se elimina el parásito. En ciertas regiones, sin embargo, los parásitos han desarrollado **resistencia** a ciertos antimaláricos, particularmente a la cloroquina. Los pacientes en estas áreas requieren el tratamiento con otras drogas más caras. En los casos donde la enfermedad es severa, incluyendo la malaria cerebral, se requiere de hospitalización (WORLD HEALT ORGANIZATION).

En regiones endémicas donde el índice de transmisión es muy alto, las personas que se infectan continuamente desarrollan gradualmente cierta inmunidad a la enfermedad, mientras tanto los niños permanecen vulnerables, así como las mujeres embarazadas, por el hecho de que los mecanismos de defensa del organismo se encuentran disminuidos durante el embarazo (WORLD HEALT ORGANIZATION).

La malaria ha sido conocida desde tiempos inmemoriales, siglos antes de que la verdaderas causas fueran comprendidas. Antiguamente, se pensó que el "miasma" (mal aire "mal-air-ia") causaba la enfermedad. Sorprendentemente por ello, algunos antiguos tratamientos eran notablemente eficaces. Los últimos 2000 años en China, se ha usado la infusión del gingchao (*Artemisia annua*) para el tratamiento de la malaria, su compuesto activo, la artemisina, se ha identificado

científicamente hace sólo unos pocos años. Las propiedades antifebriles de la corteza de *Cinchona ledgeriana* fueron conocidas en el Perú antes del siglo XV. La quinina, el compuesto activo de esta planta, fue aislado por primera vez en 1820 (WORLD HEALT ORGANIZATION).

El control sistemático de la malaria empezó después del descubrimiento del parásito por Laveran en 1889 (por lo que recibió el Premio Nóbel de medicina en 1907), y la demostración por Ross en 1897 que el mosquito era el vector de la enfermedad. Estos descubrimientos llevaron rápidamente a diseñar estrategias para controlar la enfermedad y con la invención del DDT durante la Segunda Guerra Mundial, se intentó su erradicación global. Además, durante este periodo se sintetizaron drogas eficaces y baratas del grupo de la cloroquina (WORLD HEALT ORGANIZATION).

La esperanza de erradicar totalmente la malaria fue finalmente abandonada en 1969 cuando se reconoció que esto era improbable que se lograse alguna vez. Los programas de control continuados permanecen esencialmente en las áreas endémicas (WORLD HEALT ORGANIZATION).

La malaria es actualmente endémica en 91 países con pequeñas tasas de transmisión y su distribución varía enormemente de país a país y dentro de ellos mismos. *Plasmodium falciparum* es el parásito predominante. Más de **120 millones de casos clínicos** y alrededor de **1 millón de muertes** ocurren en el mundo cada año por su causa (WORLD HEALT ORGANIZATION).

Ochenta por ciento de los casos ocurren en África tropical, donde la malaria cuenta con el 10% al 30% del total de admisiones a los hospitales y es responsable del 15% al 25% de todas las muertes de niños menores de 5 años. Alrededor de 800,000 niños menores de cinco años mueren debido a la malaria todos los años, haciendo de esta enfermedad una de las mayores causas de mortalidad infantil y juvenil. Las mujeres embarazadas también están en riesgo ya que la enfermedad es responsable de un número sustancial de abortos y de nacimientos de bebés con bajo peso (WORLD HEALT ORGANIZATION).

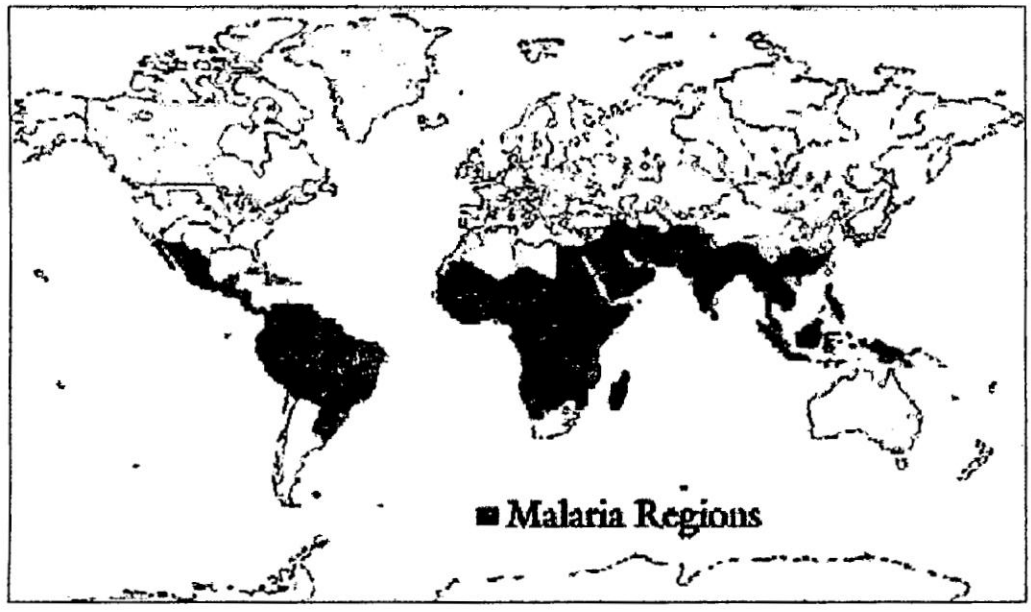


Figura 2 : Mapa de distribución de la malaria en el mundo.

En 1990, 75% de los casos reportados fuera de África fueron concentrados en 9 países: India, Brasil, Afganistán, Sri Lanka, Tailandia, Indonesia, Vietnam, Camboya y China (WORLD HEALT ORGANIZATION).

La malaria tiene de esta manera consecuencias sociales y es una carga pesada en el desarrollo económico. Se estima que un solo brote de malaria cuesta una suma equivalente a más de 10 días de trabajo en África. El costo del tratamiento está entre $US 0.08 y $US 5.30 según el tipo de drogas prescritas y la resistencia local a las mismas. En 1987, el "costo" total de la malaria - el cuidado de la salud, tratamiento, pérdida de la producción, etc., fue estimado en $US 800 millones para África tropical y se estima actualmente en más de $US 1,800 millones (WORLD HEALT ORGANIZATION).

La importancia de malaria como un problema de salud está aumentando en muchas partes del mundo. Las epidemias están ocurriendo incluso alrededor de las zonas tradicionalmente endémicas en áreas dónde la transmisión había sido eliminada. Estos brotes son generalmente asociados con las condiciones sociales y económicas deterioradas, y las víctimas principales son las poblaciones rurales más pobres. Las presiones demográficas, económicas y políticas obligan a poblaciones enteras (obreros temporales, tribus nómadas y agricultores que emigran a áreas urbanas recientemente desarrolladas o de agricultura y economía

en desarrollo) dejar las áreas libres de malaria y pasar a las zonas endémicas. Las personas que no son inmunes están en alto riesgo de una severa enfermedad. Desgraciadamente, estos movimientos poblacionales y la urbanización intensiva no siempre están acompañados por un adecuado desarrollo de las condiciones de salud e higiene. En muchas áreas en conflicto, la crisis económica y la desorganización administrativa pueden producir el colapso de los servicios de salud, lo cual frecuentemente resulta un motivo para la administración de drogas con el tratamiento incompleto. Éste es el mayor factor en el aumento de la **resistencia** de los parásitos a las drogas anteriormente eficaces (WORLD HEALT ORGANIZATION).

En todas las situaciones, los programas de control deben estar basados en cuatro objetivos:

- La provisión de un diagnóstico temprano y el tratamiento adecuado a todas las personas afectadas.
- La aplicación selectiva de medidas preventivas sustentables, incluyendo el control del vector adaptado a las situaciones locales.
- Una respuesta inmediata, vigorosa y a gran escala a las epidemias.
- El desarrollo de información fiable sobre riesgo de infección y condiciones de vida de las poblaciones interesadas y vectores.

2.2 LA MALARIA EN EL PERÚ Y LA REGIÓN LORETO

Durante el presente siglo, la malaria ha sido reportada constantemente en el Perú, encontrándose actualmente ampliamente distribuida (**Figura 3**). Según datos existentes en la década de los 40, el promedio anual de casos reportados era de 50 mil. En los años 50, las campañas intensivas de aplicación de insecticidas residuales en las viviendas, lograron disminuir drásticamente los casos de malaria y la mortalidad en la costa del país, persistiendo en focos residuales en el norte. En la década de los 80 se reportaba un promedio anual de 30 mil casos y a partir de los 90 los casos registrados llegaron hasta 247,000 en 1998 (ARAMBURÚ et al, 1999).

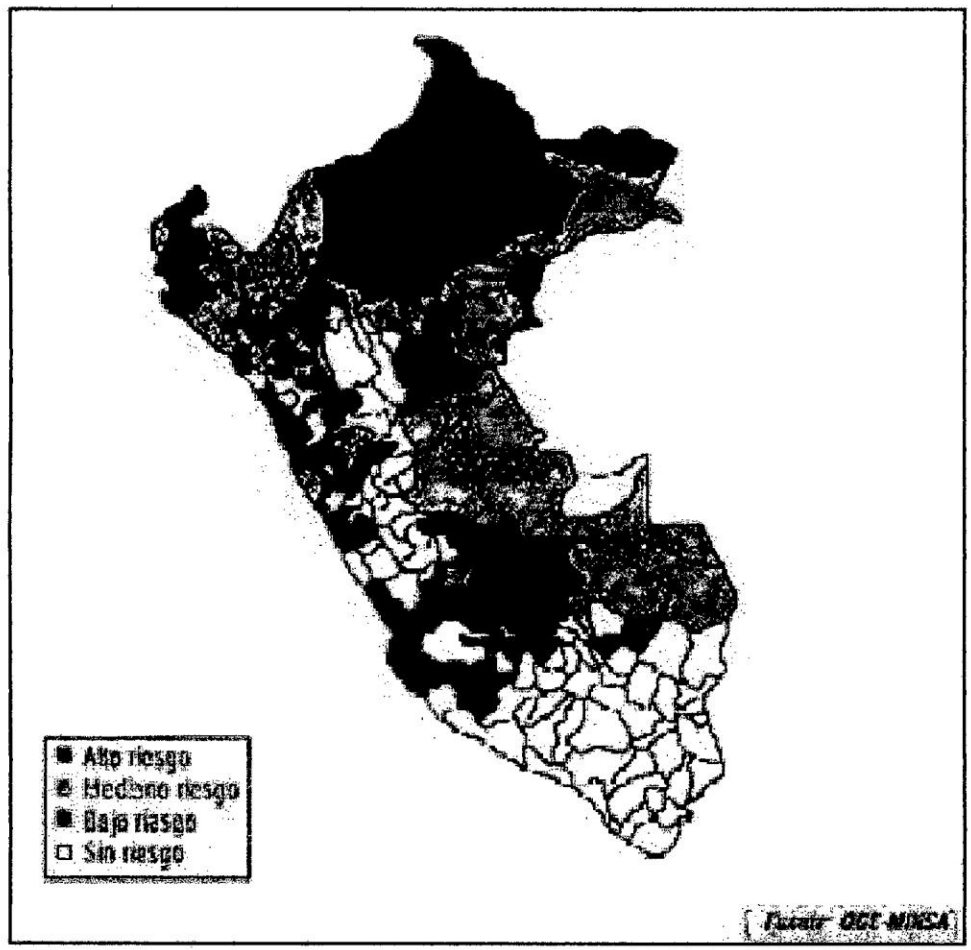


Figura 3 : Mapa de distribución de la malaria en el Perú

Después que el Perú, al igual que el resto de países del mundo, entendió que la campaña de erradicación de la malaria fracasó, debió reorientar su política a sólo el control. Los millonarios presupuestos orientados a la campaña de erradicación dejaron de venir, quedando un sistema de control desarticulado económica, política y operativamente. En la región Loreto en 1978, al cesar la campaña de erradicación, se había implementado solamente la fase de ataque (RAMAL, 1999).

En la década de los 80, los reportes de casos no señalan una incidencia importante, sin embargo en la década de los 90 se tiene el mayor brote de malaria de la historia médica conocida de Loreto. En 1997 se llega a tener 121,000 casos confirmados y aproximadamente 40 mil casos probables, que constituyeron el 67% del total de casos de malaria en el país. Luego de este episodio, a través de acciones de control, se consiguió una disminución progresiva y sostenida de la incidencia malárica. Durante el año 2001 se evidencia un aumento de alrededor del 15% en relación al 2000, siendo el total de casos confirmados entre el 2000 y el 2001, de 65956, de los cuales 48830 fueron por *P. vivax*, 17116 por *P. falciparum* y 10 por *P. malariae* (DISA-LORETO, 2001).

En el departamento de Loreto existen tres especies de Plasmodium que se encuentran infectando a humanos: *P. vivax, P. malariae* y *P. falciparum.* El tratamiento rápido es esencial, incluso en los casos leves, dado que pueden aparecer en forma repentina complicaciones irreversibles en los niños no tratados y en los adultos no inmunes. La tasa de letalidad en el caso de *P. falciparum*, puede ser del 10 al 40% o mayor (RAMAL, 1999).

La **resistencia** de *P. falciparum* a los antimaláricos se origina por mutación. Al estar expuestas a dosis subóptimas de medicamentos, genera presión para la selección de cepas resistentes mutantes. Por esta razón, la posibilidad de generación de cepas resistentes disminuye con una administración terapéutica de calidad y el uso de tratamiento combinado. Otro factor postulado para la generación y aparición de cepas resistentes es el uso de medicamentos de vida media prolongada bajo esquemas de monoterapia. De esta manera, los tratamientos incompletos por abandonos y esquemas de tratamiento inadecuados son factores que condiciona la generación de cepas resistentes.

En el Perú, desde 1996 existían indicios del surgimiento de resistencia de *Plasmodium falciparum* a la cloroquina en el norte y la amazonía del país. Loreto presenta también áreas con resistencia al esquema sulfadoxina/pirimetamina (ARAMBURÚ et al, 1999).

Si consideramos que el tratamiento eficaz y oportuno es una de las principales estrategias aplicables sobre el reservorio humano infectado, la resistencia plasmodial a antimaláricos es un problema real que amenaza la posibilidad del control de la malaria, por lo cual es necesario mantener una adecuada vigilancia de la efectividad y eficacia del tratamiento antimalárico y la resistencia plasmodial al tratamiento usado.

La malaria origina, además de las incomodidades propias de una enfermedad que puede ser mortal, gastos no sólo para los servicios de salud sino también para el paciente que no sólo deja de percibir ingresos en función de la actividad económica que realice, sino que debe destinar recursos para afrontar su atención. El Programa de control de malaria provee el tratamiento e incluso el diagnóstico y otros fármacos dentro de un paquete para afrontar la casuística de malaria grave y complicada, sin embargo no siempre están disponibles y no considera gastos de hospitalización y recuperación posterior. De otro lado si el esposo (a) acompaña al paciente durante la instancia de la enfermedad también es probable que éste (a) deje de percibir remuneración si es que la tiene, o deje de realizar tareas del hogar, además de ausentismo si es que el acompañante es un escolar.

El cambio de una línea terapéutica a otra, en general, significa un considerable aumento del presupuesto para la adquisición del nuevo antimalárico. Este presupuesto no siempre está disponible y se tienen problemas de desabastecimiento que son frecuentes. También es sabido que al progresar de una a otra línea terapéutica supuestamente de mayor eficacia, aumenta la probabilidad de efectos adversos.

Los antimaláricos actualmente utilizados por nuestro sistema de salud son producto de la investigación desarrollada por otras naciones, en las que en algún momento la malaria constituyó un problema central de salud pública. Al haber ellos superado este problema, sus líneas de investigación se dirigen a otros campos. Descubrimos entonces que la dependencia en la provisión de estas

sustancias activas para malaria se torna crítica. Esto se empeora cuando no existe investigación en esta línea en nuestro país. La provisión de antimaláricos para el tratamiento de casos con regularidad presenta vacíos en cuanto a la disponibilidad de los mismos.

2.3 LOS PLASMODIUM EN HUMANOS

2.3.1. CICLO EVOLUTIVO DE LOS PLASMODIUM EN HUMANOS

De las cien especies de *Plasmodium* conocidas, solamente cuatro se encuentran en el ser humano: *Plasmodium vivax, Plasmodium ovale, Plasmodium falciparum* y una especie común al hombre y al mono, el *Plasmodium malariae* (SHERMAN, 1999).

2.3.1.1. Ubicación Taxonómica

Reino	Animalia
Subreino	Protozoa
Phylum	Sporozoa (Apicomplexa)
Clase	Sporozoae
Subclase	Coccidia
Superorden	Euccocidiae
Orden	Haemosporida
Suborden	Aconoidina
Familia	Haemosporidae
Género	Plasmodium
Especies	*Plasmodium falciparum*
(En el humano)	*Plasmodium malariæ*
	Plasmodium ovale
	Plasmodium vivax

Estas especies presentan ciclos evolutivos similares (**Figura 4**). Dos huéspedes son necesarios para completar el ciclo: el humano, huésped *intermediario*, donde tiene lugar la multiplicación asexuada o *esquizogonia*, y el mosquito, huésped *definitivo*, donde se desarrolla la multiplicación sexuada o *esporogonia.*

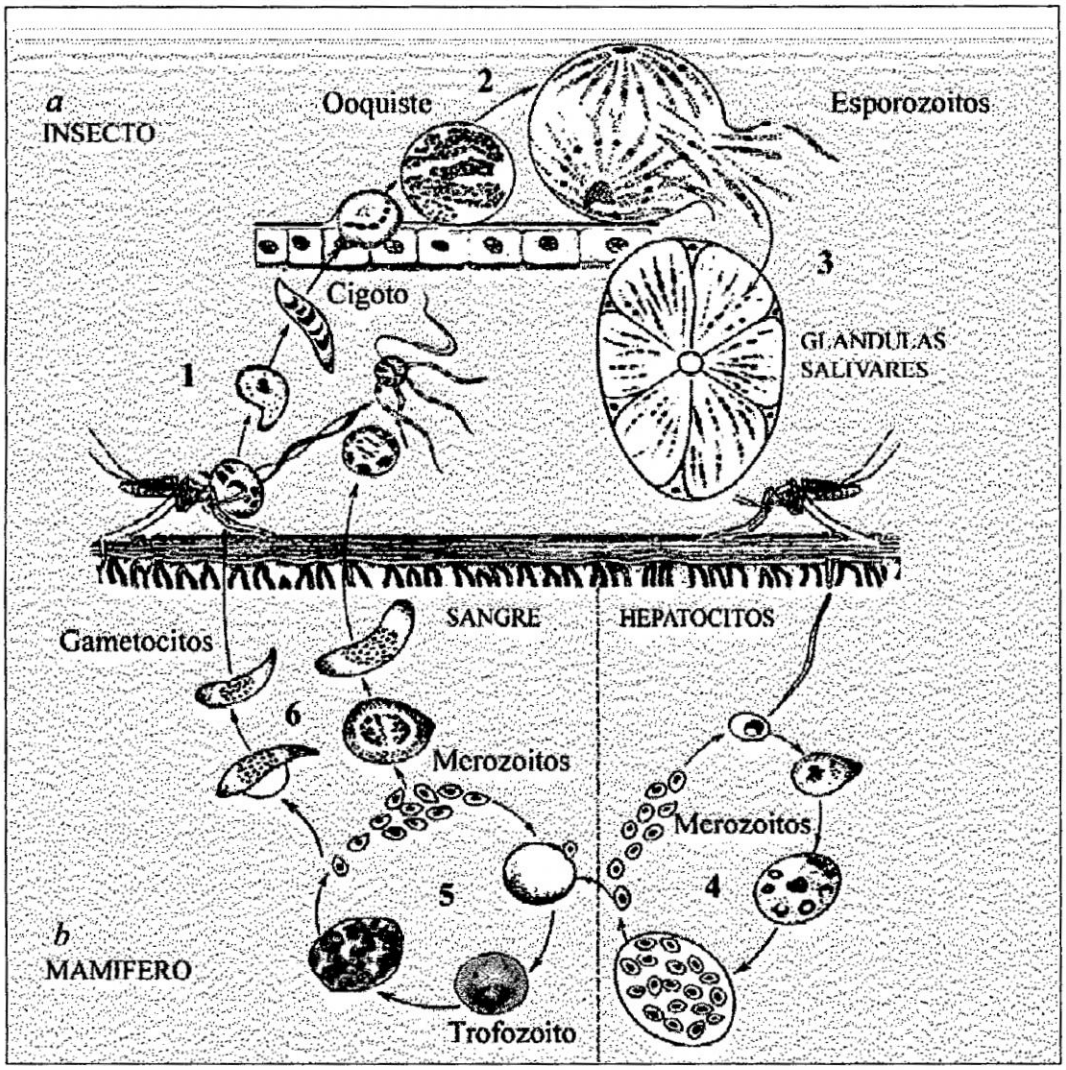


Figura 4 : Ciclo evolutivo de los *Plasmodium* en humanos: a) fase sexual en el insecto, b) fase asexual en el vertebrado.

Cuando el mosquito hembra (un Culicidae del género *Anopheles*) pica una persona infectada por *Plasmodium* (**Figura 4*a***) para ingerir la hemoglobina necesaria a la maduración de sus huevos, introduce en su estómago sangre que contiene varios estadios del parásito. Los estadios intraeritrocitarios son rápidamente destruidos en el interior del estómago del mosquito mientras que los gametocitos masculinos (9 a 11 µm de diámetro, color rosado en el frotis teñido con Giemsa) y femeninos (16 a 23 µm de diámetro, color azulado en el frotis teñido con Giemsa) sobreviven y siguen su desarrollo (RHODAIN & PEREZ, 1985).

En el tubo digestivo del mosquito se inicia el ciclo sexuado: el gametocito masculino, o *microgametocito*, lleva a cabo un proceso de maduración que conduce a la formación de un gran número de microgametos, elementos flagelados de 20 a 25 μm de largo, fusiformes con un núcleo en la parte central. La liberación de estos gametos es la *exflagelación* que toma menos de un minuto. Los flagelados nadan en búsqueda de un gameto hembra. Mientras tanto, el gameto femenino, o *macrogametocito*, madura hasta una forma llamada *macrogameto*. La fecundación de un gameto hembra por un gameto macho tiene lugar en el estómago del mosquito entre 20 minutos hasta 2 horas después de la toma de sangre. Este proceso lleva a la formación de un *cigoto*, la única forma diploide del ciclo parasitario (RHODAIN & PEREZ, 1985).

El cigoto se alarga, se mueve, y por lo tanto se denomina *ookineto* (18 a 24 µm de diámetro). Esta formación tiene un complejo apical apto para la penetración celular. Un complejo apical comprende: unos microtúbulos que mantienen una forma en pera y participan en la movilidad, un anillo apical, unos micronemas (pequeñas vesículas) y unas estructuras denominadas roptrias (grandes vesículas) (RHODAIN & PEREZ, 1985).

El ookineto atraviesa la pared estomacal del mosquito pasando entre dos células del estómago o pasando por las células mismas y se redondea adhiriéndose a la cara externa de esta pared y convirtiéndose en *ooquiste*. Los ooquistes (**Figura 5**) sobresalen en la parte externa del estómago del mosquito que puede alojar centenares de ooquistes (no es el caso para *Plasmodium malariæ* por lo cual las infecciones son siempre leves) (RHODAIN & PEREZ, 1985).

El desarrollo del ooquiste (hasta 40 o 80 µm de diámetro) conduce a la producción asexuada de numerosos esporozoitos (alrededor de 10.000), haploides, delgados, filiformes (15 µm de largo), con complejo apical. Al liberarse, se dispersan en el cuerpo del mosquito (**Figura 6**). Las glándulas salivales del mosquito contienen de 100 hasta 70.000 esporozoitos (RHODAIN & PEREZ, 1985).

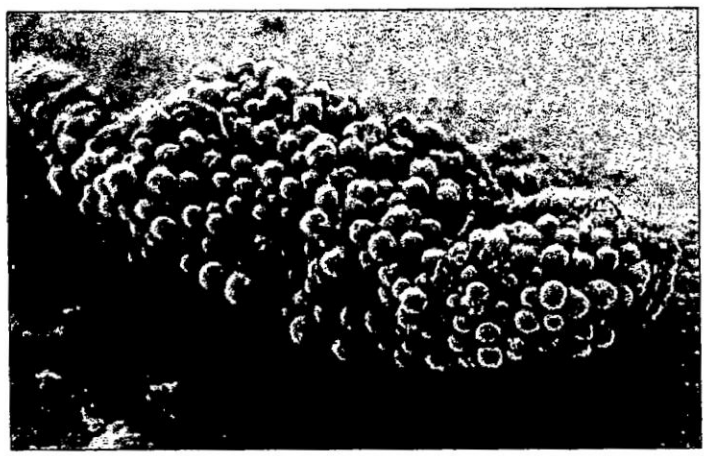


Figura 5 : Centenares de ooquistes adheridos a la pared externa del estómago del mosquito.

La duración del ciclo evolutivo en el mosquito depende del mosquito mismo, de la temperatura y de la especie de *Plasmodium* (7 días para *P. vivax*, hasta alrededor de 35 días para *P. malariæ*) (RHODAIN & PEREZ, 1985).

Figura 6 : Esporozoitos siendo liberados de los ooquistes. Estos se alojarán luego en las glándulas salivales del mosquito

El ciclo en el ser humano presenta dos fases de multiplicación asexuada, o esquizogonia. La primera tiene lugar en los hepatocitos (*esquizogonia exoeritrocitaria*) y la segunda en los glóbulos rojos (*esquizogonia eritrocitaria*). Los esporozoitos presentes en las glándulas salivales del mosquito son inyectados con la saliva del insecto en el momento de la picadura (**Figura 4*b***). En una media

hora, los esporozoitos abandonan el sistema vascular penetrando al interior de las células parenquimatosas del hígado. Estas células, especializadas en la destrucción de partículas extrañas y localizadas en la periferia de los capilares hepáticos, son las *células de Kuppfer*. Sin embargo, los esporozoitos escapan a la destrucción. En condiciones experimentales, los esporozoitos son capaces de penetrar al interior de los macrófagos y de destruirlos. Después de atravesar las células de Kuppfer, los esporozoitos se instalan en los hepatocitos donde, en menos de 48 horas, alcanzan el tamaño de un ooquiste (40 µm). Esta fase diferencia *P. falciparum* y *P. malariæ* de *P. vivax* y *P. ovale* (SHERMAN, 1999).

Para las cuatro especies se observa una multiplicación asexual; pero para *P. vivax* y *P. ovale* algunos esporozoitos pasan por una fase de espera antes de empezar la multiplicación asexual. Este estadío, llamado *hipnozoito*, puede permanecer meses antes de iniciar la división asexual (SHERMAN, 1999).

La multiplicación asexual en el hígado conduce a la producción de miles de merozoitos en cada célula infectada (10.000 para *P. falciparum* hasta 30.000 para *P. vivax*). La ruptura de estas células, llamadas *esquizontes hepáticos*, liberan los merozoitos (tercera forma que presenta un complejo apical) en la sangre, donde se desarrolla el ciclo asexual en el interior de los eritrocitos. Esta fase es responsable de la sintomatología dominante del paludismo. El lapso de tiempo entre la picadura y la aparición de los merozoitos en los eritrocitos se llama *período prepatente*. Su duración depende de la especie plasmodial: desde los 5.5 días en el caso de *P. falciparum* hasta los 15 días para *P. malariæ* (SHERMAN, 1999).

Cuando el merozoito toca la superficie del eritrocito la invagina ligeramente y es entonces cuando el complejo apical desempeña su trabajo (**Figura 7a**). Los organelos anteriores del merozoito, las roptrias, descargan sustancias que juegan un papel activo en el proceso de invasión. El reconocimiento inicial y la fijación a la membrana eritrocitaria requieren receptores específicos en la superficie del eritrocito. Así, en primer lugar las membranas del merozoito y del eritrocito se fusionan, se descargan las roptrias, el merozoito penetra y abandona su capa de protección y se desarrolla en una vacuola parasitófora donde el parásito evoluciona en forma de trofozoito y esquizonte – una forma plurinuclear que conduce a nuevos merozoitos (**Figura 7b**) (SHERMAN, 1999; PETERS, 1987).

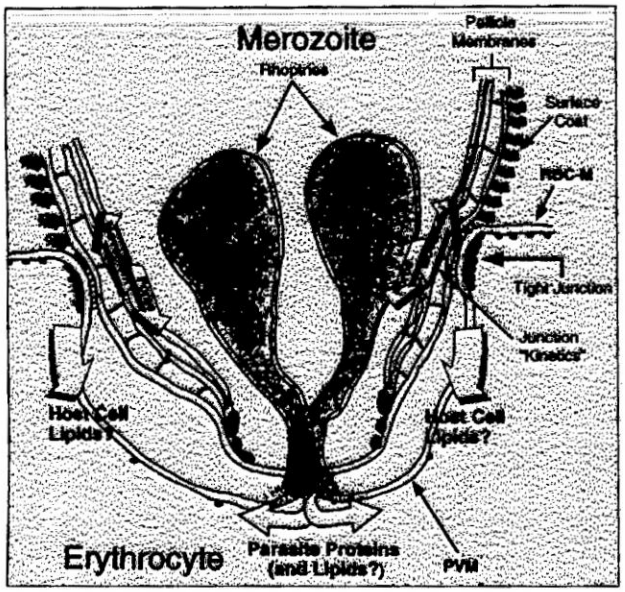


Figura 7a : Complejo apical del merozoito.

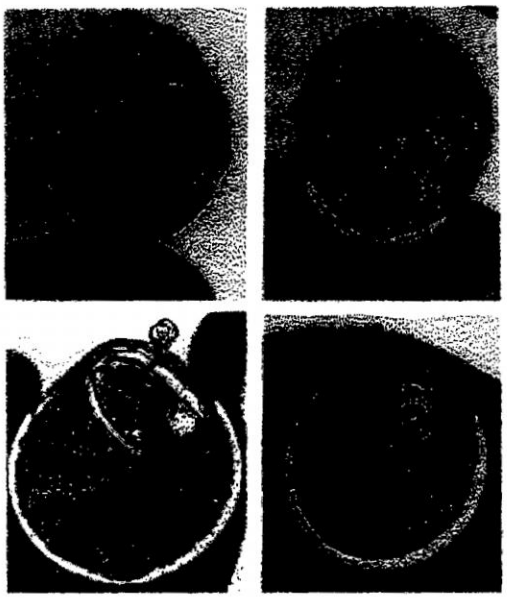


Figura 7b : Merozoito invadiendo un glóbulo rojo.

En cada glóbulo rojo infectado se produce una esquizogonia, es decir la formación de 4 a 36 nuevos merozoitos en 48-72 horas (según la especie). Los merozoitos son liberados por ruptura del eritrocito infectado y van a infectar nuevos glóbulos rojos (SHERMAN, 1999).

Al romperse, el eritrocito libera productos del metabolismo del parásito y del eritrocito mismo. La ruptura contemporánea de numerosos glóbulos rojos es responsable de la sintomatología en general y del paroxismo palúdico en particular (SHERMAN, 1999).

Debido a que al inicio de la infección la ruptura de los eritrocitos infectados no es sincrónica, la fiebre es raramente intermitente, más bien continua. Aparentemente, la fiebre juega un papel sincronizador en el desarrollo del parásito visto que el incremento de temperatura mata a las formas más viejas dejando una población parasitaria siempre más joven y sincrónica. Por lo tanto, después de varios días de desarrollo parasitario, el ciclo febril se vuelve periódico (48 a 72 horas según la especie de parásito y si la infección no es mixta) (SHERMAN, 1999).

Algunos merozoitos no van a multiplicarse asexualmente sino van a evolucionar en elementos masculinos o femeninos: los gametocitos; formas que crecen sin dividirse en menos de 2 semanas para *P. falciparum*, y en 2 a 3 días para las demás especies. Su evolución puede tener lugar únicamente en el tubo digestivo de algunas especies de mosquitos (SHERMAN, 1999).

La fecundidad de *Plasmodium* es extraordinaria: de un ookineto se obtienen alrededor de 10.000 esporozoitos; cada esporozoito puede dar lugar a 10-30.000 merozoitos; cada merozoito puede dar lugar a 8-32 merozoitos (varias veces). Por lo tanto, un ookineto podría dar teóricamente hasta un millar de nuevos parásitos (SHERMAN, 1999).

2.3.2. CARACTERÍSTICAS DE LOS PLASMODIUM EN HUMANOS

2.3.2.1. *Plasmodium vivax*

Esta especie está presente en casi todas las zonas donde el paludismo es endémico y su área de distribución se extiende a las regiones templadas.

La duración de su ciclo exoeritrocitario primario varía de 12 a 21 días, en algunas cepas de 6 a 9 meses. Según la cepa, los elementos parasitarios subsistentes en el hígado pueden permanecer más de 2 años y ser responsables de recaídas esquizogónicas a distancia de la infestación.

La parasitemia raramente excede 2 parásitos en 100 glóbulos rojos, la esquizogonia eritrocitaria dura 48 horas, que corresponde al ritmo de la terciana de los accesos intermitentes.

P. vivax parasita sobre todo los hematíes jóvenes (reticulocitos); el hematíe-huésped es más grande que los hematíes normales y contiene numerosos gránulos de Schüffner que resultan de la degradación de la hemoglobina y le dan un aspecto punteado.

Las formas intraeritrocitarias son grandes (llegan a ocupar hasta 2/3 del eritrocito) y están provistas de movimientos ameboides vivaces (es el porqué del nombre "vivax"); los esquizontes presentan hasta 16 merozoitos, los gametocitos son redondos, frecuentemente excéntricos y con pigmento abundante (GENTILINI, 1995; MARKELL, et al, 1994).

2.3.2.2. *Plasmodium ovale*

Es muy próximo a *Plasmodium vivax*, con el cual fue confundido por mucho tiempo. Está ampliamente distribuido en África tropical y también se ha descrito en Asia y Sudamérica.

Su incubación varía de 15 días a varios meses. La esquizogonia eritrocitaria dura 48 horas (*fiebre terciana*).

P. ovale parasita los hematíes jóvenes; el hematíe-huésped es de talla grande, ovalado (es el porqué del nombre "ovale"), sus bordes están recortados y contiene tempranamente numerosos gránulos de Schüffner. El poliparasitismo es posible. Los trofozoitos son ovalados, los esquizontes son irregulares con 8 hasta 16 merozoitos (GENTILINI, 1995; MARKELL, et al, 1994).

2.3.2.3. *Plasmodium malariae*

Es menos frecuente que *Plasmodium vivax* o *Plasmodium falciparum* y se encuentra principalmente en zonas templadas y subtropicales.

Su incubación dura alrededor de 3 a más de 4 semanas y la preinvasión es desapercibida. Las recaídas pueden sobrevenir durante por lo menos 3 años, algunas veces hasta 20 años y más. Este fenómeno sería debido a las formas eritrocitarias latentes y se expresa en la ocasión de una agresión, tal como una intervención abdominal, en particular una esplenectomía y en general cuando las defensas inmunológicas del huésped bajan.

La esquizogonia eritrocitaria de *P. malariæ* dura 72 horas, lo que explica el ritmo de cuartana de los accesos intermitentes. Parasita los hematíes viejos (1 a 2%) que él disminuye de volumen sin que aparezcan gránulos. El hematíe-huésped es de tamaño normal o retractado y monocromático. Morfológicamente, *P. malariæ* está caracterizado por la disposición en banda cuadrilátera o ecuatorial de los trofozoitos, con esquizontes que presentan 8 merozoitos y con gametocitos semejantes a los de *P. vivax* pero más pequeños (GENTILINI, 1995; MARKELL, et al, 1994).

2.3.2.4. *Plasmodium falciparum*

Es la especie más temible y mortal. Se encuentra en las regiones tropicales y subtropicales. El desarrollo de su ciclo en el mosquito necesita una temperatura superior a los 18 °C, a esto se debe su ausencia en las montañas tropicales y en las regiones templadas.

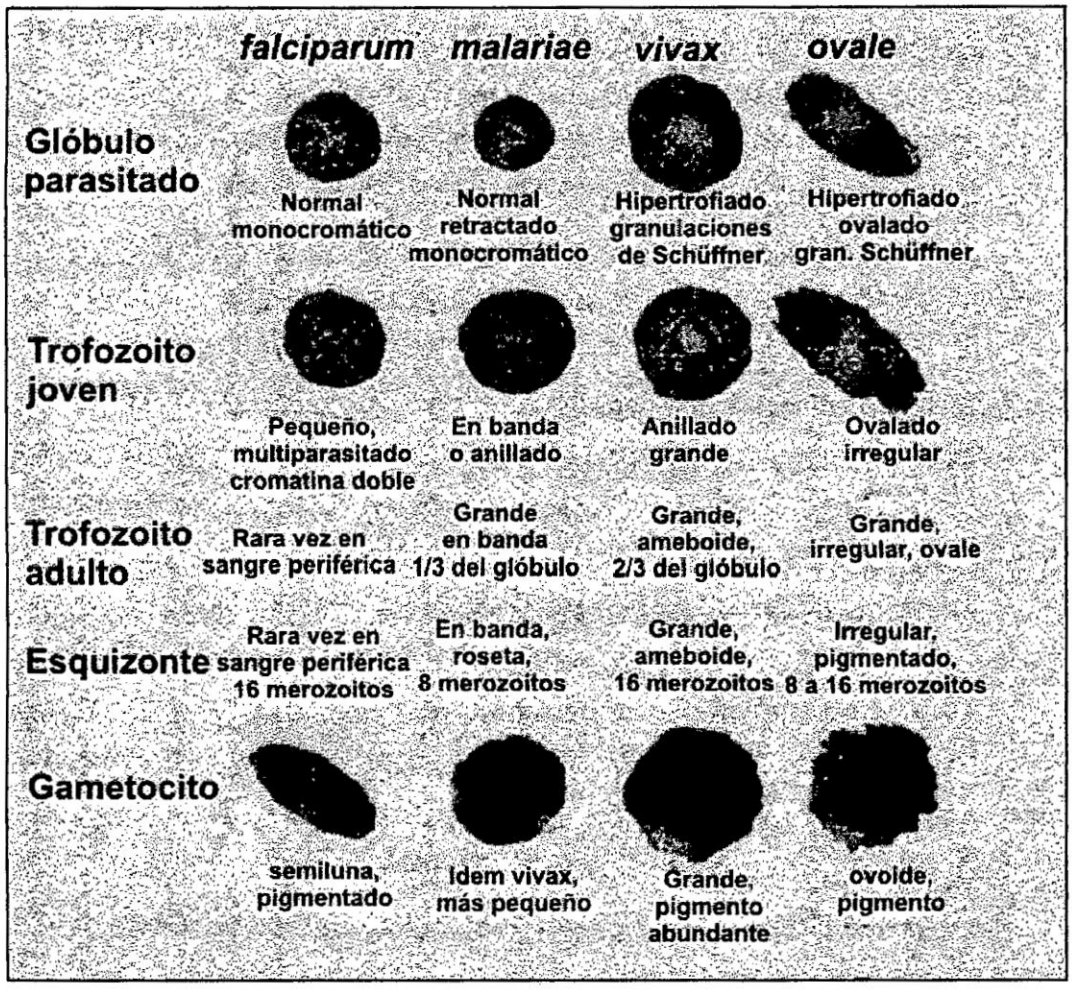


Figura 8 : Características diferenciales de las 4 especies de *Plasmodium* en humanos en su fase eritrocitaria.

Su ciclo exoeritrocitario es el período más corto: dura solamente de 7 a 15 días en promedio, y no presenta reviviscencia esquizogónica. La longevidad del parásito no pasa habitualmente de 2 meses, más puede llegar a los 6 meses o un año.

P. falciparum parasita todos los hematíes, por esto más del 10% de los glóbulos rojos pueden ser parasitados. La esquizogonia eritrocitaria dura habitualmente 48 horas y se efectúa casi exclusivamente en los capilares profundos. En el frotis de sangre se observa la presencia uniforme de trofozoitos anulares (los esquizontes se encuentran en capilares profundos y presentan hasta 16 merozoitos); el poliparasitismo de un glóbulo rojo es frecuente. Los gametocitos tienen la forma de banana o pequeña hoz (del latino *falx, falcis*), a esto se debe el nombre de esta especie (GENTILINI, 1995; MARKELL, et al, 1994).

2.4 LOS PLASMODIUM EN ROEDORES

Los *Plasmodia* de roedores son ampliamente utilizados para intentar comprender la biología y la patología de la malaria humana, pese a que el sistema inmunológico humano no es el mismo que el sistema inmunológico de los roedores y la farmacocinética de las drogas también es diferente. Se ha observado que los *Plasmodia* de roedores y las cuatro especies de *Plasmodia* humanos son sensibles a las mismas drogas (BEAUTÉ-LAFITTE, et al, 1994).

Hasta hace pocos años se pensaba que los *Plasmodia* de roedores eran muy similares y que tenían un ciclo esquizogónico sanguíneo de 24 horas. Esta noción de modelo universal de *Plasmodium* de roedores era errónea.

En realidad, tienen características biológicas muy distintas, como sus orígenes. Hoy en día, es posible escoger la especie más adecuada para contestar a una pregunta científica dada (COX, 1988).

Se conocen cuatro especies de *Plasmodium* de roedores (*P. vinckei, P. chabaudi, P. berghei, P. yoelii*), aisladas a partir de cinco focos africanos diferentes: Camerún, ex Congo, ex Katanga, ex República Centroafricana y Nigeria.

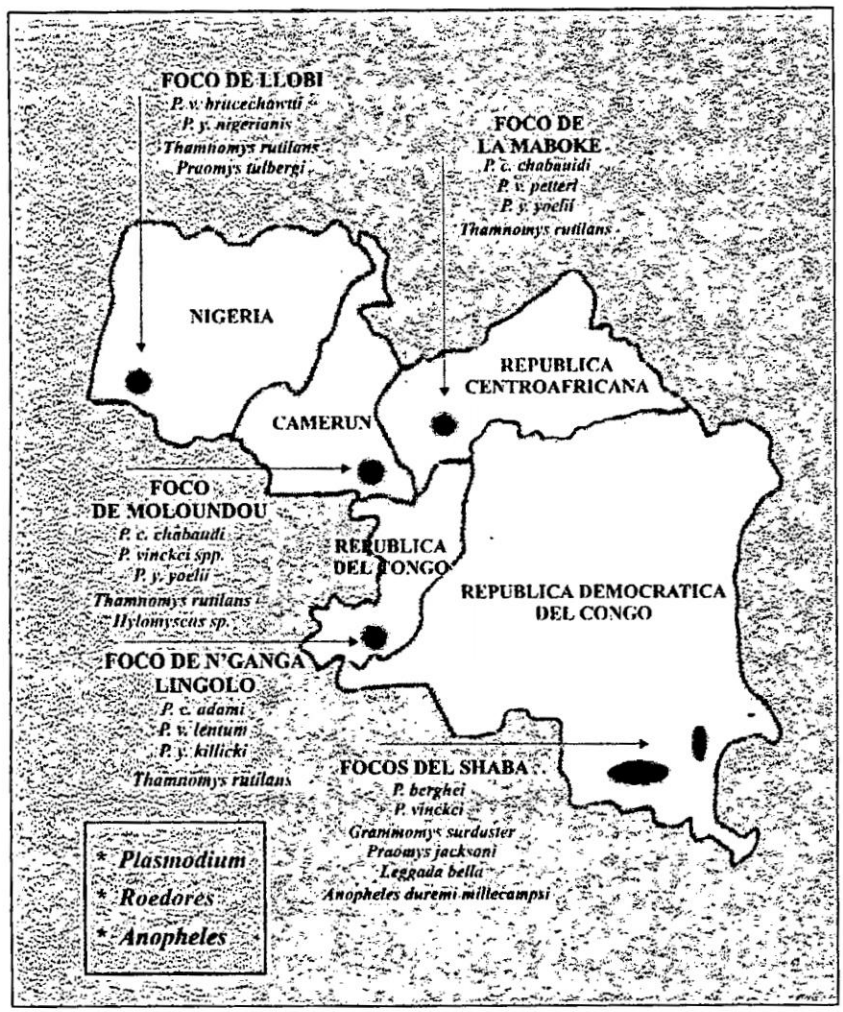


Figura 9 : Mapa de ubicación de las zonas donde se descubrieron las especies de *Plasmodium* de roedores

2.4.1. CARACTERÍSTICAS DE LOS PLASMODIUM EN ROEDORES

2.4.1.1. *Plasmodium vinckei*

Dos de las 4 especies descritas, fueron aisladas de un hospedador vertebrado, un roedor salvaje que vive en los árboles a dos metros del suelo (*Thamnomys rutilans*) (LANDAU & CHABAUD, 1994). *P. vinckei* presenta un ciclo eritrocitario muy sincrónico (se dice que un ciclo es "sincrónico" cuando en el transcurso del ciclo eritrocitario los parásitos, en su mayoría, presentan el mismo estadio de desarrollo en un momento dado) de 24 horas de duración y se desarrolla principalmente en los normocitos (GAUTRET, et al, 1994).

2.4.1.2. *Plasmodium chabaudi*

Esta especie tiene también como huésped intermediario a *Thamnomys rutilans*. *P. chabaudi* presenta un ciclo de 24 horas, un poco menos sincrónico que *P. vinckei* (GAUTRET, PH., et al. 1995). Cuando los roedores están expuestos al ritmo solar, la esquizogonia tiene lugar a medianoche, y a mediodía, cuando el ritmo de luz está invertido. Este parásito invade tanto los glóbulos rojos maduros como los reticulocitos (LANDAU & CHABAUD, 1994).

2.4.1.3. *Plasmodium berghei*

Sus hospedadores vertebrados conocidos son *Grammomys surdaster*, *Leggada bella*, *Praomys jacksoni* y un vector llamado *Anopheles dureni millecampsi*. *P. berghei* tiene una gran afinidad por los reticulocitos y un ciclo asincrónico de 21 horas (GAUTRET, et al, 1994).

2.4.1.4. *Plasmodium yoelii*

Tres especies de *Plasmodium yoelii* fueron descubiertas en *Thamnomys rutilans*. *P. yoelii* presenta un ciclo eritrocitario muy asincrónico, de 18 horas, y prefiere los eritrocitos inmaduros (GAUTRET, et al, 1994).

2.5 TÉCNICAS PARA LA EVALUACIÓN DE ACTIVIDAD ANTIMALÁRICA

El parásito de la malaria posee un ciclo biológico muy amplio, lo cual nos permite contar con múltiples blancos potenciales en la investigación contra esta enfermedad. Las técnicas utilizadas para evaluar la actividad antimalárica de productos naturales y/o de síntesis, pueden clasificarse en dos grupos:

2.5.1. TÉCNICAS *IN VITRO*

Algunas de las ventajas de las técnicas *in vitro* en la investigación de drogas antimaláricas son:

- La capacidad de obtener una información confiable con cantidades pequeñas (microgramos) de material;
- La medición de la actividad intrínseca antimalárica donde no intervienen factores del hospedador;

- La mayor precisión de la medición que generalmente no es posible con sistemas de test *in vivo*;
- La evaluación de un mayor número de compuestos en un experimento, comparado con el método *in vivo*;
- El hecho de no tener problemas de ética;
- Además, el elevado costo de los ensayos *in vivo* y las restricciones cada vez mayores en el uso de animales, han dado lugar a que la mayor parte de los ensayos hoy en día utilicen cultivos *in vitro* de parásitos. Por lo tanto, podemos considerar los métodos *in vitro* más eficaces y menos caros que los métodos *in vivo.*

En contra parte algunas de las limitaciones de estos métodos son:

- La incapacidad de determinar las actividades potenciales de drogas antimaláricas que requieren activación metabólica, como en el caso del proguanil, que tiene que ser metabolizado en cicloguanil para presentar actividad antimalárica;
- El curso artificial de la droga expuesta a una concentración constante por un período determinado;
- La incapacidad para distinguir, selectivamente, la seguridad y la toxicidad de los compuestos con respecto a la tolerancia del huésped;
- Los problemas de ciertas propiedades físico-químicas, como por ejemplo la solubilidad acuosa y la adherencia al vidrio o plástico;
- La necesidad de conseguir sangre humana previamente evaluada (HIV, hepatitis, chagas, etc.) (DEHARO, 2000).

Estas técnicas tienen como base el cultivo de **estadíos intraeritrocitarios** de *Plasmodium falciparum* (TRAGER & JENSEN, 1976). Sobre la base de esta técnica existen varios métodos:

- Micrométodo radioisotópico (DESJARDINS et al., 1979)
- Método visual (LE BRAS And DELERON, 1983)
- Método bioquímico: Prueba *in vitro* de la lactato deshidrogenasa (LDH) parasitaria (BASCO et al., 1995).

- Método fluorométrico. (SMEIJSTERS et al., 1996)
- Estudio de la interacción de Drogas (DEHARO, 2000).
- Estudio del efecto de drogas sobre la permeabilidad de la membrana de glóbulos rojos parasitados (DEHARO, 2000).

Existen además técnicas que evalúan la actividad de una droga sobre un punto específico del metabolismo del parásito, como el Test de Inhibición de la Biomineralización de la Ferroprotoporfirina IX (DEHARO et al., 2001a).

2.5.1.1. Cultivo de Estadíos Intraeritrocitarios de *Plasmodium falciparum*

Los primeros estadíos intraeritrocitarios que se mantuvieron en cultivo continuo *in vitro* fueron de *Plasmodium falciparum*. Los estudios de Trager y Jensen (1976) revolucionaron las investigaciones sobre el paludismo humano. Las técnicas de cultivo permitieron que los investigadores de todo el mundo estudiaran los parásitos del paludismo de mayor importancia clínica. Estas técnicas han constituido la base de muchos adelantos en la bioquímica, parasitología, inmunología y quimioterapia del paludismo.

El éxito del cultivo de estadíos intraeritrocitarios de *Plasmodium falciparum* está basado en cuatro aspectos fundamentales:

- El buen conocimiento del ciclo biológico intraeritrocitario del parásito (**Figura 10**);
- El uso de un medio de cultivo particular, el RPMI (*Roswell Park Memorial Institute*), suplementado con suero o plasma humano (10-20%);
- La regeneración del medio de cultivo a través de cambios frecuentes;
- La reducción de la tensión de oxígeno (2-10%) y el incremento del CO_2 (3-5%).

Los problemas de cultivo provienen generalmente de las siguientes causas:

- Utilización de agua de mala calidad para preparar el medio;
- Suero proveniente de donadores tratados con antibióticos o antimaláricos;
- Variaciones de temperatura (estufa mal regulada, medio de cultivo no atemperado a 37 °C antes de su uso);

- pH no óptimo;
- Contaminación con bacterias y hongos;
- Frecuencia insuficiente de cambio de medio de cultivo;
- Congelación y descongelación de cepas efectuadas de manera no adecuada. (DEHARO, 2000).

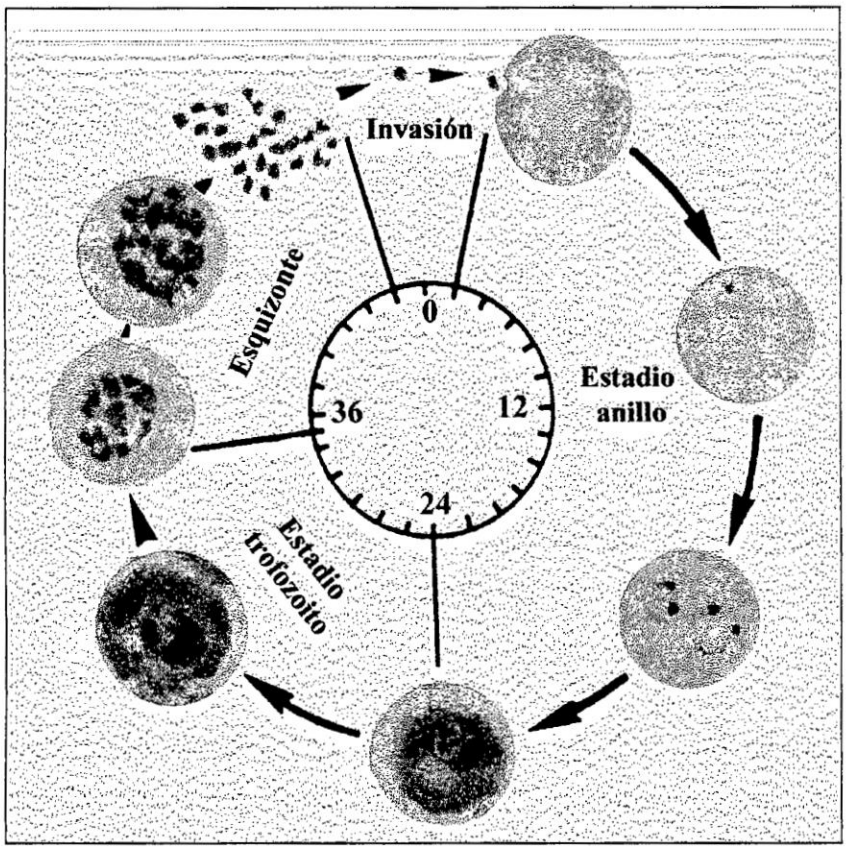


Figura 10 : Ciclo biológico intraeritrocitario de *Plasmodium falciparum*

2.5.1.1.1. Descongelación

Durante el proceso de congelación ingresan a las células sustancias crioprotectoras que deben ser eliminadas en forma progresiva al momento de la descongelación para evitar la lisis. Si se colocan los glóbulos rojos, previamente equilibrados con un crioprotector, directamente en un medio isotónico, sufrirán un estrés severo. Las células se hinchan por la rápida entrada del agua debido al balance osmótico, llegando a una lisis. (TRAGER And JENSEN, 1976; WAKI et al., 1984).

2.5.1.1.2. Congelación

Los eritrocitos son particularmente sensibles al choque osmótico y más aún los glóbulos rojos infectados por *Plasmodium*. Por lo tanto, para impedir el fenómeno de lisis, la criopreservación debe seguir rigurosamente los pasos de enfriamiento con agentes crioprotectores.

Al bajar la temperatura, se forman cristales de hielo dentro de las células, a las que pueden dañar, puesto que el volumen del hielo es mayor al del agua líquida. Además la cristalización provoca una deshidratación responsable de cambios en la concentración de sales y metabolitos. El agua, eliminada así del medio interno, crea un desequilibrio osmótico que puede impedir la recuperación de la célula.

Existen varios tipos de crioprotectores, tales como el sorbitol, el glicerol, la dextrosa, el dimetilsulfóxido (DMSO), etc., compuestos que generalmente, tienen la capacidad de bajar el punto de congelación del agua, de permeabilizar las membranas y reducir el grado de contracción de las células durante el proceso de congelación, evitando así el choque osmótico. Estos crioprotectores penetran rápidamente en el interior de la célula a congelar, reemplazando el agua, protegiendo a la célula del fenómeno de cristalización y provocando una disminución del fenómeno que aumenta las fuerzas iónicas. (CHRISTOFINIS And MILLER, 1983; WHO, 1981).

2.5.1.2. Método Visual para la Evaluación de la Actividad Antimalárica In Vitro de Productos Naturales y /o de Síntesis

Este método está fundamentado en el uso del colorante Giemsa para teñir los frotis elaborados con el sedimento de glóbulos rojos provenientes de un cultivo continuo y realizar un cálculo de la parasitemia mediante el reconocimiento y conteo de los glóbulos rojos totales y parasitados.

El Giemsa es un colorante neutro compuesto por un colorante ácido (azul de eosinato) y por un colorante básico (violeta de metileno, azul de metileno) que precipita en agua. El precipitado obtenido es el colorante neutro, insoluble en agua pero soluble en alcohol metílico. (LE BRAS And DELERON, 1983)

El colorante neutro no es activo en solución alcohólica pero sí cuando se pone en contacto con agua. Esta liberación se traduce por la precipitación del colorante neutro. Los protozoarios disocian el colorante neutro: los núcleos (ADN) se tiñen de rojo mientras que el citoplasma se tiñe de azul.

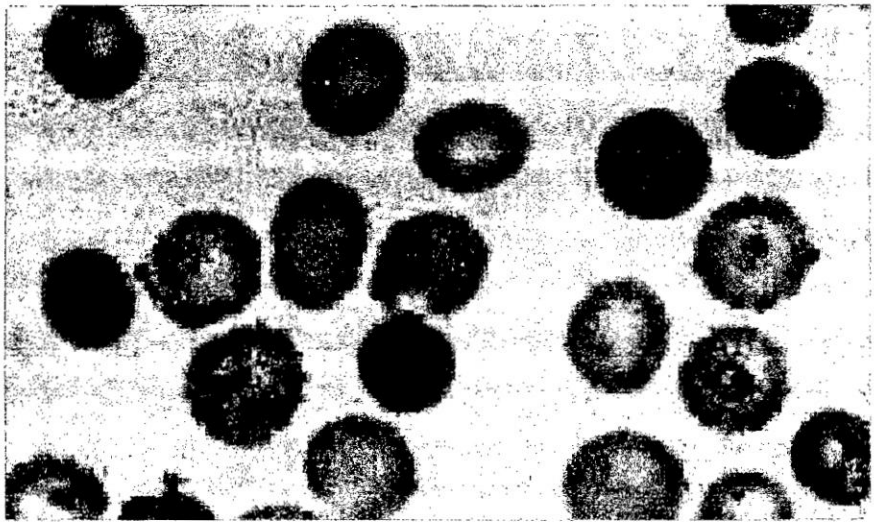


Figura 11 : Frotis teñido con Giemsa observado al microscopio con objetivo de 100 X. Se observa la presencia de estadíos jóvenes de *Plasmodium falciparum*.

Para tener una buena reproductividad en las tinciones es recomendable:

- Utilizar material de vidrio limpio sin trazas de colorante precedente (acelera la precipitación del colorante);
- Poner el colorante poco a poco en el agua, moviéndolo suavemente para mezclar. Un movimiento brusco puede producir la precipitación;
- Preparar la solución de manera extemporánea;
- Utilizar agua de buena calidad (destilada).

Además, el agua no debe ser ácida, puesto que la presencia de un ácido orgánico o mineral lleva a la precipitación del azul de eosinato. Por lo tanto, es recomendable el uso de un tampón o de agua desionizada.

2.5.1.3. Test de Inhibición de la Biomineralización de la Ferroprotoporfirina IX (FBIT)

Esta técnica se fundamenta en lo siguiente:

Durante su desarrollo intraeritrocitario el parásito de malaria degrada grandes cantidades de hemoglobina dentro de un organelo especializado denominado vacuola digestiva (GOLDBERG et al., 1990; GOLDBERG And SLATER, 1992). Durante este proceso se libera ferriprotoporfirina IX (FPIX), un compuesto potencialmente tóxico para el mismo parásito el cual puede provocar desde lisis de la membrana hasta la inactivación de enzimas indispensables para su alimentación como la plasmepsina I y II y la falcipaina. La FPIX es luego detoxificado a través de un mecanismo particular del parásito, de formar un polímero insoluble atóxico, la **hemozoina** (**Figura 12**), llamado también pigmento malárico. (GOLDBERG et al., 1990; GOLDBERG & SLATER, 1992).

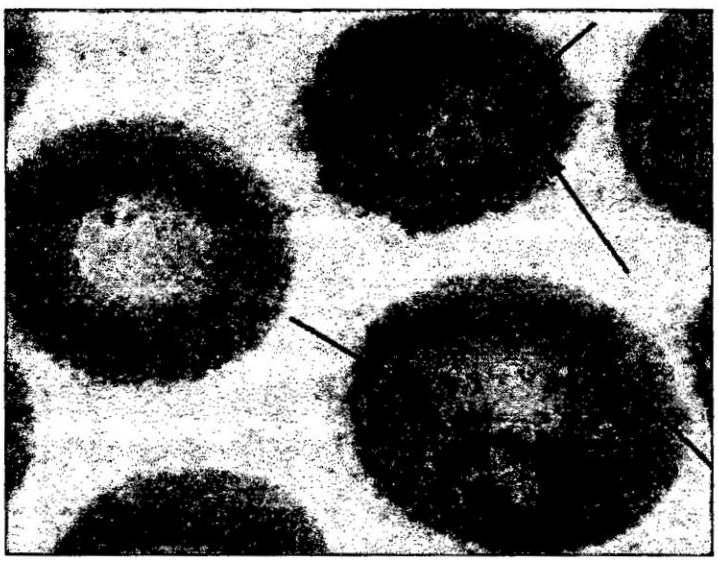


Figura 12 : Señalado con las flechas se observan pequeños cúmulos de Hemozoina diseminados en el citoplasma de glóbulos rojos parasitados.

Por lo tanto la eliminación de la FPIX es un mecanismo indispensable para su supervivencia. Esta función especializada hace a la vacuola digestiva un blanco de elección para la quimioterapia antimalárica, una droga capaz de inhibir la polimerización de la FPIX podría ser letal para el parásito.

Para muchas drogas, su habilidad para inhibir la polimerización de la FPIX está directamente relacionada a la potencia antimalárica (EGAN et al., 1994; RAYNES et al., 1996; DORN et al., 1998; EGAN & MARQUES, 1999).

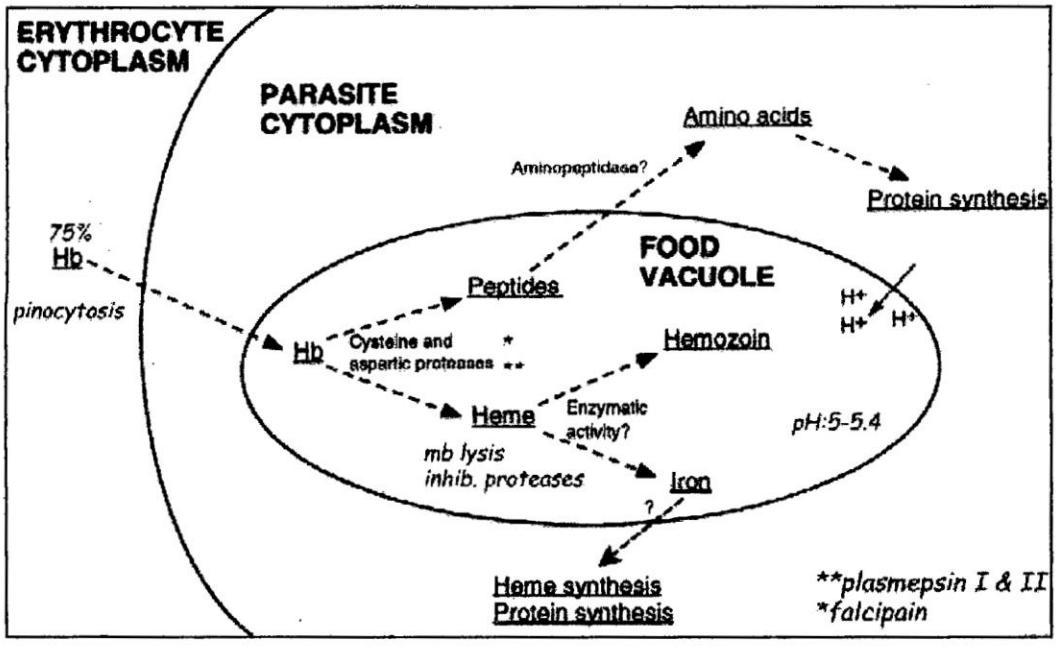


Figura 13 : Representación gráfica de la ruta metabólica de la hemoglobina.

2.5.2. TÉCNICAS *IN VIVO*

Al igual que las técnicas in vitro, existen diversas técnicas para determinar la actividad antimalárica de un compuesto en modelo in vivo. Estas tienen como base el mantenimiento de las cepas de *Plasmodium* de roedores:

- Test supresivo de 4 días o "Test de Peters" (DEHARO et al, 2000)
- Test de Rane (DEHARO et al, 2000)
- Determinación del estadío sensible (DEHARO et al, 2000)
- Métodos de Evaluación del impacto de una droga (DEHARO et al, 2000)
- Inducción a la resistencia (DEHARO et al, 2000).

2.5.2.1 Mantenimiento de las cepas

Los estadíos intraeritrocitarios de los *Plasmodium* de roedores se conservan fácilmente a –70 °C, o en nitrógeno líquido con un agente crioprotector apropiado. Para su ulterior uso en los protocolos experimentales, se inyecta la mezcla de sangre infectada y de crioprotector a ratones machos tipos Swiss. Se evalúa el desarrollo de la parasitemia mediante frotis cotidianos. Una vez obtenida la parasitemia deseada, se pueden infectar otros ratones sanos (PETERS, 1970).

2.5.2.2. Evaluación de la Actividad Antimalárica In Vivo Mediante el Test Supresivo de 4 Días o "Test de Peters"

El "Test de Peters" consiste en infectar ratones con una cepa de *Plasmodium* de roedores, tratar los animales infectados 2 horas después con las drogas a evaluar y luego tratarlos nuevamente cada día a la misma hora durante tres días. Generalmente, por razones prácticas, se empieza el protocolo el día lunes (D0) y se termina la primera fase del estudio el día viernes (D4) con la lectura de los frotis (PETERS And ROBINSON, 1992).

2.6 PRODUCTOS NATURALES ANTIPALÚDICOS EN AMÉRICA LATINA

2.6.1 SELECCIÓN DE PLANTAS MEDICINALES

La primera selección en la historia de las plantas medicinales antipalúdicas fue efectuada por la empresa norteamericana Merck en 1947. Seiscientas plantas medicinales de diversos orígenes fueron evaluadas con un modelo de *Plasmodium* de aves (SPENCER et al., 1947). Varias de estas plantas provenían de la flora de América Latina.

Los resultados mostraron la importancia farmacológica de las familias Simaroubaceae y Amaryllidaceae (género *Crinum* y *Hymenocallis*). Estas dos familias son muy conocidas en América, varias Simaroubaceas son plantas medicinales utilizadas como febrífugas en América Central y en Amazonía.

Un grupo de investigadores de Belo Horizonte, en Brasil, demostró el interés de seguir la vía etnofarmacológica para descubrir plantas antipalúdicas.

Un cribado *in vivo* de plantas tomadas al azar y de plantas medicinales específicamente febrífugas ha dado los resultados siguientes: 18% de las plantas medicinales y solamente 0,7% de las plantas tomadas al azar tienen un interés farmacológico como antipalúdicos. (BRANDAO et al., 1992)

2.6.2 ALCALOIDES

Las infusiones de corteza de plantas del género *Cinchona* (Rubiácea) han sido utilizadas desde el siglo XVII con éxito en el tratamiento de la malaria.

Recientemente se descubrió la presencia de árboles del género *Cinchona* en alturas mucho más bajas: 200 hasta 300 msnm. Estos árboles tienen un porcentaje bajo de quinina pero elevado en otros alcaloides quinoleicos (cinconina, cinconidina: REA et al, 1993).

La corteza seca de *Cinchona ledgeriana* Moens cultivada contiene hasta el 13,5% de quinina y un poco menos de 1,5% de los demás alcaloides. (REA et al., 1993). Los cuatro principales alcaloides de las *Cinchonas* (quinina, quinidina, cinconina y cinconidina) han sido caracterizados a mediados del siglo XIX.

Las actividades de los principales alcaloides de las *quinas* contra las cepas de *Plasmodium* encontradas en el ser humano pueden ser clasificadas de manera siguiente: quinidina > quinina > cinconidina > cinconina (HOFHEINZ et al., 1984).

La quinina es un amino-alcohol cuya estructura (**Figura 14**) está conformada por un núcleo heterocíclico quinolínico substituido por un grupo metoxi en 6 y un núcleo quinuclidínico con un grupo vinilo en 3. Los dos heterociclos están unidos por un puente hidroximetileno. La configuración espacial del conjunto es fundamental para la actividad antimalárica (BASCO et al., 1994).

Hasta el inicio del presente siglo estos alcaloides eran considerados como el único tratamiento contra la malaria. En los años 1930 se introdujeron nuevas drogas sintéticas y la quinina empezó a jugar un papel secundario en el tratamiento antimalárico.

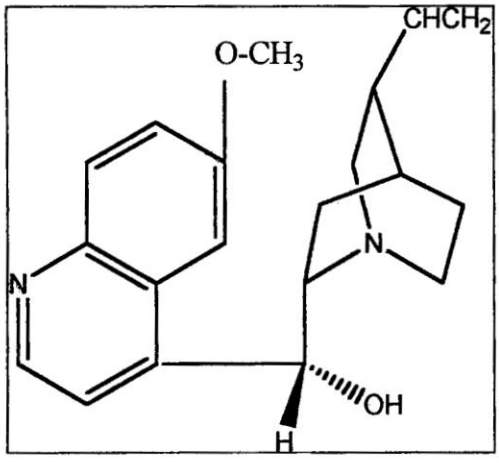


Figura 14 : Quinina, alcaloide quinolínico aislado de especies del género *Cinchona*.

Desde los años 1980, la quinina es utilizada con más frecuencia en el tratamiento de los casos de paludismo ocasionado por *P. falciparum* resistente a las diferentes drogas de síntesis.

Se piensa que si el parásito no ha desarrollado resistencia a los alcaloides totales de la *Cinchona*, a pesar de su largo historial de uso, es porque las infusiones obtenidas de las cortezas de *Cinchona* usadas tienen una composición variable de alcaloides relacionados, los cuales varían en su modo de acción.

La corteza de *Pogonopus tubulosus* K. Schum. (Rubiaceae), conocida en Bolivia como *quina morada*, es usada tradicionalmente en el Sur del país contra las fiebres palúdicas. Tres alcaloides aislados de la corteza de la planta fueron identificados como: tubulosina (GRELLIER et al., 1996), psicotrina y cefaelina. Estos compuestos mostraron actividad antipalúdica tanto *in vitro*, en cepas resistentes y sensibles de *Plasmodium falciparum*, como *in vivo*, en ratones infectados con *P. berghei*.

La tubulosina, alcaloide dimérico indólico-isoquinoleico (**Figura 15**), se destaca por su fuerte actividad con una CI_{50} = 0,011 µg/ml contra la cepa resistente de *P. falciparum*, 0,006 µg/ml contra la cepa sensible de la misma especie y una dosis eficaz 50 = 0,45 mg/kg contra *P. berghei* (SAUVAIN et al., 1996).

Estos datos permiten relacionar el uso tradicional de la planta con la actividad que presenta en el laboratorio. Otros resultados similares fueron obtenidos *in vitro* con una tubulosina aislada de un *Strychnos* africano (WRIGHT et al., 1991).

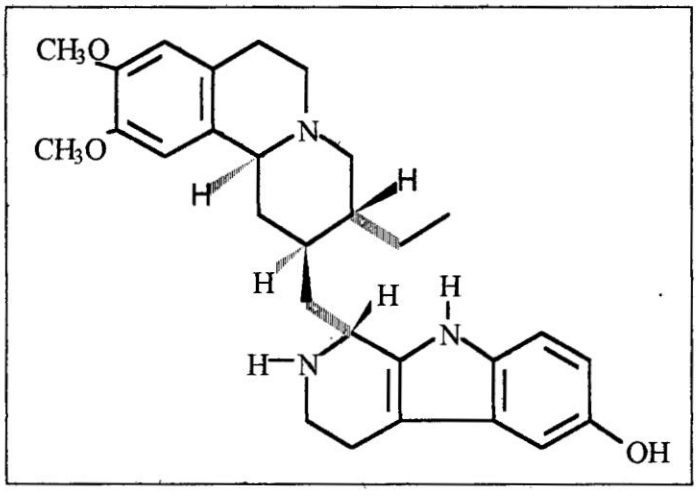


Figura 15 : Tubulosina, alcaloide indólico asilado de especies de género *Pogonopus* y *Strychnos*

La krukovina un BBIQ, (**Figura 16**) aislada de *Abuta grandifolia* Sandw. (Menispermaceae), un bejuco de la Amazonía usado contra la malaria, presenta fuerte actividad *in vitro* con una CI_{50} de 22 ng/ml contra una cepa cloroquina-sensible de *P. falciparum* (STEELE et al., 1999).

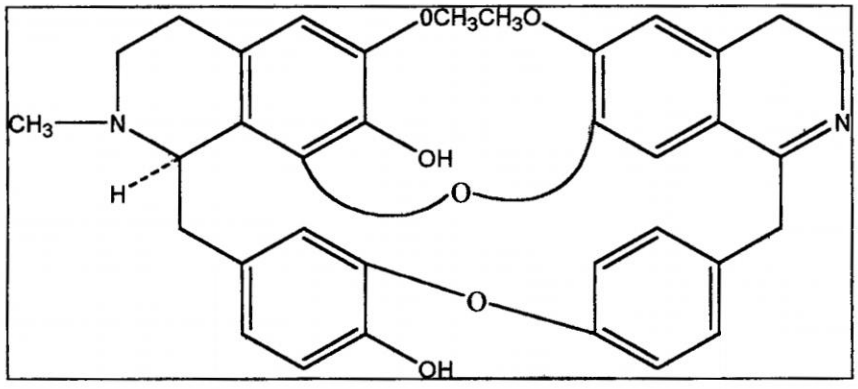


Figura 16 : Krukovina, alcaloide aislado de *Abuta grandifolia.*

En la farmacopea de los Chimanes de Bolivia, una Rutaceae, *Galipea longiflora* Krause, es utilizada como planta medicinal tanto para el tratamiento de las amebiasis como para la leishmaniasis. La misma planta es usada por otro grupo nativo de la región, los Mosetenes, como febrífugo. La actividad del extracto de alcaloides totales y de 6 alcaloides de tipo quinolinas substituidas en 2 (**Figura 17**), sobre *P. vinckei* (GANTIER et al., 1996) confirmaron el interés del uso medicinal.

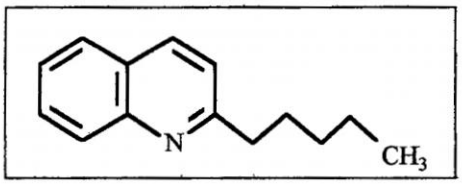


Figura 17 : Quinolinas substituidas en 2

2.6.3 COMPUESTOS GRASOS

La actividad del *n*-hentriacontanol, alcohol graso aislado de una Solanaceae boliviana (*Cuatresia forsteriana* A. Hunz.), fue estudiada, *in vivo*, en ratones, a través del clásico "Test supresivo de 4 días" sobre *P. berghei* y *P. vinckei. In vivo,* este producto reduce de manera muy significativa la infección por *P. vinckei.* El *n*-hentriacontanol pertenece a una clase de nuevos productos naturales antimaláricos que podrían ser usados en esta terapéutica (DEHARO et al., 1992).

2.6.4 TERPENOS

En el cribado de Merck, la familia de las Simaroubaceae es mencionada como la más promisoria por la fuerte actividad antipalúdica de la mayoría de sus miembros.

En América Latina, el primer estudio sobre un quasinoide aislado fue realizado por un grupo de Guyana Francesa (FANDEUR et al., 1985).

A concentraciones muy bajas (0,006 µg/ml), el sergeolido (**Figura 18**), aislado de *Picrolemma pseudocoffea* Ducke, es capaz de inhibir completamente el crecimiento de cepas de *P. falciparum* sensibles y resistentes a la cloroquina. También, dosis bajas (0,26 mg/kg/día) reducen la virulencia de la infección del ratón por *P. berghei*. Lastimosamente, el sergeolido no puede ser muy útil para el tratamiento de la malaria debido a su toxicidad aguda elevada (dosis letal 50 = 1,8 mg/kg).

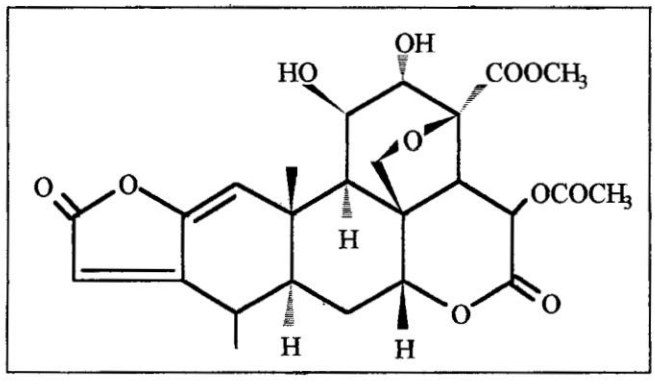


Figura 18 : Sergeolido aislado de *Picrolemma pseudocoffea* Ducke

O'NEILL, et al., (1988) mostraron la actividad antipalúdica de la glaucarubinona (**Figura 19**) y sus derivados aislados de los frutos de *Simarouba amara* Aubl. colectados en Panamá. Este trabajo confirmó el interés de esta familia de compuestos pero también su elevada toxicidad.

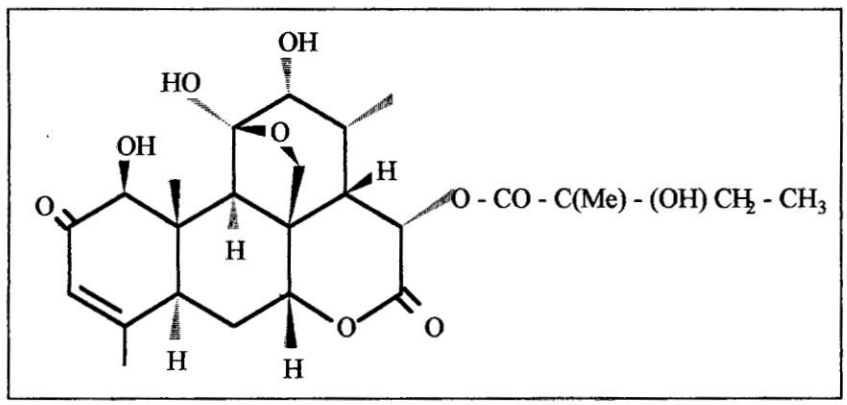


Figura 19 : Glaucarubinona, terpeno aislado de *Simarouba amara*.

La familia de las Meliaceae tiene representantes comunes en América tropical (*Cedrela odorata* L., *Carapa guianensis* Aubl. y *Swietenia mahagoni* Jacq.) los cuales se usan en medicina tradicional contra las fiebres. Limonoides aislados de estas plantas presentan buenas actividades antimaláricas *in vitro*. Por ejemplo, la gedunina (**Figura 20**) tiene una CI_{50} de 20 ng/ml.

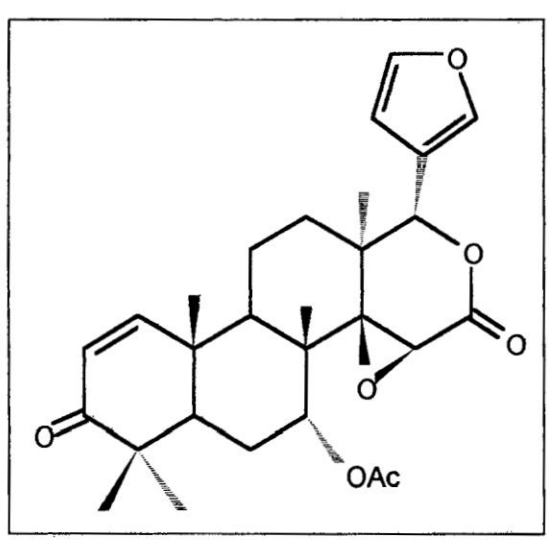


Figura 20 : Gedunina, terpenoide aislado de *Cedrela odorata*.

III MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. MATERIALES

3.1.1 PREPARACIÓN DE LOS EXTRACTOS HIDROALCOHÓLICOS

3.1.1.1 Material Biológico

- 25 g de muestra seca y molida de las especies a evaluar.

3.1.1.2 Materiales de Vidrio

- Balones de 250 ml
- Embudos de vidrio
- Matraces Erlenmeyer de 1000 ml
- Pipetas Pasteur
- Probetas de 1000 ml
- Viales

3.1.1.3 Otros Materiales

- Papel de filtro

3.1.1.4 Reactivos Químicos

- Agua destilada
- Etanol p.a.

3.1.1.5 Equipos

- Balanza Analítica TOLEDO (0.0001 g. de sensibilidad)
- Rotaevaporador BÜCHI

3.1.2 EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMALÁRICA IN VITRO MEDIANTE EL TEST DE INHIBICIÓN DE LA BIOMINERALIZACIÓN DE LA FERROPROTOPORFIRINA IX (FBIT)

3.1.2.1 Material Biológico

- Extractos hidroalcohólicos de las especies a evaluar

3.1.2.2 Materiales de Plástico

- Placas de 96 pozos de fondo plano no estériles
- Tubos tipo Eppendorf de 1.5 ml

3.1.2.3 Otros Materiales

- Micropipeta de 50 - 200 µl
- Micropipeta multicanal de 50- 200 µl

3.1.2.4 Reactivos Químicos

- Ácido acético glacial p.a
- Acetato de Sodio p.a.
- Clorhidrato de Hemina Bovina (Sigma H 5533)
- Dimetil Sulfóxido (DMSO)
- Hidróxido de Sodio p.a.

3.1.2.5 Equipos

- Agitador de Placas GENIE 2
- Agitador Vortex GENIE 2
- Balanza Analítica TOLEDO (0.0001 g. de sensibilidad)
- Centrífuga de Placas de 96 pozos (14000 rpm max) JOUAN CR3
- Estufa Básica para cultivo (37 °C)VWR
- Lector de ELISA AWARENESS

3.1.3 CULTIVO DE LOS ESTADÍOS INTRAERITROCITARIOS DE *Plasmodium falciparum* Y EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMALÁRICA IN VITRO

3.1.3.1 Material Biológico

- Glóbulos rojos humanos no infectados (GR)
- Glóbulos rojos humanos infectados (GRI) con *Plasmodium falciparum* cepa F – 32 (cloroquina sensible)
- Medio de cultivo RPMI 1640 (Sigma R-4130)
- Suero humano (compatible con el mismo grupo sanguíneo de los GR empleados)
- Extractos hidroalcohólicos de las especies a evaluar

3.1.3.2 Materiales de Vidrio

- Láminas porta-objetos
- Matraz Erlenmeyer de 1000 ml
- Pipetas Pasteur estériles
- Probetas de 1000 ml
- Tubos de hemólisis de 5 ml

3.1.3.3 Materiales de Plástico

- Cajas Petri estériles de 100 y 60 mm de diámetro
- Criotubos estériles de 2 ml
- Frascos estériles de cultivo de 250 ml
- Guantes
- Jeringas desechables de 50 ml
- Pipetas estériles de 5 y 10 ml
- Placas de 96 pozos de fondo plano estériles
- Puntas estériles amarillas de 2-200 μl
- Puntas estériles azules de 200-1000 μl
- Tubos estériles de centrifugación de 15 ml
- Tubos estériles de centrifugación de 50 ml
- Tubos tipo Eppendorf® de 1,5 ml

3.1.3.4 Otros Materiales

- Filtros Millipore® de 0,22 μm
- Micropipeta de 200 -1000 µl
- Micropipeta de 5 -50 µl
- Micropipeta de 50 -200 µl
- Micropipeta multicanal de 50- 200 µl
- Vela

3.1.3.5 Reactivos Químicos

- Ácido cítrico p.a.
- Agua bidestilada desionizada
- Bicarbonato de sodio anhidro p.a.

- Citrato de sodio p.a.
- Cloruro de sodio p.a.
- Dextrosa p.a.
- Dimetilsulfóxido (DMSO) p.a.
- D-sorbitol p.a
- Etanol p.a.
- Fosfato de potasio monobásico anhidro p.a.
- Fosfato de sodio dibásico anhidro p.a.
- Gentamicina p.a.
- Glicerol p.a.
- L-Glutamina p.a.
- Metanol p.a.
- Polvo Giemsa

3.1.3.6 Equipos

- Agitador magnético IKA
- Agitador vortex GENIE 2
- Autoclave
- Auxiliar de micropipeteado PIPETUS®.
- Balanza Analítica TOLEDO (0.0001 g. de sensibilidad)
- Baño-maría
- Cámara Flujo laminar SECURIPLUS PSM
- Desecador con llave de paso
- Centrífuga (14000 rpm) JOUAN CR3
- Congelador –70 °C REVCO
- Contómetro manual de células VWR
- Estufa básica para cultivo (37 °C) VWR
- Microscopio compuesto LEITZ
- pH meter CORNING
- Refrigerador LG
- Ultrasonicador BRANSON 3200

3.1.4 MANTENIMIENTO DE LA CEPA DE *Plasmodium berghei* Y EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMALÁRICA IN VIVO

3.1.4.1 Material Biológico

- Ratones machos sanos tipo Swiss con un peso de 18-22 g
- Sangre de ratón infectada con *Plasmodium berghei* cepa NK-65
- Extractos hidroalcohólicos de las especies a evaluar

3.1.4.2 Materiales de Vidrio

- Cámara de Thoma
- Láminas porta-objetos
- Pipeta de diluición para conteo de glóbulos rojos
- Tubos de hemólisis de 5 ml

3.1.4.3 Materiales de Plástico

- Criotubos estériles de 2 ml
- Guantes
- Jeringas de 1 ml

3.1.4.4 Otros Materiales

- Jaulas plásticas para roedores
- Micropipeta de 200 - 1000 µl
- Micropipeta de 50 - 200 µl
- Tijeras
- Tubos estériles de 15 ml

3.1.4.5 Reactivos Químicos

- Agua destilada desionizada
- Cloroformo p.a.
- Cloruro de Sodio p.a.
- Dimetilsulfóxido (DMSO) p.a.
- Glicerol p.a.
- Heparina sódica de 5000 UI/ml
- Metanol p.a.

- Polvo Giemsa
- Suero fisiológico

3.1.4.6 Equipos

- Agitador vortex GENIE 2
- Balanza Analítica TOLEDO (0.0001 g. de sensibilidad)
- Baño-maría
- Contómetro manual de células VWR
- Microscopio compuesto LEITZ
- Ultrasonicador BRANSON 3200

3.1.5 FRACCIONAMIENTO DEL EXTRACTO DE *Geissospermun reticulatum*

3.1.5.1 Material Biológico

- 200 g de muestra seca y molida de las especies a fraccionar

3.1.5.2 Materiales de Vidrio

- Balones de vidrio de 250 ml
- Embudos de vidrio
- Matraces Erlenmeyer de 1000 ml
- Peras de decantación
- Pipetas Pasteur
- Probeta de 1000 ml

3.1.5.3 Otros Materiales

- Papel de filtro
- Viales

3.1.5.4 Reactivos Químicos

- Acetato de etilo p.a.
- Ácido cítrico p.a.
- Agua destilada
- Cloroformo p.a.
- Etanol p.a.
- Hexano p.a.

- Hidróxido de sodio p.a.
- Reactivo de DRAGENDORF
- Yoduro de potasio p.a.

3.1.5.5 Equipos

- Balanza Analítica TOLEDO (0.0001 g de sensibilidad)
- pH meter CORNING
- Rotaevaporador BÜCHI

3.2. MÉTODOS

3.2.1 PRESELECCIÓN Y SELECCIÓN DE LAS ESPECIES

- Tras una revisión bibliográfica sobre etnobotánica de plantas amazónicas, se preseleccionaron un total de 82 especies utilizadas de forma tradicional para tratamiento de los síntomas relacionados a la malaria.
- Para la selección final de las 10 especies a ser evaluadas, se realizó primero un ordenamiento de las 82 especies en base a la frecuencia de uso reportada para cada una. En segundo lugar, esta lista fue sometida a una depuración con la base de datos del Instituto de Investigaciones Fármaco Bioquímicas de la Universidad Mayor de San Andrés y del Institut de Recherche pour le Développement (I.R.D.) ambos de la Paz - Bolivia, luego de la cual se descartaron aquellas especies que presentaban estudios previos de actividad antiplasmodial. Finalmente, con la ayuda de un botánico, se verificó la disponibilidad y accesibilidad de las especies restantes, esto en cuanto a facilitar la posterior colecta de las muestras. Las especies seleccionadas para ser evaluadas así como la parte colectada de la planta, se muestran en la **Tabla Nro. 1**; además de algunas de sus características que se muestran en el **Anexo III.**

3.2.2 COLECTA Y PREPARACIÓN DE MUESTRAS

- Las muestras fueron colectadas en 2 lugares: a) el Arboretum CIEFOR de la UNAP, ubicado en la localidad de Puerto Almendras, Iquitos-Perú y b) los alrededores del lago Pañacocha, ubicado en las cercanías del caserío Nina Rumi (**Figura 22**); a excepción de *Geissospermun reticulatum* que fue colectada en el Centro Experimental Fitzcarrald del IIAP en el departamento de Madre de Dios.
- En todos los casos las muestras colectadas fueron de individuos adultos (presencia de flores y/o frutos). La identificación taxonómica de las muestras colectadas se realizó en el Herbarium Amazonense de la Universidad Nacional de la Amazonía Peruana con la ayuda de un botánico y por comparación de las muestras existentes.

- Posteriormente, las muestras colectadas fueron puestas a secar a temperatura ambiente protegidas de la incidencia directa de la luz solar por aproximadamente 5 días. Transcurrido el tiempo y luego de comprobar la sequedad de las muestras, estas fueron completamente molidas para facilitar el contacto de la materia vegetal con el solvente y de este modo mejorar el proceso de extracción (MUÑOZ et al., 2000).

3.2.3 PREPARACIÓN DE LOS EXTRACTOS HIDROALCOHÓLICOS (MUÑOZ et al., 2000)

- 25 g de cada una de las muestras preparadas (secas y molidas), fueron sometidas a un proceso de extracción por maceración en una solución de etanol-agua (70/30), en un volumen aproximado al doble del volumen de la muestra, por 48 horas a temperatura ambiente y protegidas de la luz solar.
- El solvente utilizado fue eliminado con la ayuda de un rotaevaporador con bomba de vacío y el residuo (extracto hidroalcohólico) almacenado en viales protegidos de la incidencia directa de la luz solar, para su posterior evaluación.

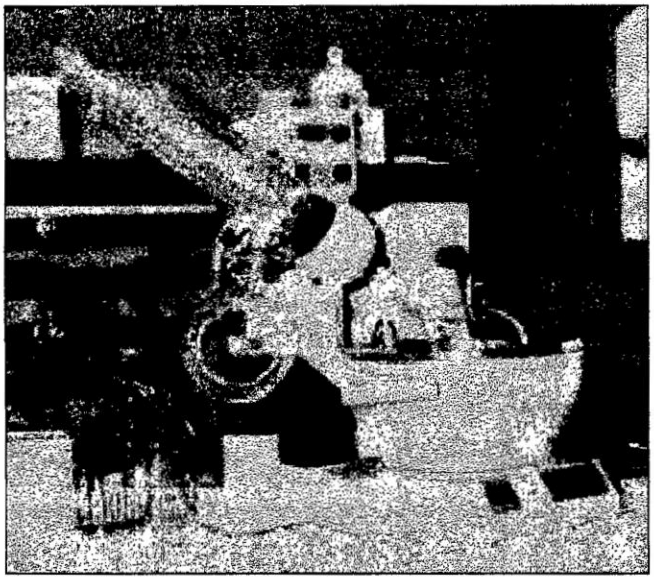


Figura 21 : Eliminación del solvente de los extractos hidroalcohólicos mediante rotaevaporación al vacío

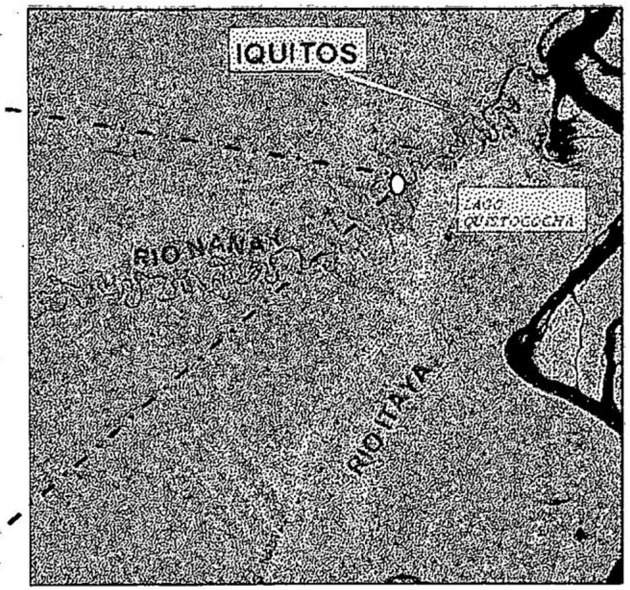


Figura 22 : Localización de las zonas de colecta de las muestras de Iquitos

Tabla Nro. 1

Plantas seleccionadas para la evaluación de actividad antimalárica in vivo e in vitro

Nombre Científico	Familia	Nombre Común	Parte planta	% Rend (*)	Procedencia
Aspidosperma rigidum Rugby	Apocynaceae	Remo caspi	Corteza	8.7	Paña Cocha
Campsiandra angustifolia Spruce ex Bentham	Fabaceae	Huacapurana	Corteza	12.0	CIEFOR
Crescentia cujete L.	Bignoniaceae	Huingo	Hojas	19.1	CIEFOR
Doliocarpus dentatus (Aublet) Standley Subsp.	Dilleniaceae	Paujil chaqui	Tallo	15.8	Paña Cocha
Erythrina fusca Loureiro	Fabaceae	Amasisa	Corteza	3.0	Paña Cocha
Euterpe oleraceae C. Martius	Arecaceae	Huasaí	Raíz	8.3	CIEFOR
Geissospermun reticulatum A. Gentry	Apocynaceae	Quina quina	Corteza	2.2	M. de Dios
Grias neuberthii J.F. Macbride	Lecythidaceae	Sachamango	Corteza	10.4	Paña Cocha
Remijia peruviana Standley	Rubiaceae	Cascarilla	Corteza	22.1	Paña Cocha
Virola calophylla Warburg	Myristicaceae	Cumala blanca	Corteza	15.6	Paña Cocha

(*) Porcentajes de rendimiento expresados en función del peso de la muestra seca y molida

3.2.4 EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMALÁRICA IN VITRO MEDIANTE EL TEST DE INHIBICIÓN DE LA BIOMINERALIZACIÓN DE LA FERROPROTOPORFIRINA IX (FBIT) (DEHARO et al., 2002)

- En una placa de 96 pozos no estéril se colocaron en estricto orden:

  a) 50 µl de solución de Clorhidrato de Hemina Bovina en DMSO por pozo, a una concentración de 0.5 mg/ml.

  b) 100 µl de Buffer Acetato de Sodio pH = 4.4 por pozo (ver preparación en el **Anexo 1.1**).

  c) 50 µl de cada uno de los extractos hidroalcohólicos disueltos en Dimetil Sulfóxido (DMSO) a una concentración de 10 mg/ml. 50 µl de DMSO fue utilizado como control. Cloroquina difosfato (CQ) en concentraciones de 0.025 a 0.00625 mg/ml fue utilizado también como control positivo en el ensayo. Tanto los extractos como los controles, fueron colocados por triplicado.

- La placa cargada fue colocada dentro de la estufa a una temperatura constante de 37 °C por 18-24 horas.
- Transcurrido el tiempo la placa fue centrifugada a 3000 rpm durante 5 minutos y el sobrenadante eliminado sacudiendo con fuerza la placa de arriba a abajo.
- En seguida se colocaron 200 µl de DMSO en cada pozo y nuevamente fue centrifugada a 3000 rpm durante 5 minutos, eliminándose el sobrenadante de la misma forma.
- Posteriormente se colocó 150 µl de hidróxido de sodio (NaOH) 0,1 N en cada pozo, se agitó la placa por 30 segundos y se realizó la lectura de la absorbancia a una longitud de onda de 405 nm utilizando un lector ELISA.
- El porcentaje de inhibición para cada extracto fue calculado mediante la siguiente fórmula:

$$\% \text{ inh} = \frac{PAC - PAE}{PAC} \times 100$$

% Inh = Porcentaje de Inhibición

PAC = Promedio de la absorbancia del control

PAE = Promedio de la absorbancia del extracto

- Aquellos extractos que a la dosis evaluada (10 mg/ml) mostraron un porcentaje de inhibición superior al 50%, fueron considerados activos. Por ello, de estos extractos se realizaron diluciones seriadas (5, 2.5, 1.25 y 0.625 mg/ml), se calculó su porcentaje de inhibición y se determinó la IC_{50} (Concentración que Inhibe el 50 % de la Biomineralización de la Ferroprotoporfirina IX) utilizando la función TENDENCIA del programa Microsoft Excel (ver **Anexo II, Cálculo de la IC_{50}**).

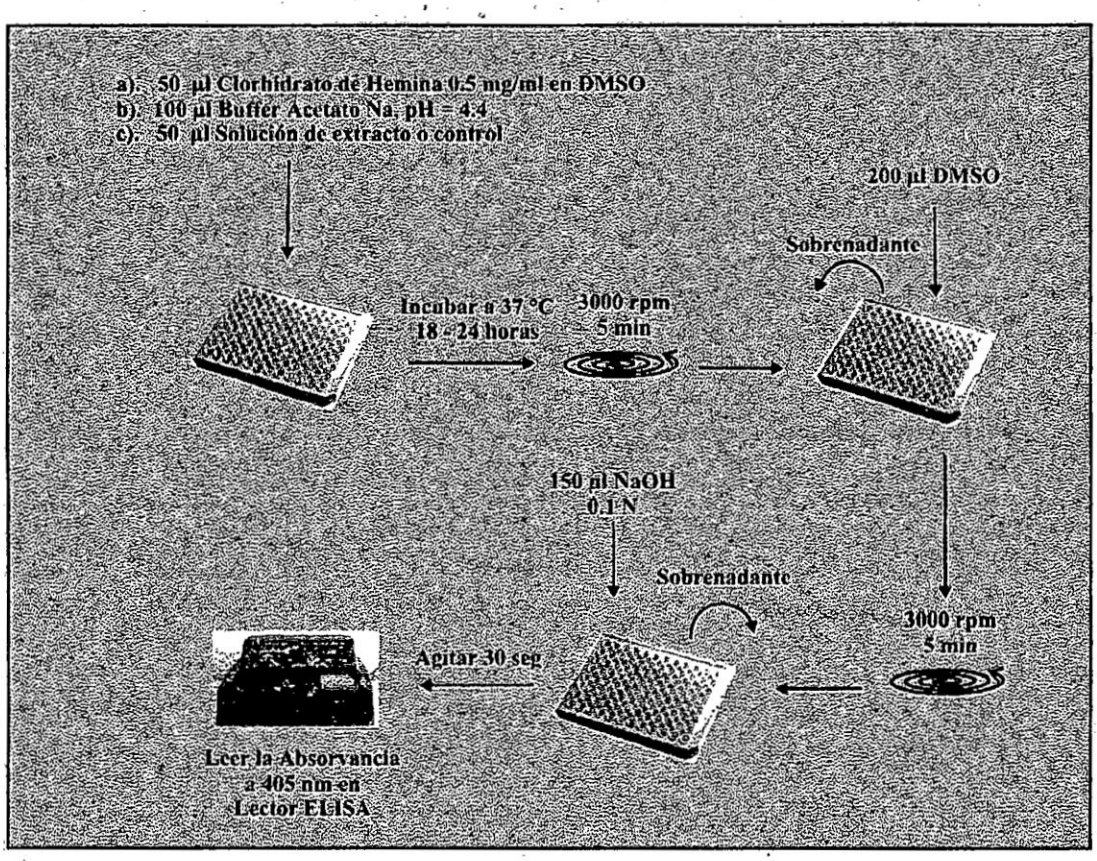


Figura 23 : Esquema de la metodología del Test de Inhibición de la Biomineralización de la Ferroprotoporfirina IX

3.2.5 CULTIVO DE LOS ESTADÍOS INTRAERITROCITARIOS DE *Plasmodium falciparum* Y EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMALÁRICA IN VITRO

3.2.5.1 Cultivo de los Estadíos Intraeritrocitarios de *Plasmodium falciparum* (Cepa F–32, Cloroquina Sensible)

3.2.5.1.1 Preparación del material biológico

3.2.5.1.1.1 Glóbulos rojos lavados (DEHARO et al. 2000)

- Se colectó sangre del grupo O Rh (+) en forma estéril, empleando 1,5 ml del anticoagulante ACD (ver preparación en el **Anexo 1.7**) por cada 10 ml de sangre. La sangre colectada fue transferida a un tubo estéril de centrifugación de 15 ml y centrifugada durante 10 minutos a 2000 rpm. Es importante mencionar que los donadores no recibieron tratamiento alguno en los días previos a la toma de sangre.
- Con la ayuda de una pipeta Pasteur se procedió a retirar la fase superior (plasma) y eliminar la capa intermedia que contiene los elementos nucleados de la sangre, dejando sólo los eritrocitos (todo este procedimiento fue realizado bajo campana de flujo laminar).
- Los eritrocitos obtenidos fueron centrifugados dos veces más durante 5 minutos a 2000 rpm, resuspendiéndolos cada vez en un volumen de medio RPMI igual al plasma que se eliminó.
- El sobrenadante de la última centrifugación fue eliminado y los eritrocitos almacenados a 4 °C para ser utilizados en los cultivos.

3.2.5.1.1.2 Suero humano descomplementado (DEHARO et al., 2000)

- Se colectó aproximadamente 100 ml de sangre del grupo O Rh (+) sin anticoagulante en forma estéril y se la trasvaso a tubos estériles de centrifugación de 50 ml dejándose retraer el coágulo por espacio de 3 horas. Luego se centrifugó durante 15 minutos a 2000 rpm.
- La fase superior (suero) fue trasvasada a otro tubo de centrifugación estéril de 50 ml y centrifugado nuevamente por 15 minutos a 2000 rpm para eliminar los GR que quedan retenidos en el suero.

- El suero obtenido fue luego esterilizado por filtración con un filtro tipo Millipore® de 0,22 µm, bajo flujo laminar.
- Finalmente el suero estéril fue descomplementado colocándolo en baño maría por 45 minutos a 56 °C, y almacenado a – 20 °C para su uso posterior.

3.2.5.1.1.3 Medio RPMI-1640 (Roswell Park Memorial Institute) (DEHARO et al., 2000)

- En un matraz Erlenmeyer de 1000 ml se disolvió todo contenido del frasco de RPMI 1640 (15,89 g) modificado con HEPES y sin bicarbonato de sodio, en 1000 ml de agua bidestilada desionizada. Luego se añadió:

  a). 60 mg de gentamicina;

  b). 2,1 g de bicarbonato de sodio.

- El pH de medio fue ajustado a 7,4 con soluciones saturadas de HCl y NaOH, luego de lo cual fue esterilizado por filtración con filtro tipo Millipore® de 0,22 μm bajo flujo laminar. El contenido fue dividido en frascos estériles de 250 ml y se almacenaron a 4 °C hasta su uso.

3.2.5.1.2 Descongelación (CHRISTOFINIS And MILLER, 1983)

- Antes de empezar con el proceso de descongelación de la cepa, se precalentaron en baño maría a 37 °C, todas las soluciones de descongelación (ver la preparación en el **Anexo 1.2**).
- Se retiraron del congelador a –50 °C los criotubos conteniendo los GR infectados y se descongelaron en baño-maría a 37 °C, durante 1 minuto.
- Todo el contenido ya descongelado de los criotubos (aproximadamente 0,5 ml) fue colocado en un tubo de centrifugación estéril de 15 ml y se añadió 0,1 ml de la **solución A** (Cloruro de Sodio al 12%), aproximadamente 1 gota por segundo y agitando con suavidad.

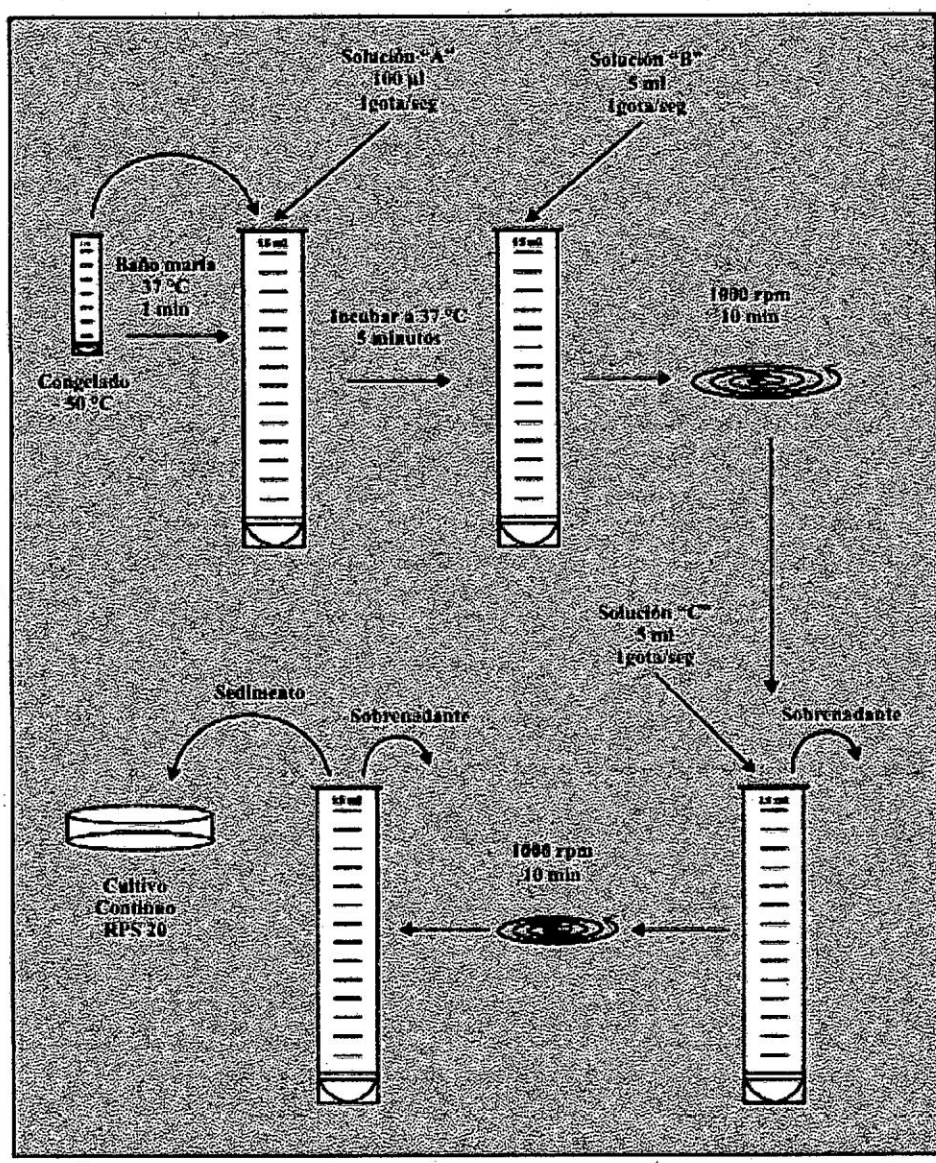


Figura 24 : Esquema de la técnica de Descongelación

- Se dejó en reposo el tubo durante 5 minutos y luego se añadió 5 ml de la **solución B** (Cloruro de Sodio ál 1.6 %), aproximadamente 1 gota por segundo y agitando con suavidad. Se centrifugó a 1000 rpm durante 10 minutos y se eliminó el sobrenadante, teniendo cuidado de no dejar completamente seco el sedimento.

- Luego se añadió 5 ml de la **solución C** (Cloruro de Sodio 0.9%, dextrosa 0.2 %), una gota por segundo aproximadamente agitando con suavidad. Se centrifugó a 1000 rpm durante 10 minutos y se eliminó el sobrenadante, sin dejar seco el sedimento, quedando listo para su adaptación al cultivo.
- Con una pequeñísima cantidad de glóbulos rojos infectados que quedaron en el fondo del tubo se realizó un frotis según la metodología descrita en el acápite **3.2.5.2.2.3,** para verificar la parasitemia utilizando la fórmula descrita en el acápite **3.2.5.1.3** y el estado general de los parásitos.

3.2.5.1.3 Adaptación al cultivo (TRAGER And JENSEN, 1976)

- El sedimento descongelado conteniendo los GR parasitados fue colocado en una caja Petri estéril de 60 mm de diámetro, en la cual se colocó 5 ml de medio de RPMI suplementado con suero humano al 20 por ciento (4 ml de RPMI+1 ml de suero) previamente atemperados a 37 °C.

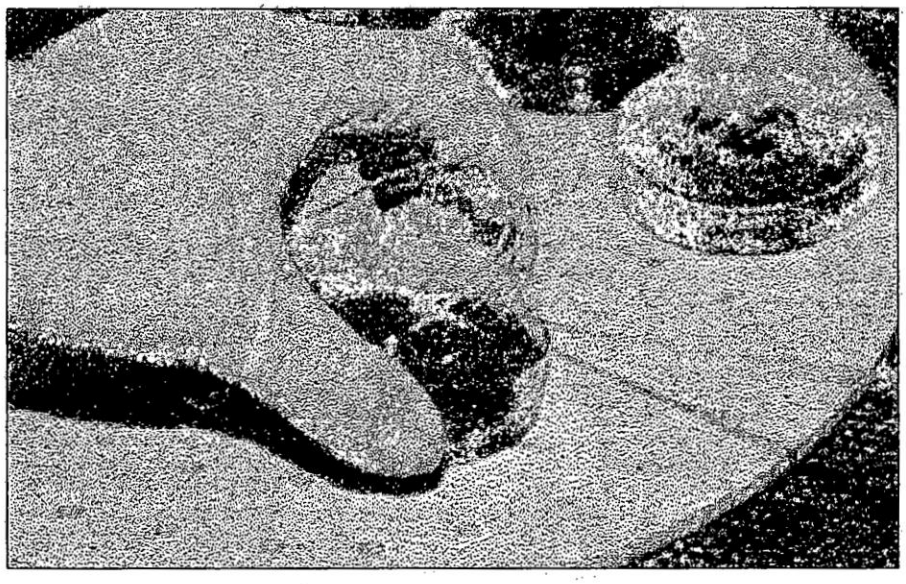


Figura 25 : Cambio de medio del cultivo continuo en caja petri de *Plasmodium falciparum*.

- La caja Petri fue colocada en una estufa básica a 37 °C, dentro de un desecador de vidrio con llave de paso y una vela encendida en su interior, la que al consumirse permite la salida del oxígeno y la saturación al interior del anhídrido carbónico. Este proceso crea al interior del desecador una atmósfera de microaerofilia (aproximadamente 5% de CO_2, 3 % de O_2 y 92% de N_2), indispensable para el desarrollo del parásito. (WAKI et al., 1984).

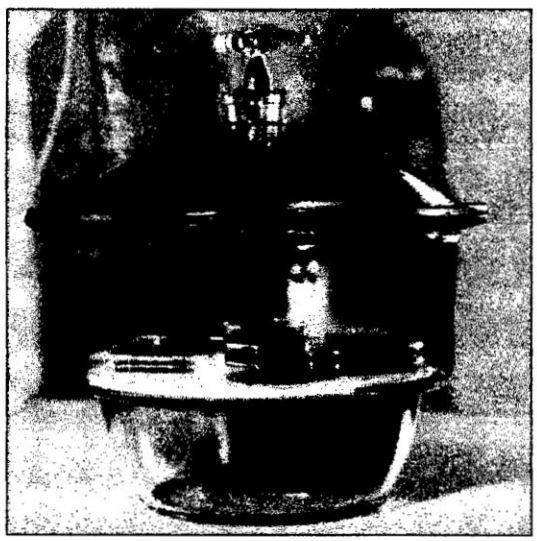


Figura 26 : Desecador o candel jar conteniendo cajas petri y placas de 96 pozos con cultivo de *Plasmodium falciparum*. La atmósfera de microaerofilia es proporcionada al consumirse la llama de la vela que está en su interior.

- Cada 24 horas se realizó el cambió del medio de cultivo y control de la parasitemia. Para ello se retiró la caja petri de la estufa y se dejó reposar por 10 minutos para permitir la sedimentación de los GR. Transcurrido el tiempo, bajo campana de flujo y con ayuda de una pipeta Pasteur estéril se retiró la fase superior.
- Luego, con una gota del sedimento se realizó un frotis según la metodología descrita en el acápite **3.2.5.2.2.3** y se determinó la parasitemia del cultivo, mediante la siguiente fórmula:

$$P = \frac{GRP \times 100}{GRT}$$

P = Parasitemia (expresada en porcentaje %)

GRP = Glóbulos rojos parasitados

GRT = GR totales (suma de GR parasitados y no parasitados)

- Con este dato se procedió a eliminar la cantidad necesaria de GR parasitados y agregar GR lavados, para mantener una parasitemia del 1%, teniendo en cuenta que en el sedimento existe aproximadamente 250 µl.
- Se añadió luego 5 ml de medio RPMI suplementado con suero al 20% y se colocó la caja Petri nuevamente en la estufa a una temperatura constante de 37 °C dentro del desecador con la vela encendida. El porcentaje de suero colocado diariamente al cultivo, fue descendiendo paulatinamente hasta llegar al 10%, porcentaje indicado para mantener el cultivo.

3.2.5.1.4 Congelación de la cepa (CHRISTOFINIS And MILLER, 1983)

- Previamente se verificó que la parasitemia del cultivo fuese de 4% y que existía por lo menos un 80% de parásitos en el estadío de "anillo".
- Se tomó todo el contenido del cultivo mencionado, se trasvasó a un tubo estéril de 15 ml y se centrifugó a 1000 rpm durante 10 minutos. Luego se eliminó el sobrenadante y se añadió 1 volumen de medio RPMI por volumen de sedimento, se centrifugó durante 10 minutos a 1000 rpm y se eliminó el sobrenadante.
- Luego se añadió 4 volúmenes de la solución crioprotectora para congelación (ver preparación en el **Anexo 1.3**) por volumen de sedimento, gota a gota y agitando con suavidad.
- El producto homogenizado obtenido fue distribuido en alícuotas de 0,5 ml en criotubos estériles y congelados inmediatamente a - 20 °C por 24 horas.

- Transcurrido el tiempo los criotubos fueron trasladados al congelador a –50 °C, previamente identificados y fechados.

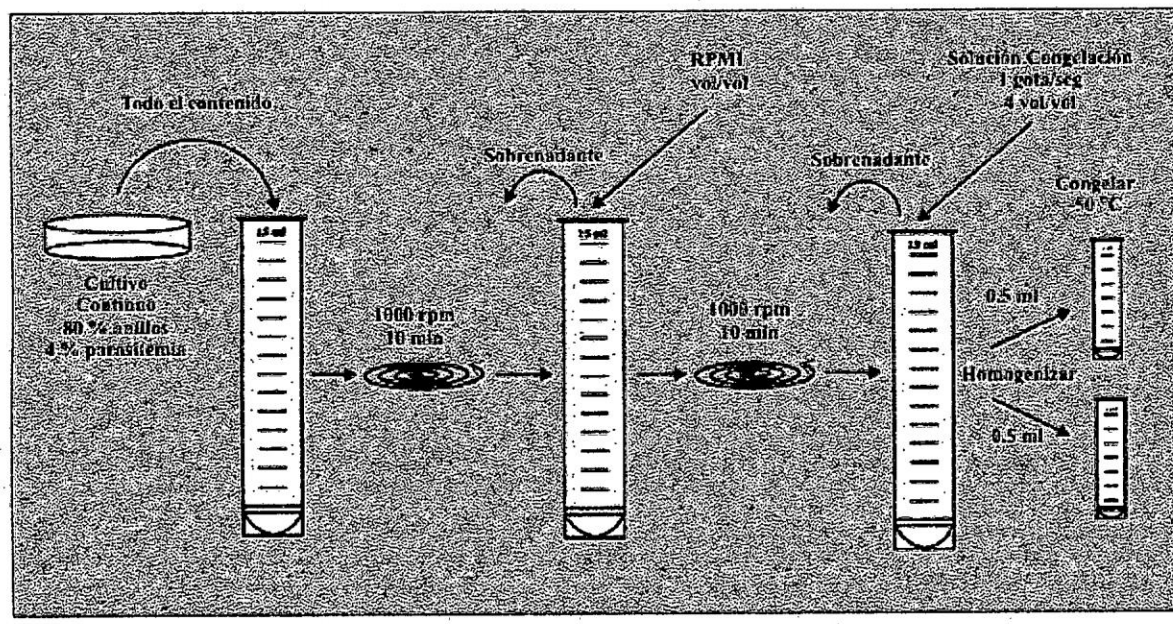


Figura 27 : Esquema de la técnica de congelación

3.2.5.2 Evaluación de la Actividad Antimalárica In Vitro Contra *Plasmodium falciparum* (Cepa F –32, Cloroquina Sensible)

3.2.5.2.1 Sincronización (concentración de parásitos en el estadío de anillo) (LAMBROS And VANDERBERG, 1979)

- Se tomó todo el contenido del cultivo de una caja Petri con predominancia del estadío de anillo, se trasvasó a un tubo estéril de 15 ml y se centrifugó a 1000 rpm durante 5 minutos.
- Se eliminó el sobrenadante y se añadió 9 volúmenes de la solución de sincronización por volumen de sedimento (ver la preparación en el **Anexo 1.4**).
- Se dejó en reposo por 10 minutos a 37 °C y se centrifugó a 1000rpm durante 5 minutos.
- Nuevamente se eliminó el sobrenadante y el sedimento fue colocado en una caja petri con 5 ml medio RPMI suplementado al 10 % con suero humano.

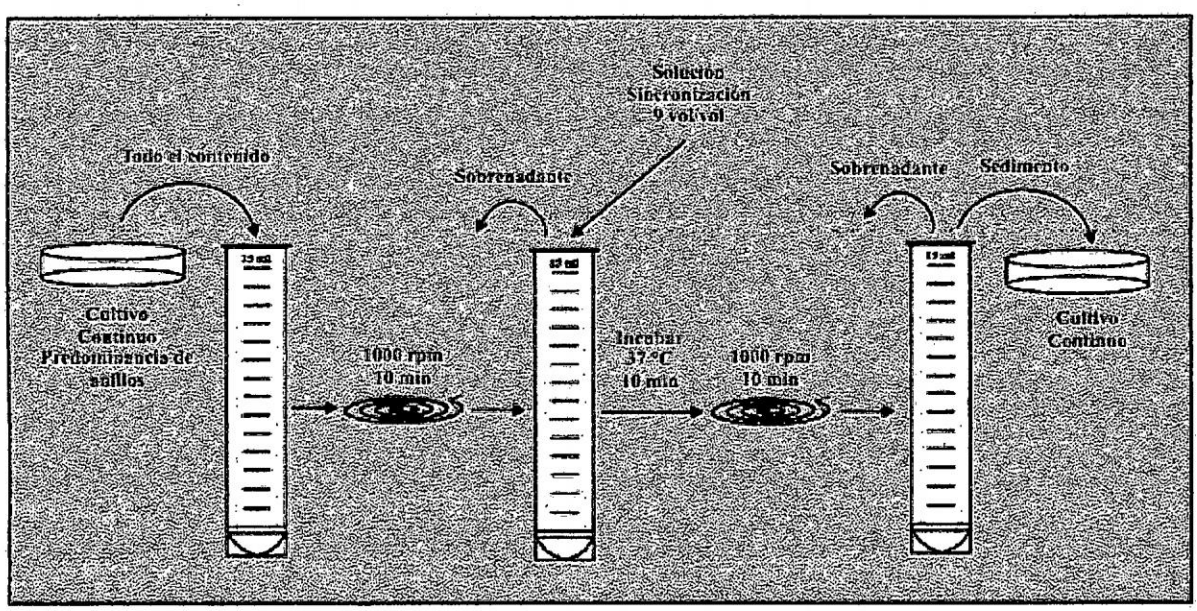


Figura 28 : Esquema de la técnica de sincronización

3.2.5.2.2 Evaluación de la actividad antimalárica in vitro mediante el método visual (LE BRAS And DELERON, 1983)

3.2.5.2.2.1 Preparación de las soluciones de extractos hidroalcohólicos

- Se preparó una **solución madre** de cada extracto a una concentración de 10 mg/ml en DMSO, con la ayuda de un agitador vortex. En algunos casos fue necesario llevar las soluciones a baño maría y/o ultrasonido debido a la poca solubilidad que presentaron.
- A partir de la solución madre se prepararon las siguientes diluciones seriadas:

Soluc.	Concentración	Composición
(a)	200 µg/ml	980 µl de RPMI + 20 µl de **solución madre**
(b)	20 µg/ml	900 µl de RPMI + 100 µl de **solución (a)**
(c)	2 µg/ml	900 µl de RPMI + 100 µl de **solución (b)**

- En algunos casos fue necesario preparar soluciones a 0,2 µg/ml, debido a que la IC_{50} de algunos extractos se encontraban por debajo de 1 µg/ml.

3.2.5.2.2.2 Preparación de la placa

- Se llenaron los pozos del borde superior e inferior de la placa de 96 pozos estéril, con 200 µl de agua destilada, para mantener la humedad suficiente y evitar el "efecto borde".
- Luego se preparó 8 ml de suspensión globular de la siguiente forma:

a) 6,4 ml de RPMI

b) 1,6 ml de Suero

c) 320 µl de suspensión de GR sincronizados con el estadío de "anillo" del parásito y una parasitemia del 2%.

- Se distribuyó 100 µl de la suspensión globular en cada uno de los 72 pozos restantes de la placa y se añadió 100 µl de las suspensiones de droga por triplicado, de tal forma que la concentración final de los extractos fue de 100, 10 y 1µg/ml y en algunos casos de 0,1 µg/ml. Como controles o testigos, se utilizaron 100 µl de DMSO y cloroquina difosfato. Todo este procedimiento se llevó a cabo bajo flujo laminar.

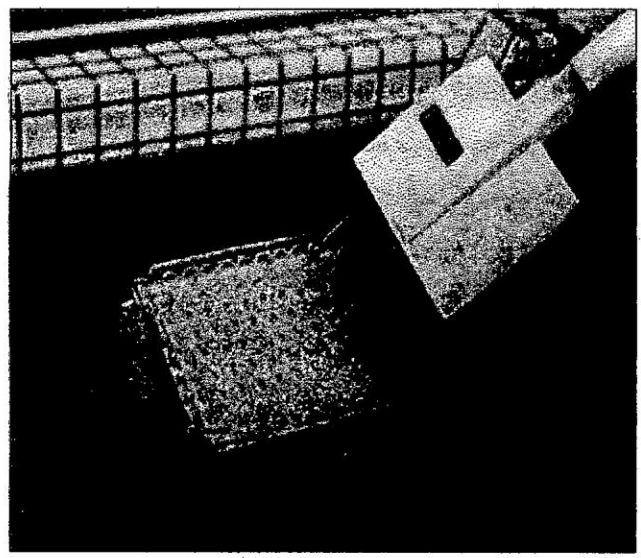


Figura 29 : Llenado de la placa de 96 pozos con la suspensión de glóbulos rojos parasitados.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Θ	Θ	Θ	Θ	Θ	Θ	Θ	Θ	Θ	Θ	Θ	Θ
B	T	T	T	2a	2a	2a	4a	4a	4a	6a	6a	6a
C	1c	1c	1c	3c	3c	3c	5c	5c	5c	CQc	CQc	CQc
D	1b	1b	1b	3b	3b	3b	5b	5b	5b	CQb	CQb	CQb
E	1a	1a	1a	3a	3a	3a	5a	5a	5a	CQa	CQa	CQa
F	2c	2c	2c	4c	4c	4c	6c	6c	6c	7c	7c	7c
G	2b	2b	2b	4b	4b	4b	6b	6b	6b	T	T	T
H	Θ	Θ	Θ	Θ	Θ	Θ	Θ	Θ	Θ	Θ	Θ	Θ

Figura 30 : Esquema de distribución de los extractos en la placa de 96 pozos

[A]	=	200 µl de agua destilada
1a,2a,...	=	extracto 1, 2,..... a una concentración de 100 µg/ml
1b,2b,...	=	extracto 1, 2,..... a una concentración de 10 µg/ml
1c,2c,...	=	extracto 1, 2,..... a una concentración de 1 µg/ml
CQa,b,c	=	cloroquina difosfato a 0.1, 0.01 y 0.001 µg/ml
T	=	Testigo DMSO

- Una vez llena la placa, se colocó en la estufa por 48 horas a 37 °C siguiendo el mismo procedimiento utilizado para el cultivo en caja Petri.

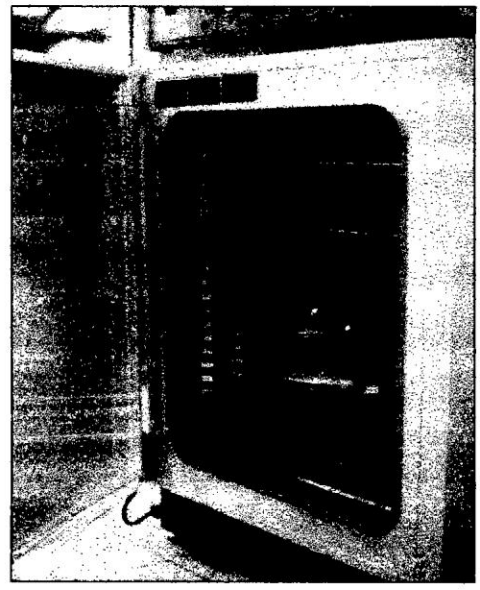


Figura 31 : Estufa básica con el desecador en su interior conteniendo los cultivos de *Plasmodium falciparum.*

3.2.5.2.2.3 Realización del frotis

- Luego de 48 horas de incubación se retiró la placa de la estufa y se eliminó la fase superior del cultivo y se realizó un frotis de cada pozo.

- Se fijaron los frotis rápidamente con metanol durante 1 minuto y se tiñeron con el colorante Giemsa (ver **Anexo 1.5**) diluido al 10% con buffer fosfato (ver **Anexo 1.6**) por 45 minutos. Transcurrido el tiempo se lavó y se secó los frotis y fueron leídos al microscopio con objetivo de 100X.

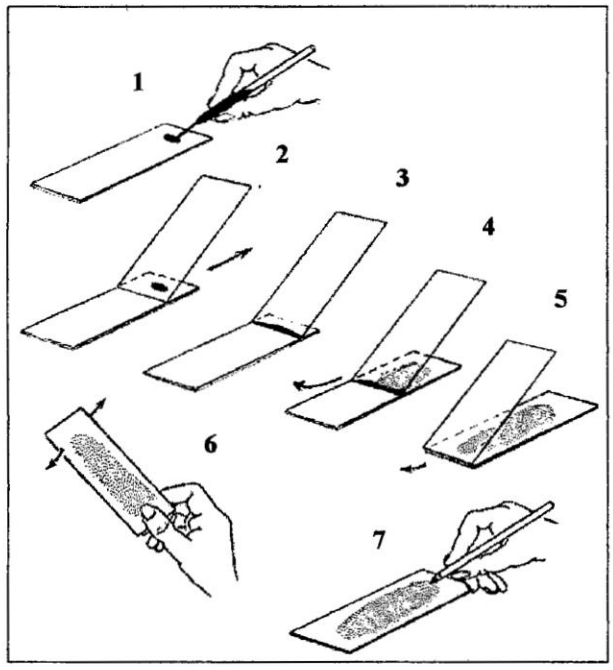


Figura 32 : Esquema detallado para la realización de un frotis a partir de sedimento globular o sangre total

3.2.5.2.3 Determinación de la IC_{50} (LE BRAS And DELERON, 1983; MUÑOZ et al., 2000)

- Se realizó el cálculo de la parasitemia por cada pozo haciendo un recuento de GR parasitados y no parasitados del frotis, de un total de 2000 GR, usando la fórmula descrita en el acápite **3.2.5.1.3** y se calculó el porcentaje de inhibición para cada extracto mediante la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Inh} = \frac{\text{PPT} - \text{PPE}}{\text{PPT}} \times 100$$

% Inh = Porcentaje de Inhibición

PPT = Promedio de la parasitemia del testigo

PPE = Promedio de la parasitemia del extracto

- Con los Porcentajes de Inhibición obtenidos se procedió a determinar la IC_{50} (Concentración a la cual el extracto inhibe el 50% del desarrollo del parásito) usando la función TENDENCIA del programa Microsoft Excel (ver **Anexo II, Cálculo de la IC_{50}**).
- Los resultados obtenidos fueron clasificados según DEHARO et al., (2001), de la siguiente manera:

  * Si la IC_{50} fue menor a **5 µg/ml**, se consideró que la actividad del extracto fue **buena**.

  * De **5** a **10 µg/ml**, se consideró que la actividad del extracto fue **moderada**.

  * Superior a **10 µg/ml**, el extracto fue considerado **inactivo**.

3.2.6 CULTIVO DE LOS ESTADÍOS INTRAERITROCITARIOS DE *Plasmodium berghei* Y EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMALÁRICA IN VIVO

3.2.6.1 Cultivo de los Estadíos Intraeritrocitarios de *Plasmodium berghei* (Cepa NK–65)

3.2.6.1.1 Descongelación de la cepa a partir de sangre infectada congelada

- Se retiraron los criotubos del congelador a –50 °C, conteniendo 0,5 ml de sangre parasitada con ESTADÍOS eritrocitarios de *Plasmodium berghei* y se colocaron en baño-maría a 37 °C por 1 minuto.
- Inmediatamente descongelado se procedió a inyectar a 3 ratones, 100 µl de esta suspensión globular por vía intraperitoneal.
- Los ratones infectados fueron colocados en jaulas previamente identificadas con el nombre de la cepa y el día de la inoculación. Periódicamente se les suministró alimento y agua.

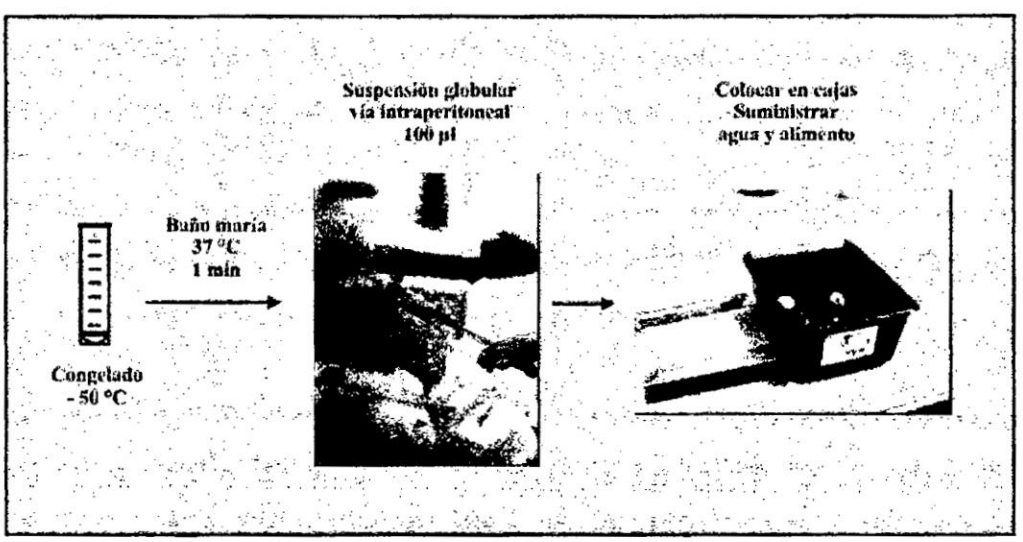


Figura 33 : Esquema de la técnica de descongelación de sangre total de ratones parasitada con *Plasmodium berghei*

3.2.6.1.2 Mantenimiento in vivo de la cepa

- Se realizó un pequeño corte en la vena de la cola de los ratones infectados con la ayuda de una tijera, se tomó una gota de sangre en un portaobjeto, se realizó un frotis y se procedió a su tinción siguiendo el procedimiento descrito en el acápite **3.2.5.2.2.3**.
- Se evaluó la parasitemia usando la fórmula descrita en el acápite **3.2.5.1.3** y se eligió el ratón con la parasitemia más elevada, del cual se tomó algunas gotas de sangre infectada directamente de la cola hacia un tubo de hemólisis con 1 ml de suero fisiológico y se procedió a inyectar a 3 ratones sanos 100 µl de esta suspensión globular por vía intraperitoneal.
- Los ratones infectados fueron colocados en jaulas previamente identificadas con el nombre de la cepa y el día de la inoculación. Periódicamente se les suministró alimento y agua.
- Este traspase de la cepa de *Plasmodium berghei* de un ratón infectado hacia ratones sanos se realizó cada 5 días.

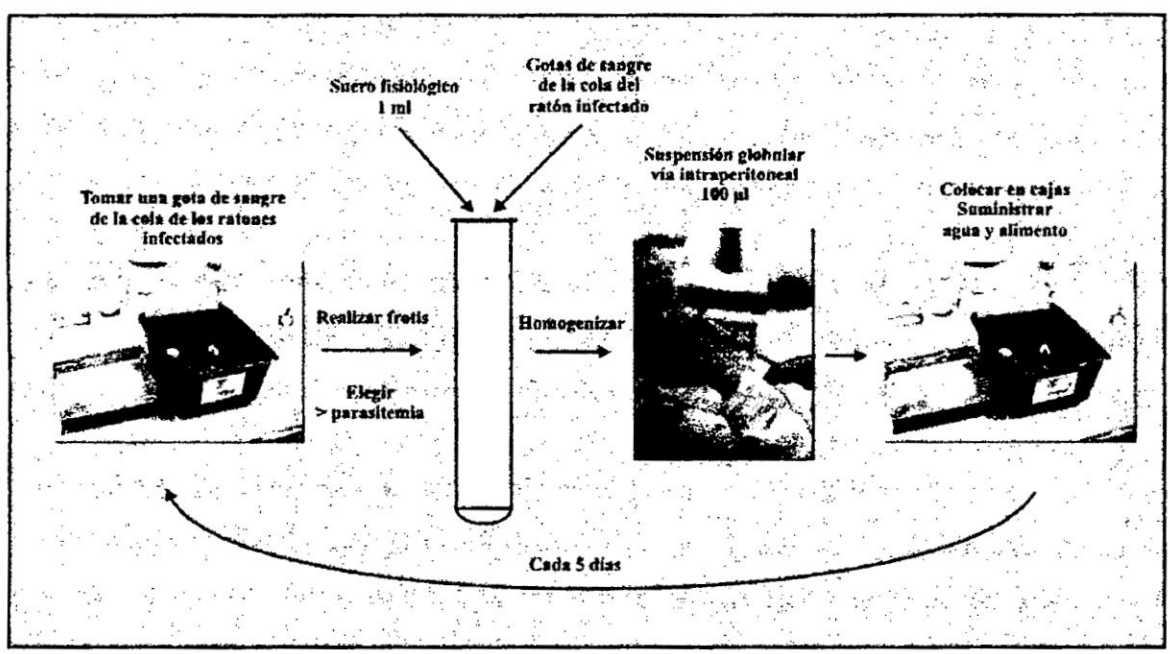


Figura 34 : Esquema de la técnica de mantenimiento in vivo de la cepa de *Plasmodium berghei.*

3.2.6.1.3 Congelación de la cepa

- Se evaluó la parasitemia de los ratones infectados siguiendo el procedimiento descrito en el párrafo anterior.
- Cuando la parasitemia de los ratones infectados llegó al 20%, se procedió tomar aproximadamente 1 ml de sangre mediante punción cardiaca con una jeringa de 1 ml conteniendo 100 µl de heparina. Para facilitar el trabajo, los ratones fueron previamente adormecidos con cloroformo.
- La sangre obtenida fue colocada en un tubo estéril de 15 ml, en el cual se añadió un volumen de solución de glicerol al 10% (1 ml de glicerol + 9 ml de NaCl a 0,9%) por volumen de sangre.
- Esta mezcla fue distribuida en criotubos estériles en alícuotas de 0,7 ml por tubo y colocados en el congelador a - 50 °C rotulados y fechados.

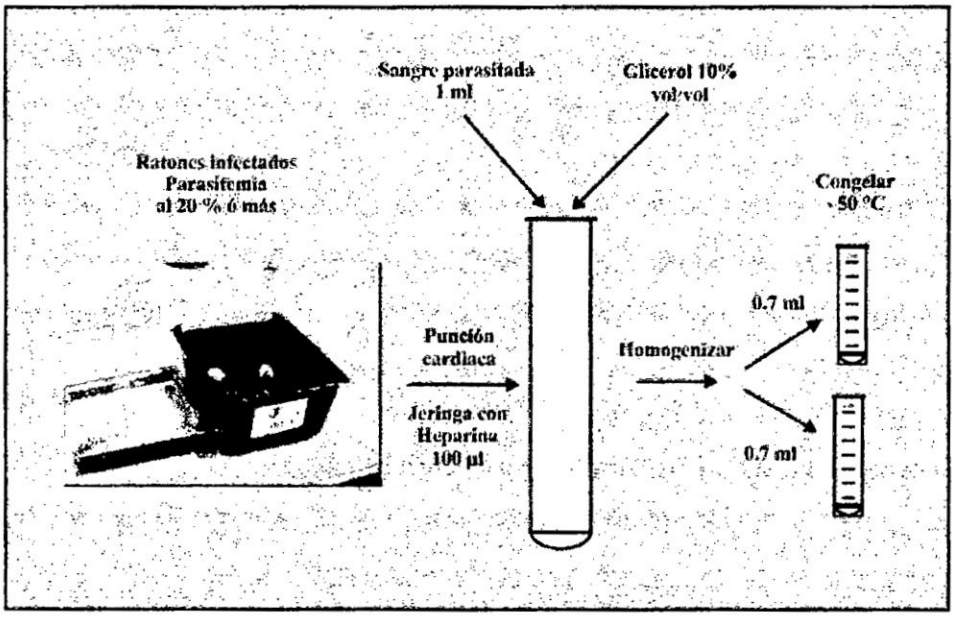


Figura 35 : Esquema de la técnica de Congelación de sangre total de ratones parasitada con *Plasmodium berghei*

3.2.6.2 Evaluación de la Actividad Antimalárica In Vivo Contra *Plasmodium berghei* (Cepa NK–65) Test Supresivo de 4 días o "Test de Peters" (PETER, 1970; PETERS And ROBINSON, 1992)

3.2.6.2.1 Cálculo del volumen y preparación de la suspensión de sangre parasitada para infectar los ratones

- Se evaluó la parasitemia (**P**) de los ratones infectados con *Plasmodium berghei* cepa NK – 65 y se identificó el ratón con mayor parasitemia. Luego se procedió a cargar una pipeta de numeración con la sangre del ratón hasta alcanzar la graduación 0,5, y con suero fisiológico hasta la graduación 101 de manera que se obtuvo una dilución de 1/200.
- Se homogenizó el contenido de la pipeta y se dejó en reposo en cámara húmeda.
- Antes de llenar la "cámara de Thoma" se homogenizó el contenido de la pipeta de numeración haciéndola girar horizontalmente por 30 seg. Luego se eliminó 5 gotas que corresponden al suero fisiológico que se quedó en la parte capilar y se procedió al llenado de la "cámara de Thoma".
- Se dejo en reposo la cámara por 10 minutos aproximadamente para permitir que sedimenten los GR.
- Se realizó el conteo de GR en los cuatro cuadrantes de los extremos de la cámara con objetivo de 40 X, y se calculó el promedio (**PGR**).

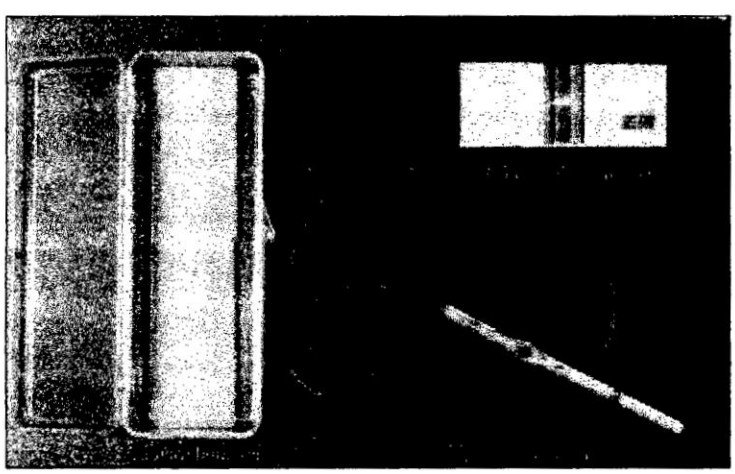


Figura 36a : Material de numeración

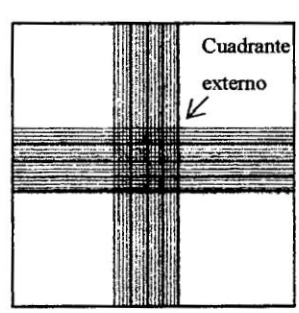


Figura 36b : Cámara de Thoma

- Con el promedio de GR y la parasitemia se procedió a calcular el número de parásitos existentes por ml de sangre total (**NP/ml**), mediante la siguiente fórmula:

$$NP/ml = PGR \times P \times 250 \times 200 \times 1000$$

NP/ml = Número de parásitos por ml de sangre total
PGR = Promedio de GR obtenido en la cámara de Thoma
P = Parasitemia
250 = Volumen por cuadrante en la cámara de Thoma
200 = Dilución en la pipeta de numeración
1000 = Factor de conversión a mililitros

- Luego, el número de parásitos requeridos para infectar al total de ratones (**NPR**) del experimento se calculó mediante la siguiente fórmula:

$$NPR = 10^7 \times NRG \times NG$$

NPR = Número de parásitos requeridos
10^7 = Número de parásitos requeridos por ratón
NRG = Número de ratones por grupo (en nuestro caso 5)
NG = Número de grupos

- El volumen de sangre total parasitada (**VSP**) necesario para preparar la suspensión de sangre fue calculado con la siguiente fórmula:

$$VSP = \frac{NPR \times 1000}{NP/ml}$$

VSP = Volumen de sangre total parasitada (µl)
NPR = Número de parásitos requeridos
NP/ml = Número de parásitos por ml de sangre total
1000 = Factor de conversión a µl.

- A continuación el calculó del volumen de suspensión de sangre parasitada (**VSSP**) necesaria para infectar al total de ratones en el experimento se realizó tomando en cuenta la siguiente fórmula:

$$VSSP = 100 \times NRG \times NG$$

VSSP = Volumen de suspensión de sangre parasitada (µl)
100 = Volumen (µl) de suspensión de sangre parasitada a inocular por ratón
NRG = Número de ratones por grupo
NG = Número de grupos

- El volumen de suero fisiológico (**VSF**) a utilizar para la preparación de la suspensión de sangre parasitada se calculó de la siguiente manera:

$$VSF = VSSP - VSP$$

VSF = Volumen de suero fisiológico (µl)
VSSP = Volumen de suspensión de sangre parasitada (µl)
VSP = Volumen de sangre total parasitada (µl)
NRG = Número de ratones por grupo
NG = Número de grupos

- Con los datos obtenidos se procedió a preparar la **suspensión de sangre parasitada** necesaria para inocular el grupo de ratones del experimento de la siguiente manera:

  a). En un tubo estéril de 15 ml, se colocó el volumen de suero fisiológico necesario (**VSF**)

  b). Mediante punción se extrajo del ratón donador, el volumen de sangre total parasitada (**VSP**) previamente calculada, con una jeringa de 1 ml. Se agregó la sangre al tubo con el suero y se mezcló con suavidad, hasta lograr una suspensión homogénea.

3.2.6.2.2 Cálculo del volumen y preparación de las suspensiones de extractos

- Antes de realizar los cálculos respectivos se realizó la formación de grupos de **5 ratones** según el número de extractos a evaluar más un grupo control. Para ello se pesó cada ratón y se los agrupó según la proximidad de sus pesos. Luego se realizó el cálculo del peso promedio de los ratones por grupo (**PRG**). Cada grupo de ratones fueron colocados en jaulas de plástico con suministro de alimento y agua.

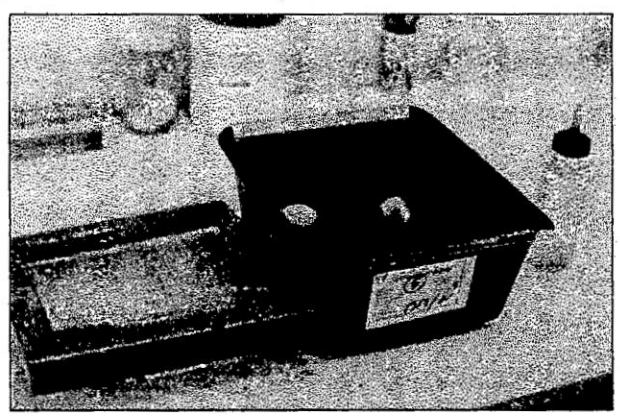


Figura 37a : Formación de los grupos de ratones, colocados en las cubetas de acuerdo al peso promedio

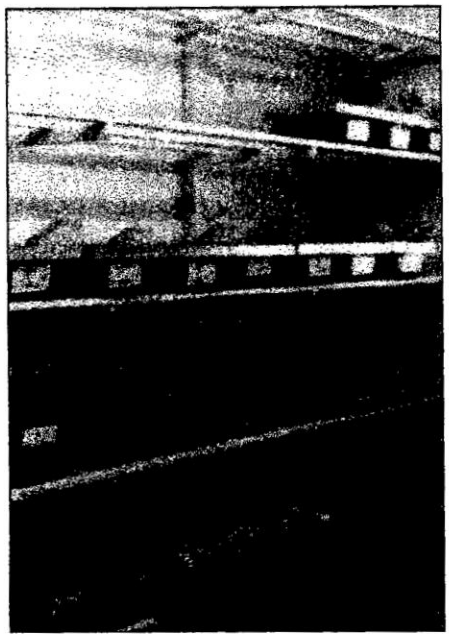


Figura 37b : Distribución de las cubetas en la sala de infección

- Luego el cálculo de volumen de solvente (**VS**) utilizado para disolver cada uno de los extractos e inocular los 5 ratones por grupo durante el experimento (4 días) se realizó mediante la siguiente fórmula:

$$VS = 100 \times NRG \times 4$$

VS = Volumen de solvente para disolver los extractos (µl)
100 = Volumen de la suspensión de extracto a inocular por ratón (µl)
NRG = Número de ratones por grupo
4 = Número de días que se realiza el tratamiento

- Finalmente se calculó la cantidad de cada extracto (**PE**) necesario disolver para obtener la concentración a evaluar, con la siguiente fórmula:

$$PE = \frac{C \times PRG \times NRG \times 4}{1000}$$

PE = Peso del extracto (mg)
C = Concentración del extracto a evaluar (mg/ml)
PRG = Peso promedio de los ratones por grupo
NRG = Número de ratones por grupo
4 = Número de días que se realiza el tratamiento
1000 = Factor de conversión a miligramos

- Con los datos obtenidos se procedió a preparar las suspensiones de extractos de la siguiente manera:

a). En un tubo de hemólisis estéril de 5 ml, se colocó la cantidad de extracto a disolver (**PE**) y se agregó el volumen de solvente requerido (**VS**).

b). Utilizando un agitador vortex y en algunos casos el baño maría y/o el ultrasonicador, se procedió a disolver los extractos y se almacenaron a 4 °C hasta el momento de su inoculación.

3.2.6.2.3 Infección y administración de las drogas

- Se procedió a inocular al total de ratones en el experimento 100 µl de la suspensión de sangre parasitada por vía intraperitoneal.

Figura 38 : Técnica para la Inoculación por vía intraperitoneal de la suspensión globular de sangre parasitada y de las suspensiones de droga

- Luego de dos horas de realizada la infección a los ratones se procedió a inocular 100 µl de la suspensión de extracto por vía intraperitoneal al grupo previamente establecido. Un grupo control fue inoculado con 100 µl de DMSO y otro con 100 µl de cloroquina a una dosis de 5 mg/kg. Este procedimiento se realizó durante 4 días consecutivos y siempre a la misma hora.
- El quinto día se procedió a realizar frotis de la cola de cada uno de los ratones, siguiendo el procedimiento descrito en el acápite **3.2.5.2.2.3,** para luego ser leídos con objetivo de 100X.

3.2.6.2.4 Determinación de los porcentajes de inhibición

- Sé calculó el promedio de la parasitemia en un total de 1000 GR, utilizando la fórmula descrita en el acápite **3.2.5.1.3,** para cada extracto evaluado y se obtuvo el porcentaje de inhibición, con la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Inh} = \frac{\text{PPGC} - \text{PPGT} \times 100}{\text{PPGC}}$$

% Inh = Porcentaje de inhibición
PPGC = Promedio de la parasitemia del grupo control
PPGT = Promedio de la parasitemia del grupo tratado.

- Es importante mencionar que se realizaron un total de tres ensayos: el primero con los extractos a una concentración de 500 mg/kg de peso, el segundo a 250 y tercero a 100.
- Los resultados obtenidos fueron clasificados según DEHARO et al., (2001), de la siguiente manera:

  * Si a la dosis **500 mg/kg/día**, el extracto mostró un porcentaje de inhibición del desarrollo del parásito menor al 50%, fue considerado **inactivo**.

  * Si a la dosis **500 mg/kg/día**, el extracto mostró un porcentaje de inhibición del desarrollo del parásito igual o mayor al 50%, la actividad antimalárica fue considerada **moderada**.

  * Si a la dosis **250 mg/kg/día**, el extracto tuvo un porcentaje de inhibición del desarrollo del parásito igual o mayor al 50%, la actividad antimalárica fue considerada **buena**.

  * Si a la dosis **100 mg/kg/día**, el extracto mostró un porcentaje de inhibición del desarrollo del parásito igual o mayor al 50%, la actividad antimalárica fue considerada **muy buena**.

3.2.7 FRACCIONAMIENTO DE *Geissospermun reticulatum*

3.2.7.1 Extracto Hexánico

- 200 g de muestra seca y molida de la corteza de *Geissospermun reticulatum* fue puesto a macerar en Hexano (100%) en un volumen aproximado al doble del volumen de la muestra, durante 5 días. Cada 24 horas se realizó un cambio del solvente, se filtró la solución con papel filtro y se eliminó el solvente en un rotaevaporador con bomba de vacío. El extracto obtenido fue almacenado en un vial protegido de la incidencia directa de la luz hasta su posterior evaluación.

3.2.7.2 Extracto Acetato de Etilo

- El residuo de la primera extracción fue secado completamente y puesto a macerar en Acetato de Etilo (100%) en un volumen aproximado al doble del volumen de la muestra, por 5 días. Cada 24 horas se realizó un cambio del solvente, se filtró la solución con papel filtro y se eliminó el solvente en un rotaevaporador con bomba de vacío. El extracto obtenido fue almacenado en un vial protegido de la incidencia directa de la luz hasta su posterior evaluación.

3.2.7.3 Extracto Etanólico

- El residuo de la segunda extracción, luego de ser secado complemente, fue puesto a macerar en Etanol (70%) en un volumen aproximado al doble del volumen de la muestra por 5 días. Al igual que en los casos anteriores, cada 24 horas se realizó un recambio del solvente, se filtró la solución con papel filtro y se eliminó el solvente en un rotaevaporador con bomba de vacío. El extracto obtenido fue almacenado en un vial protegido de la incidencia directa de la luz hasta su posterior evaluación.

3.2.7.4. Extractos Alcaloidales

3.2.7.4.1 Extracto alcaloidal ácido pH 2

- 200 g de la corteza seca y molida de *G. reticulatum* fueron puestos a macerar en ácido cítrico al 5 % en un volumen aproximado al doble del volumen de la muestra por 48 horas. Luego se realizó una extracción por partición con cloroformo (100%) hasta su total agotamiento. Para comprobarlo, se colocó 1 ml de la solución en un vial y se agregaron unas gotas de reactivo de DRAGUENDORF, observándose la presencia de un precipitado color naranja. El cloroformo utilizado fue eliminado en rotaevaporador con bomba de vacío y el extracto almacenado en un vial protegido de la incidencia de la luz hasta su evaluación.

3.2.7.4.2 Extracto alcaloidal básico pH 10

- La fase acuosa resultante de la primera extracción fue alcalinizada hasta pH 10 con una solución saturada NaOH. Luego, se procedió a extraer los alcaloides por partición con cloroformo (100%) hasta su total agotamiento. El solvente utilizado fue eliminado en rotaevaporador con bomba de vacío y el extracto almacenado en un vial protegido de la incidencia de la luz hasta su evaluación.

3.2.7.4.3 Extracto alcaloidal de bases cuaternarias

- La fase acuosa producto de la segunda extracción, fue acidificada nuevamente hasta pH 2 con una solución saturada de ácido cítrico al 5%, agregándose luego una solución saturada de Ioduro de Potasio. Posteriormente se procedió a extraer las bases cuaternarias por partición con cloroformo (100%) hasta comprobar su total agotamiento. El solvente utilizado fue eliminado en rotaevaporador con bomba de vacío y el extracto almacenado en un vial protegido de la incidencia de la luz hasta su evaluación.

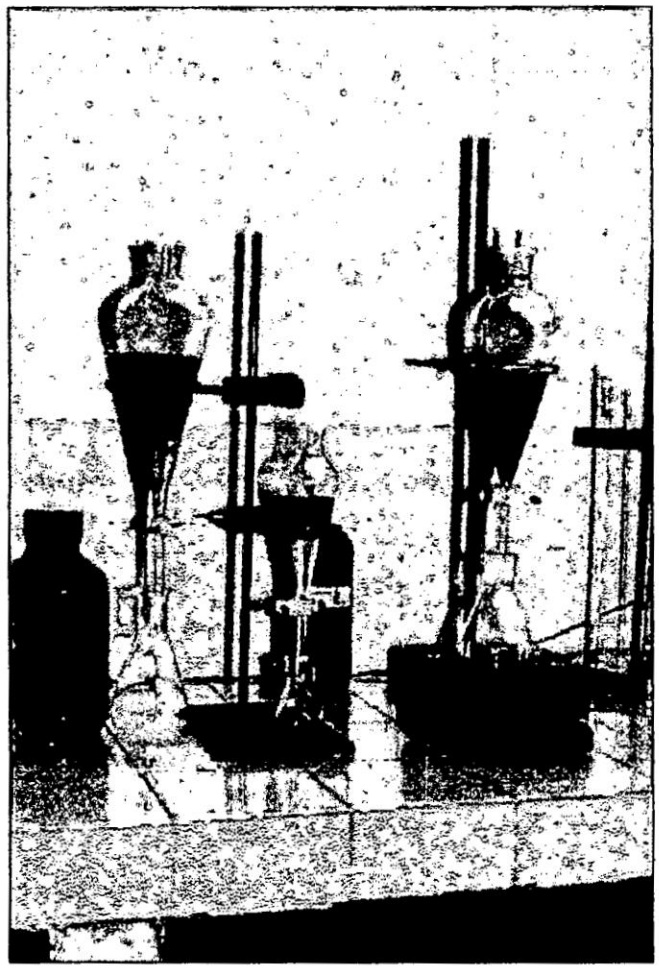


Figura 39 : Preparación de extractos alcaloidales de *Geissospermun reticulatum* mediante extracción por partición utilizando peras de decantación.

3.2.8 EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMALÁRICA IN VITRO DE LAS FRACCIONES OBTENIDAS DE *Geissospermun reticulatum*

- La actividad antimalárica de las fracciones obtenidas de *G. reticulatum* fueron evaluadas usando las dos técnicas in vitro descritas en el estudio: **a) el Test de Inhibición de la Biomineralización de la Ferroprotoporfirina IX (FBIT)** (ver acápite **3.2.4**) y **b) contra *P. falciparum* cepa F-32, cloroquina sensible, Método visual** (ver acápite **3.2.5.2**).

IV RESULTADOS

4.1 EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMALÁRICA IN VITRO MEDIANTE EL TEST DE INHIBICIÓN DE LA BIOMINERALIZACIÓN DE LA FERROPROTOPORFIRINA IX (FBIT)

Tres de los diez extractos hidroalcohólicos evaluados, ***Aspidosperma rigidum***, ***Geissospermun reticulatum*** y ***Remijia peruviana***, demostraron ser activos en este test. Sin embargo, como se muestra en el Cuadro Nro. 1, *G. reticulatum* y *R. peruviana* demostraron ser considerablemente más activos, con valores de IC_{50}, de 0.70 y 0.73 mg/ml respectivamente, que *A. rigidum* con 4.43 mg/ml, valor 6 veces mayor al de las otras dos especies. La IC_{50} mostrada por la cloroquina, fue 0.0145 mg/ml.

Cuadro Nro. 1

Actividad antimalárica *in vitro* en el Test de Inhibición de la Biomineralización de la Ferroprotoporfirina IX (FBIT) de 10 extractos hidroalcohólicos de plantas de la amazonía peruana

ESPECIES	IC_{50} mg/ml	Actividad
Aspidosperma rigidum	**4.43**	**Activo**
Campsiandra angustifolia	> 10	Inactivo
Crescentia cujete	> 10	Inactivo
Doliocarpus dentatus	> 10	Inactivo
Erythrina fusca	> 10	Inactivo
Euterpe oleraceae	> 10	Inactivo
Geissospermun reticulatum	**0.73**	**Activo**
Grias nueberthii	> 10	Inactivo
Remijia peruviana	**0.70**	**Activo**
Virola calophylla	> 10	Inactivo
Cloroquina difosfato (CQ)	**0.0145**	

4.2 EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMALÁRICA IN VITRO CONTRA *Plasmodium falciparum* (CEPA F–32, CLOROQUINA SENSIBLE)

Sólo dos extractos, ***Geissospermun reticulatum*** y ***Remijia peruviana***, fueron activos *in vitro* contra la cepa F-32 cloroquina sensible de *Plasmodium falciparum.*

G. reticulatum mostró una actividad moderada, con una IC_{50} de 5.99 µg/ml, mientras que el extracto de *R. peruviana* mostró muy buena actividad, con una IC_{50} de 0.85 µg/ml, valor que indica que este extracto es 7 veces más activo que el de *G. reticulatum.* La IC_{50} de la cloroquina, fue de 0.0063 µg/ml.

Cuadro Nro. 2

Actividad antimalárica *in vitro* contra *Plasmodium falciparum* cepa F-32 cloroquina sensible, de 10 extractos hidroalcohólicos de plantas de la amazonía peruana

ESPECIES	IC50 (µg/ml)	Actividad
Aspidosperma rigidum	> 10	Inactivo
Campsiandra angustifolia	> 10	Inactivo
Crescentia cujete	> 10	Inactivo
Doliocarpus dentatus	> 10	Inactivo
Erythrina fusca	> 10	Inactivo
Euterpe oleraceae	> 10	Inactivo
Geissospermun reticulatum	**5,82**	**Moderada**
Grias nueberthii	> 10	Inactivo
Remijia peruviana	**0.85**	**Buena**
Virola calophylla	> 10	Inactivo
Cloroquina difosfato (CQ)	**0.0063**	

4.3 EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMALÁRICA IN VIVO CONTRA *Plasmodium berghei* (CEPA NK – 65), TEST SUPRESIVO DE 4 DÍAS O "TEST DE PETERS"

Cuadro Nro. 3

Actividad Antimalárica *in vivo* contra *Plasmodium berghei* cepa NK-65, en el Test Supresivo de 4 días o "Test de Peters", de 10 extractos hidroalcohólicos de plantas de la amazonía peruana

ESPECIES	Dosis (mg/kg)	% Inh.	Actividad
Aspidosperma rigidum	500 250	Tóxico (T) 21	 Inactivo
Campsiandra angustifolia	250 100	Tóxico 29	- Inactivo
Crescentia cujete	**250** 100	**57** 34	**Buena** Inactivo
Doliocarpus dentatus	250 100	Tóxico Tóxico	- -
Erythrina fusca	500 250	40 27	Inactivo Inactivo
Euterpe oleraceae	250 100	Tóxico 10	- Inactivo
Geissospermun reticulatum	100 **50**	Tóxico **46**	- **Buena**
Grias nueberthii	250 100	Tóxico Tóxico	- -
Remijia peruviana	500 **100**	Tóxico **70**	- **Muy Buena**
Virola calophylla	250 100	Tóxico Tóxico	- -

(T) Se consideraron como tóxicos, por que eliminaron más del 50% de los animales del grupo tratado

En el modelo in vivo, tres extractos demostraron ser activos contra la cepa NK-65 de *Plasmodium berghei*. ***Crescentia cujete,*** inhibió el 57 % de desarrollo del parásito a una dosis de 250 mg/kg, ***Remijia peruviana*** el 70 % a una dosis de 100 mg/kg y ***Geissospermun reticulatum*** que inhibió el 46 % a 50 mg/kg, siendo sin embargo, muy tóxico a 100 mg/kg. A 5 mg/kg la cloroquina inhibió el 100% de desarrollo del parásito.

El cuadro Nro. 4 nos permite comparar los resultados de las cuatro especies que mostraron actividad antiplasmodial. Estos datos muestran que sólo dos extractos, *Geissospermun reticulatum* y *Remijia peruviana*, fueron activos en las 3 pruebas realizadas, mientras que las dos especies restantes, *Aspidosperma rigidum* y *Crescentia cujete* mostraron actividad sólo en una de ellas. Estos datos fueron de mucha importancia para la elección de la especie cuyo extracto hidroalcohólico fue posteriormente fraccionado y cuyas fracciones se evaluaron para determinar su actividad antimalárica in vitro.

Cuadro Nro. 4

Cuadro comparativo de las especies que mostraron actividad antimalárica *in vitro* y/o *in vivo*

ESPECIES	IN VITRO FBIT		IN VITRO *Plasmodium falciparum*		IN VIVO *Plasmodium berghei "Test de Peters"*		
	IC_{50} mg/ml	Actividad	IC50 (µg/ml)	Actividad	Dosis (mg/kg)	% Inh.	Actividad
Aspidosperma rigidum	**4.43**	**Activo**	> 10	Inactivo	500 250	Tóxico 21	- Inactivo
Crescentia cujete	> 10	Inactivo	> 10	Inactivo	**250** 100	**57** 34	**Buena** Inactivo
Geissospermun reticulatum	**0.73**	**Activo**	**5.82**	**Moderada**	100 **50**	Tóxico **46**	- **Buena**
Remijia peruviana	**0.70**	**Activo**	**0.85**	**Buena**	500 **100**	Tóxico **70**	- **Muy Buena**

4.4 EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMALÁRICA IN VITRO CONTRA *Plasmodium falciparum* y EL TEST DE INHIBICIÓN DE LA BIOMINERALIZACIÓN DE LA FERROPROTOPORFIRINA (FBIT) DE LAS FRACCIONES DE *Geissospermun. reticulatum*

El cuadro Nro. 5, muestra paralelamente los valores de IC_{50} de las fracciones de la corteza de *Geissospermun reticulatum*, obtenidos en las dos pruebas in vitro. La fracción alcaloidal básica demostró ser la más activa de todas, con una IC_{50} de 2.93 µg/ml contra la cepa F-32 cloroquina sensible de *Plasmodium falciparum* y de 0.21 mg/ml en la prueba FBIT.

Cuadro Nro. 5

Actividad Antimalárica *in vitro* en el Test de Inhibición de la Biomineralización de Ferroprotoporfirina IX y contra *Plasmodium falciparum* cepa F-32 cloroquina sensible, de las fracciones obtenidas de *Geissospermun reticulatum*

FRACCIONES	*P. falciparum*	FBIT
	IC_{50} (µg/ml)	IC_{50} (mg/ml)
Extracto Hexánico	>10	1,05
Extracto Acetato de Etilo	6,20	5,00
Extracto Etanólico	6,52	0,45
Extracto Alcaloidal Ácido pH 2	5,83	1,19
Extracto Alcaloidal Básico pH 10	**2,93**	**0,21**
Extracto Alcaloidal de Bases Cuaternarias	5,74	0,85

V DISCUSIÓN

De las 10 especies evaluadas, el 40 % (4 especies) mostraron actividad en uno o más de los ensayos de actividad antimalárica realizados, corroborando así su uso tradicional y demostrando la fiabilidad de la información etnobotánica así como su valioso aporte al descubrimiento y desarrollo de nuevas drogas potencialmente activas.

En cuanto a la etnobotánica de las especies en estudio es importante resaltar que, exceptuando *Crescentia cujete*, las restantes son utilizadas de modo tradicional para el tratamiento de los síntomas relacionados a la malaria y 3 de las 4 especies que mostraron actividad, son utilizadas exclusivamente para el tratamiento de esta enfermedad. Sobre estas tres especies en particular se menciona lo siguiente:

La infusión de la corteza de ***Remijia peruviana*** **Standley (Rubiaceae)**, conocida como "cascarilla", especie endémica de la amazonía del Perú (su distribución se limita a los departamentos de Loreto y San Martín), es usada exclusivamente para el tratamiento de la malaria. En cuanto ***Geissospermun reticulatum*** **A. Gentry (Apocinaceae)**, cuyo nombre vernacular es "quina quina" es usada por pueblos indígenas del departamento de Madre de Dios, quienes al igual que en el caso de *Remijia peruviana*, utilizan la infusión de la corteza exclusivamente para el tratamiento de esta enfermedad (LACAZE And ALEXIADES, 1995); del mismo modo la cocción de la corteza triturada de ***Aspidosperma rigidum*** **Rugby (Apocinaceae)**, "remocaspi" (MEJIA And RENGIFO, 2000).

Por otro lado, en entrevistas realizadas durante la fase de selección de las plantas, se recopiló información referente al uso de la infusión de las hojas de ***Crescentia cujete*** **L. (Bignoniaceae)** "huingo, pate o tutumo" por poblaciones ubicadas a lo largo del río Putumayo, zona endémica en malaria, para el tratamiento de los síntomas relacionados a este enfermedad. Las personas consultadas reportan haber obtenido buenos resultados tras unos días de tratamiento. Esta es la razón por la que incluimos esta planta en la lista de especies a evaluar a pesar de no haberse encontrado información bibliográfica referida al uso de esta planta como antimalárico. La literatura actual reporta otros usos para esta especies, tal es el caso de MEJIA y RENGIFO (2000), quienes reportan que el cocimiento de 4 hojas de *Crescentia cujete* bebido en ayunas, es utilizado como antiparasitario

intestinal, de igual manera el jugo del fruto verde cocinado, para el tratamiento de la bronquitis.

- En los ensayos in vitro, mediante el **Test de Inhibición de la Biomineralización de la Ferroprotoporfirina IX**, 3 extractos mostraron actividad. El extracto de la corteza de ***Remijia peruviana*** y el de ***Geissospermun reticulatum*** fueron los que mostraron la mejor actividad con una IC_{50} de 0.7 mg/ml, y de 0.73 mg/ml respectivamente. El extracto de la corteza de ***Aspidosperma rigidum***, mostró una actividad mucho menor con referencia a las dos primeras con una IC_{50} de 4.43 mg/ml. En cuanto a las fracciones del extracto de la corteza *Geissospermun reticulatum*, todas mostraron ser mas activas que el extracto hidroalcohólico, con valores de IC_{50} que van desde 0.21 a 5.00 mg/ml. Sin embargo, fue la fracción alcaloidal básica a pH 10, la que demostró ser la más activa, mostrando una IC_{50} de 0.21 mg/ml. Nosotros utilizamos cloroquina difofasto como control positivo en el ensayo y la IC_{50} mostrada, fue 0.0145 mg/ml.

  En publicaciones previas (BAELMANS et al, 2000a,b), proponen un método para el screening rápido e identificación de drogas que interfieren con la biomineralización de la FP, pero este método a diferencia del utilizado por nosotros, fue desarrollado incubando el clorhidrato de hemina en tubos eppendorf, haciéndolo tedioso para el screening de grandes cantidades de drogas, además de que el pH final de la reacción fue de 3.8 el cual esta distante del pH al cual ocurre la biomineralización *in vivo* que es de 5-5.4 (YAYON et al. 1984; KROGSTAD et al. 1985). Bajo esta metodología BAELMANS et al (2000a), evaluaron la actividad de algunos extractos para inhibir la biomineralización de FP y encontraron que el extracto de la corteza de *Cinchona calisaya* Rubiaceae, control positivo en otras pruebas de actividad antiplasmodial, era inactivo. Del mismo modo la IC_{50} de la cloroquina fue de 1.1 mg/ml, valor 75 veces superior al obtenido por nosotros. Los autores de esta publicación sugieren que la inactividad mostrada por *Cinchona calisaya* (fuente natural de quinina), se debe a la débil fuerza de unión a la FP que posee la quinina, 5 veces menor a la cloroquina (DORN et al., 1998), fuerza de unión que determina la capacidad de un compuesto de inhibir la biomineralización de la FP y el desarrollo del parásito, además del *hecho* de que en condiciones óptimas de extracción el rendimiento de

quinina obtenido de la corteza de *Cinchona calisaya* esta alrededor de 3.5 % (DORVAULT, 1982).

- In vitro, contra la **cepa F-32 cloroquina sensible de *Plasmodium falciparum***, solo 2 extractos mostraron actividad. El extracto hidroalcohólico de la corteza de ***Remijia peruviana***, fue el que mostró la mejor actividad con una IC_{50} de 0.85 µg/ml, 7 veces más activo que el extracto de la corteza de ***Geissospermun reticulatum***, que mostró una IC_{50} de 5.82 µg/ml. La IC_{50} mostrada por la cloroquina fue de 0.0063 µg/ml, dato que concuerda con el valor reportado por DEHARO et al, (2001). El extracto de la corteza de *Cinchona calisaya*, especie de la cual se aisló por primera vez quinina y que es usado como control positivo estándar en evaluaciones de actividad antiplasmodial, tiene una IC_{50} de 0.2 µg/ml (DEHARO et al., 2001), y como se puede observar este valor es cercano al de *Remijia peruviana.*

  Por su parte, la actividad mostrada por el extracto de *Geissopermun reticulatum*, que si bien es cierto es largamente menos activa que el de C. calisaya, sin embargo, es comparable a la actividad del extracto de *Artemisia annua* L. que muestra una IC_{50} de 4 µg/ml (BENOIT et al, 1995), especie de la cual se aisló la artemisina, un poderoso agente antiplasmodial cuyos derivados son usados actualmente como antimaláricos de tercera línea en los programas de lucha contra la malaria a nivel mundial, así como de algunas Simaroubaceas (O'NEILL et al., 1985). En cuanto a las fracciones del extracto hidroalcohólico de *Geissospermun reticulatum*, al igual que en el Test FBIT, la fracción alcaloidad básica a pH 10 fue la que mostró la mayor actividad con una IC_{50} de 2.93 µg/ml, 2 a 5 veces más activa que las demás fracciones cuyas IC_{50} se encuentran entre 5.74 a > 10 µg/ml.

- En modelo in vivo, mediante el Test supresivo de 4 días o "Test de Peters", contra la **cepa NK-65 de *Plasmodium berghei*** son tres los extractos que mostraron actividad. El más activo, al igual que en las pruebas anteriores, fue el extracto de la corteza de ***Remijia peruviana*** que demostró ser tóxico a una dosis de 500 mg/kg, pero inhibió el 70 % del desarrollo del parásito a 100 mg/kg. Por su parte el extracto de la corteza de ***Geissospermun reticulatum*** fue tóxico a una dosis de

100 mg/kg, dosis mínima evaluada, sin embargo, debido a la buena actividad mostrada en los ensayos in vitro decidimos disminuir la dosis, inhibiendo el 46 % del desarrollo del parásito a 50 mg/kg, dato que coincide con los reportados por MUÑOZ et al. (2000), quienes evaluaron la actividad antiplasmodial del extracto de la corteza de *Geissospermun laeve* Velloso, que al igual que *Geissospermun reticulatum* demostró ser tóxico a 100 mg/kg e inhibió el 36 % del desarrollo del parásito a 50 mg/kg.

Por otra parte, el extracto de las hojas de *Crescentia cujete* mostró una buena actividad, inhibiendo el 57 % de desarrollo del parásito a una dosis de 250 mg/kg y a diferencia de las anteriores no mostró toxicidad a 500 mg/kg.

Si comparamos estos datos con los reportados para el extracto de la corteza de *Cinchona calisaya*, el cual inhibe el 91% de desarrollo de parásito a una dosis 250 mg/kg, (DEHARO et al., 2001), encontramos que las especies mencionadas poseen un gran potencial, sobre todo *Remijia peruviana* cuya actividad es aparentemente igual o superior a *Cinchona calisaya.*

Sobre las demás especies evaluadas, en su mayoría demostraron ser tóxicas a una dosis de 100 mg/kg (*Doliocarpus dentatus*, *Grias neuberthii* y *Virola calophylla*), o inactivos (*Aspidosperma rigidum*, *Campsiandra angustifolia* y *Euterpe oleraceae*). Estas especies, a diferencia de *Geissopermun reticulatum* que también mostró toxicidad a 100 mg/kg, no mostraron actividad alguna in vitro, razón por la cual no se consideró necesario evaluar la actividad in vivo a dosis inferiores.

- Como lo demuestran los resultados ***Remijia peruviana*** **Standley** fue la especie que mostró la mejor actividad antiplasmodial en los 3 ensayos realizados.

  Las *Remijia*s, llamadas también "falsas quininas", son conocidas por contener quinina y sus derivados (HOCKING, 1997) y son usadas como reemplazo de la corteza de las *Cinchona*s como fuente principal de estos compuestos. A la fecha se han aislado y estudiado un gran número de compuestos de especies del género *Remijia*, entre ellos alcaloides derivados de la quinina, quinidina y cinchonina aislados de *Remijia pedunculata* y *Cinchona afficinalis* (DICCTIONARY NATURAL PRODUCTS on CD-ROM, 1982 - 2001). Esto explicaría la excelente actividad mostrada por esta planta, que a la luz de los resultados podría reemplazar con total fiabilidad como un extracto para control positivo en

evaluaciones de actividad antimalárica in vivo e in vitro a las especies del género *Cinchona*.

Sin embargo, es justamente la presencia de compuestos de conocida actividad antiplasmodial en especies pertenecientes al género *Remijia*, y la necesidad de encontrar nuevos agentes potencialmente activos, el motivo por el cual no escogimos el extracto de *Remijia peruviana* para realizar el fraccionamiento y posterior evaluación de la actividad de sus fracciones.

- ***Geissospermun reticulatum* A. Gentry**, junto a *R. peruviana* fueron las únicas dos especies que mostraron actividad en los tres ensayos realizados. Este dato es muy importante, dado que nosotros decidimos fraccionar uno de los extractos activos, y si bien es cierto la actividad in vivo esta más estrechamente relacionada con la fisiología humana, una buena actividad in vitro es siempre necesaria para realizar un fraccionamiento bioguiado, porque la cantidad de muestra obtenida es generalmente muy poca para desarrollar directamente ensayos in vivo.

  La elevada toxicidad mostrada por *Geissospermun reticulatum* a dosis bajas (100 mg/kg), y la actividad aún significativa mostrada a dosis menores (50 mg/kg), supone que el rango de actividad del o los compuestos presentes en el extracto es bastante estrecho, dejando abierta la posibilidad de que la toxicidad disminuya progresivamente a medida que se realice el fraccionamiento del extracto, permitiendo incrementar la actividad a dosis bastante bajas. Sin embargo también podría suceder que los compuestos tóxicos presentes en el extracto sean los responsables de la actividad o presenten determinado grado de sinergismo entre ellos

  MUÑOZ et al. (2000), evaluaron la actividad antiplasmodial de *Geissospermun laeve*, especie usada para el tratamiento de la malaria, vómitos y dolor de hígado por los Indios Chacobos de Bolivia, mostrando una actividad in vitro e in vivo con valores que concuerdan significativamente con los obtenidos para *Geissospermun reticulatum*. Así mismo, de *Geissospermun laeve* se han aislado 2 alcaloides, geissospermine y flavopereirine, siendo este ultimó un inhibidor de la síntesis de DNA de células cancerígenas (DICCTIONARY NATURAL PRODUCTS on CD-ROM, 1982 - 2001).

Todos estos datos, sumados al hecho de que sólo existen tres especies de este género reportadas para el Perú (BRAKO And ZARUCCHI, 1996), las cuales no presentan estudios fitoquímicos ni de actividad antimalárica, ofreciéndonos por lo tanto una mayor posibilidad de obtener compuestos nuevos potencialmente activos, por lo que se optó por esta especie para realizar un fraccionamiento por partición del extracto hidroalcohólico y determinar la actividad antimalárica in vitro de estas fracciones.

Los valores encontrados al evaluar la actividad in vitro de las fracciones del extracto de la corteza *Geissospermun reticulatum*, demuestran que la fracción alcaloidal básica pH 10 es la responsable de la actividad antiplasmodial mostrada por esta planta, lo cual podría tener relación con el elevado rendimiento de alcaloides que presenta el extracto de la corteza de esta planta.

- ***Aspidosperma rigidum*** **Rusby**, sólo mostró actividad in vitro en el Test de Inhibición de la Biomineralización de la Ferroprotoporfirina IX.

  Es importante mencionar que a diferencia de otras especies, quienes in vitro contra *Plasmodium falciparum* mostraron valores de IC_{50} superiores a los 100 µg/ml, *Aspidosperma rigidum* mostró una IC_{50} de 18.9 µg/ml, dato que no se muestra en el cuadro Nro. 2 de resultados, valor que por otros investigadores podría ser considerado como moderado, sin embargo, nosotros consideramos que a la luz de los últimos reportes, un valor superior a 10 µg/ml, brinda muy poca probabilidad de encontrar cantidades detectables de compuestos activos que permitan su aislamiento y purificación, razón por cual este extracto fue considerado inactivo.

  De la corteza de *Aspidosperma rigidum* se ha aislado un alcaloide denominado picralina y de las semillas de *Picralima nitida* (Apocynaceae) un derivado N-Methylpicraline (picratidina) (DICCTIONARY NATURAL PRODUCTS on CD-ROM, 1982 - 2001). FRANCOIS et al. (1996), evaluaron la actividad de extractos de *Picralina nitida* contra *Plasmodium falciparum* mostrando muy buena actividad el extracto de la raiz, de la corteza y de la cáscara del fruto. Estos datos abren la posibilidad de encontrar mejor actividad en el extracto de otros órganos de *Aspidosperma rigidum*, lo cual de comprobarse, contribuiría con el conocimiento del uso tradicional de esta especie.

Sobre la no correlación en la actividad mostrada por el extracto de la corteza de *Aspidosperma rigidum* en el Test de Inhibición de la Biomineralización de la Ferroprotoporfirina IX, contra la cepa F-32 cloroquina sensible de *Plasmodium falciparum* e in vivo contra *Plasmodium berghei*, puede decirse lo siguiente:

Primero, la falta de actividad in vivo podría ser debido a interferencias biológicas, como la baja absorción o metabolismo de los compuestos activos o a la ruta de administración del extracto (en nuestro caso intraperitoneal), la cual es diferente a la vía oral tradicional.

Segundo, la ausencia o la débil actividad antimalárica in vitro contra *Plasmodium falciparum*, puede ser debido a la incapacidad de las moléculas activas para alcanzar los grupos hemínicos libres hasta su sitio de formación en la vacuola digestiva del parásito. El compuesto inhibidor debe penetrar a través de un complejo sistema de cuatro membranas para alcanzar este sitio: la membrana del glóbulo rojo, la membrana de vacuola parasitófora, la membrana plasmática del parásito y la membrana de la vacuola digestiva. Por lo tanto es probable que los principios activos de este extracto no puedan penetrar libremente este sistema de membranas e inhibir la formación del polímero (hemozoina). Pensamos que un estudio de actividad antiplasmodial que incluya diversas partes de la planta (hojas, raíz, fruto, etc.), sería importante y necesario para confirmar o no la presencia de compuestos activos en esta planta.

- ***Crescentia cujete*** **L**, mostró una buena actividad in vivo, sin embargo no mostró actividad alguna en los modelos in vitro.

  Como se mencionó anteriormente la actividad in vivo esta más estrechamente relacionada con la fisiología humana, sin embargo una buena actividad in vitro es siempre necesaria para realizar un fraccionamiento bioguiado, dado que la cantidad de muestra obtenida es generalmente muy poca para desarrollar directamente ensayos in vivo. Esta falta de actividad in vitro, podría deberse a que los compuestos activos presentes en el extracto necesiten ser previamente metabolizados por el huésped vertebrado y transformados en moléculas con estructuras capaces de mostrar actividad frente al parásito, teoría que se ve reforzada dado los buenos resultados que reportan haber obtenido las personas que utilizaron la infusión de las hojas par el tratamiento de esta enfermedad.

En un ensayo in vitro los compuestos presentes en un extracto son puestos en contacto directo con el parásito sin sufrir cambios previos debido a procesos metabólicos.

El uso tradicional del cocimiento de las hojas de *Crescentia cujete* como antiparasitario intestinal, podría estar relacionado con la buena actividad in vivo mostrada por esta especie, sin embargo, tampoco se ha encontrado información bibliográfica que lo sustente.

Nosotros consideramos que la buena actividad in vivo mostrada por esta planta y la ausencia de toxicidad, característica muy importante para considerar como promisoria una especie, amerita realizar nuevos estudios a fin de esclarecer las hipótesis planteadas. Por ejemplo, podría probarse otros métodos de extracción, como la decocción, método utilizado tradicionalmente, el cual permitiría obtener compuestos hidrosolubles, los cuales pueden difundirse con mayor facilidad hacia el interior de las células.

Es importante mencionar también, que hasta el momento no se ha encontrado referencia alguna sobre trabajos de actividad antimalárica en especies pertenecientes a este género ni mucho menos en esta especie, sin embargo, las propiedades antibronquiales del fruto han sido muy estudiadas (CACERES, 1996).

- Para el caso de aquellas especies que mostraron una elevada toxicidad y no mostraron actividad in vitro (*Doliocarpus dentatus*, *Grias neuberthii* y *Virola calophylla*), no se justifica realizar más estudios. Sin embargo, podrían realizarse evaluaciones de actividad antibacteriana, antifúngica o contra otro tipo de microorganismos patógenos, ya que continuamente se vincula el efecto tóxico de un planta con la capacidad de curar dolencias de este tipo.

VI CONCLUSIONES

- El 40 % del total de especies evaluadas fueron activas en uno o más de los ensayos realizados, de las cuales 3 de ellas son reportadas específicamente para el tratamiento de la malaria.
- Dos especies, *Remijia peruviana* y *Geissospermun reticulatum*, fueron activas en las tres pruebas realizadas (in vitro en el Test FBIT y contra *Plasmodium falciparum* e in vivo contra *Plasmodium berghei*), siendo el extracto hidroalcohólico de la corteza de *Remijia peruviana* el que mostró la mayor actividad antimalárica, comparable a la mostrada por especies del género *Cinchona*, lo cual posibilita su uso como un nuevo y excelente control positivo en ensayos de actividad antiplasmodial.
- La significativa actividad in vivo y el alto grado de toxicidad a dosis bajas mostrada por el extracto hidroalcohólico de la corteza de *Geissospermun reticulatum*, sugieren la presencia de compuestos activos con estrecho margen de actividad, la cual podría incrementarse progresivamente al disminuir la toxicidad, producto del fraccionamiento del extracto.
- Por la buena actividad mostrada y la mayor probabilidad de encontrar compuestos nuevos potencialmente activos, el extracto hidroalcohólico de la corteza de *Geissospermun reticulatum* fue seleccionado para realizar un fraccionamiento por partición y la posterior evaluación de la actividad antiplasmodial in vitro de estas fracciones, demostró que la fracción alcaloidal básica a pH 10 es la más activa, estableciendo que son los alcaloides el grupo de compuestos responsables de la actividad mostrada por esta especie.
- El extracto de la corteza de *Aspidosperma rigidum*, sólo mostró actividad in vitro en el Test de Inhibición de la Biomineralización de la Ferroprotoporfirina, sin embargo, no se descarta la posibilidad de encontrar actividad en el extracto de otros órganos de la planta.
- El uso tradicional de las hojas de *Crescentia cujete* para el tratamiento de la malaria reportado en este estudio y la buena actividad in vivo contra *Plasmodium berghei* mostrada por el extracto de las hojas, sugiere la presencia de compuestos cuya actividad se vería afectada por procesos metabólicos propios del huésped vertebrado, los cuales se encuentran ausentes en un modelo in vitro.

- El extracto de la corteza *Campsiandra angustifolia* y de las raices de *Euterpe oleraceae* fueron inactivos in vivo e in vitro. Otros tres extractos, el tallo de *Doliocarpus dentatus*, la corteza de *Grias neuberthii* y la corteza de *Virola calophylla* fueron tóxicos a la mínima dosis evaluada, e inactivos in vitro.

VII RECOMENDACIONES

- Se recomienda realizar ensayos de Toxicidad Aguda para determinar la DL_{50}, (dosis letal media) por vía oral e intraperitoneal de los extractos activos, a fin de establecer con mayor claridad el grado de toxicidad de los mismos.
- Es importante realizar evaluaciones de actividad antimalárica de las diferentes partes de las plantas que mostraron actividad para determinar cual es la parte de la planta con mayor concentración de metabolitos activos o para el caso de *Aspidosperma rigidum*, comprobar o no la actividad antiplasmodial de la especie.
- Se puede evaluar la actividad de otros tipos de extractos que estén más acorde con el uso tradicional de las especies, como decocción o infusión y establecer diferencias con la actividad mostrada por los extractos hidroalcohólicos.
- Al igual que para el caso de *Geissospermun reticulatum*, sería de interés realizar un fraccionamiento guiado por bioensayo de los extractos activos restantes para determinar la fracción responsable de su actividad y establecer así el posible grupo de compuestos al que pertenece el principio activo.

VIII RESUMEN

Los extractos hidroalcohólicos de 10 plantas utilizadas de forma tradicional por pueblos de la amazonía peruana para el tratamiento de los síntomas relacionados a la malaria, fueron evaluados para determinar su actividad in vitro en el Test de Inhibición de la Biomineralización de la Ferroprotoporfirina IX y contra la cepa F-32 cloroquina sensible de *Plasmodium falciparum* e in vivo contra la cepa NK-65 de *Plasmodium berghei.* 4 extractos hidroalcohólicos, el 40 % del total de especies evaluadas, mostraron actividad corroborando así su uso tradicional. El extracto de la corteza de *Remijia peruviana* fue el que mostró la mejor actividad antimalárica, tanto in vitro (IC_{50} FBIT = 0.7 mg/ml; *Plasmodium falciparum* = 0.85 µg/ml), como in vivo (70 % de inhibición a 100 mg/kg), actividad comparable o mayor que la mostrada por especies del género *Cinchona*, convirtiéndola en un nuevo y excelente control en pruebas de este tipo. El extracto de la corteza de *Geissospermun reticulatum,* también mostró actividad en las tres pruebas realizadas, (in vitro IC_{50} FBIT = 0.73 mg/ml, *Plasmodium falciparum* = 5.82 µg/ml e in vivo 46 % de inhibición a 50 mg/kg), mostrando, sin embargo, una elevada toxicidad in vivo a una dosis de 100 mg/kg. El fraccionamiento bioguiado del extracto de *Geissospermun reticulatum*, determinó que la fracción alcaloidal básica es la más activa (in vitro: IC_{50} FBIT = 0.21 mg/ml, *P. falciparum* = 2.93 µg/ml). El extracto de la corteza de *Aspidosperma rigidum* solo mostró actividad in vitro en la prueba FBIT, con una IC_{50} = 5.53 mg/ml, mientras que el extracto de las hojas de *Crescentia cujete* sólo mostró actividad in vivo contra *Plasmodium berghei*, sugiriendo la presencia de compuestos que necesiten ser metabólizados por el huésped vertebrado para mostrar actividad.

IX REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARAMBURÚ J, RAMAL C, WITZIG R. 1999. *Malaria reemergence in the peruvian amazon region.* Emerging Infectious Diseases. 5, 2, 209 – 215.

BAELMANS, R., et al. 2000a. *A search for natural bioactive compounds in Bolivia through a multidisciplinary approach Part IV. Is a new haem polymerization inhibition test pertinent for a detection of antimalarial natural products?.* Jornal of Ethnopharmacology. 73, 271 – 275.

BAELMANS, R., et al. 2000b. *Experimental conditions for testing the inhibitory activity of chloroquine on the formation of ß-haematin.* Experimental Parasitology. 96, 243 – 248.

BASCO, L.K., RUGGERI, C., LE BRAS, J. 1994. *Molécules antipaludiques: mécanismes d'action, mécanismes de résistance et relations structure-activité des schizontocides sanguins*, Masson, Paris.

BASCO, L., et al. 1995. *Plasmodium falciparum and Plasmodium vivax: Lactate dehydrogenase activity and its application for in vitro drug susceptibility assay.* Experimental Parasitology. 8, 260 – 271.

BEAUTÉ-LAFITTE, A., et al. 1994. T*he chemosensitivity of the rodent malarias – Relationships with the biology of merozoites.* International Journal for Parasitology, 24, 7, 981 – 86.

BENOIT, F., et al. 1995. *Antimalarial activity in vitro of Cochlospermun tinctorium tuberde extracts.* Transactions or the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene. 89, 217 – 218.

BRAKO, L. And ZARUCCHI, J.L. 1996. *Catálogo de la Angiospermas y Gimnospermas del Perú.* Missouri Botanical Garden's. pp 1286.

BRANDAO, M.G.L. 1992. *Survey of medicinal plants used as antimalarials in the Amazon.* Journal of Ethnopharmacology. 36, 2, 175 – 82.

CACERES, A. 1996. *Plantas de uso medicinal en Guatemala.* Edit. Universitaia. Universidad San Carlos de Guatemala. pp 402.

CHRISTOFINIS, G.J. And MILLER, H. 1983. *A simplified method for cryopreservation of Plasmodium falciparum from continuous in vitro cultures.* Annals of Tropical Medicine and Parasitology, 77, 2, 123 – 126.

COX, F.E.G., WERNSDORFER, W.H. AND MC GREGOR, I. 1988. *Major animal models in malaria research: rodent. Malaria: principles and practice of malariology.* Churchill Livingstone, Edinburgh, 2, 1503 – 1543.

CYTED - COOPERACIÓN IBEROAMERICANA. 2000. *Proyecto X.5. Búsqueda, obtención y evaluación de nuevos agentes antiparasitarios.* Memorias de la Primera Reunión - Panamá.

DEHARO, E., et al. 1992. *Activité antipaludique du n-hentriacontanol isolé de Cuatresia sp. (Solanaceae).* Annales de Parasitologie Humaine et Comparée. 67, 126 – 127.

DEHARO, E., et al. 2000. *Técnicas de laboratorio para la selección de sustancias antimaláricas.* 1 ra. Ed. Talleres gráficos Perez. La Paz – Boliva. pp 187.

DEHARO, E., et al. 2001. *A search for natural bioactive compounds in Bolivia through a multidisciplinary approach. Part V. Evaluation of the antimalarial activity of plants used by the Tacana Indians.* Journal of Ethnopharmacology, 77, 91 – 98.

DEHARO, E., et al. 2002. *A non-radiolabeled ferriprotoporphyrin IX biomineralization inhibition test (FBIT) for the high throughput screening of antimalarial compounds.* Experimental Parasitology. 100, 252 – 256.

DESJARDINS, R.E., et al. 1979. *Quantitative assessment of antimalarial activity in vitro by a semiautomated microdilution technique.* Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 16, 6, 710 – 718.

DICCTIONARY NATURAL PRODUCTS on CD-ROM, Versión 10:1 Copyright © 1982-2001 Chapman & Hall/CRC.

DISA-LORETO. 2001. Boletín 2001 Area Transmisible. 55 pp.

DORN, A., et al. 1998. *An assessment of drug haematin binding as a mechanism for inhibition of haematin polymerization by quinoline antimalrials.* Biochemical Pharmacology. 55, 727 – 736.

DORVAULT, F. 1982. L'officine, XXIst edn. Vigot, Paris

EGAN, T. J. And MARQUES, H.M. 1999. *The rol of the haem in the activity of cloroquina and related antimalarial drugs* Coordination Chemistry Reviews. 192, 493 – 517.

EGAN, T..J., ROSS, D.C., ADAMS, P.A. 1994. *Quinoline antimalarial drugs inhibits spontaneous formation of B-haematin (malaria pigment).* FEBS Letters. 352, 54 – 57.

FANDEUR, T., MORETTI, C., POLONSKY, J. 1985. *In vitro and in vivo assessment of the antimalarial activity of sergeolide.* Planta Medica. 1, 20-23.

FRANCOIS, G., et al. 1996. *Contituents of Picralima nitida display pronounced inhibitory activities against asexual erythrocytic forms of Plasmodium falciparum in vitro.* Journal of Ethnopharmacology. 54, 2-3, 113-117.

GANTIER, J.C., et al. 1996. *The effect of some 2-substitued quinolines isolated from Galipea longiflora on Plasmodium vinckei petteri infected mice.* Planta Medica. 62, 285-286.

GAUTRET, PH., et al. 1994. *Plasmodium vinckei vinckei, Plasmodium vinckei lentum, Plasmodium yoelii yoelii: chronobiology of the asexual cycle in the blood.* Parasite, 1, 3, 235-39.

GAUTRET, PH., et al. 1995. *The adjustment of the schizogonic cycle of Plasmodium chabaudi chabaudi in the blood to the circadian rythm of the host.* Parasite, 2, 69-74.

GENTILINI, M. 1995. *Médecine Tropicale.* Flammarion, Paris.

GOLDBERG, D. And SLATER, A. 1992. *The pathway of Hemoglobin degradation in malaria.* Parasitology Today. 8, 280 -283.

GOLDBERG, D., et al. 1990. *Hemoglobin degradation in the malaria parasite Plasmodium falciparum, an ordered process in a unique organelle.*

Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA. 87, 931 – 935.

GRELLIER, Ph., et al. 1996. *Antimalarial activity of cryptolepine and isocryptolepine, alkaloids isolated from Cryptolepis sanguinolenta.* Phytotherapy Research, 10, 317-321.

HOCKING, M.G., 1997. A dictionary of natural products, Plexus Publishing, Inc., pp 660.

HOFHEINZ, W. And MERKLI, B. 1984. "Quinine and quinine analogs", in Peters, W. and Richard, W.H.G., Antimalarial Drug II. Current antimalarial and new drug development, Springer-Verlag, Heidelburg, New York and Tokyo, 60-81.

KROGSTAD, D. J., SCHLESINGER, P. H., and GLUZMAN, I. Y. 1985. *Antimalarials increase vesicle pH in Plasmodium falciparum.* J. Cell Biol. 101, 2302-2309.

YAYON, A., CABANTCHIK, Z. I., and GINSBURG, H. 1984. *Identification of acidic compartment of Plasmodium falciparum-infected human erythrocytes as the target of the antimalarial chloroquine.* EMBO Journal. 3, 2695-2700.

LACAZE, D. And ALEXIADES, M. 1995. *Salud para Todos. Plantas medicinales y salud indígena en la cuenca del río Madre de Dios, Perú.* FENAMED-CBC. Pp 287.

LAMBROS, C. And VANDERBERG, J.P. 1976. *Synchronization of Plasmodium falciparum erythrocytic stages in culture.* Journal of Parasitology. 65, 3, 418 – 420.

LANDAU, I. And CHABAUD A.G. 1994. *Plasmodium* species infecting *Thamnomys rutilans*: a zoological study. Advances in Parasitology, 33, 49-90.

LE BRAS, J., And DELERON, P. 1983. *In vitro study of drug sensitivity or Plasmodium falciparum: evaluation of new semi-micro test.* American Journal of Tropical Medicine an Hygiene. 32, 3, 447-451.

MARKELL, E.K., VOGE, M., JOHN, D.T. 1994. *Parasitología Médica.* InterAmericana Mc Graw-Hill, Madrid.

MEJIA, K. And RENGIFO, E. 2000. *Plantas medicinales de uso popular en la amazonía peruana.* 2 da. Edición. Agencia Española de Cooperación Internacional. Pp 284.

MUÑOZ, V., et al. 2000. *A search for natural bioactive compounds in Bolivia through a multidisciplinary approach. Part I. Evaluation of the antimalarial activity of plants used the Chacobo Indians.* Journal of Ethnopharmacology, 69, 127-137.

O'NEILL, M., et al. 1985. *Plants as sources of antimalarial drug, Part I: in vitro test method for the evaluation of crude extracts from plants.* Planta Medica. 61, 394-398.

O'NEILL, M., et al. 1988. *Plants as sources of antimalarial drug, Part 6: Activities of Simarouba amara fruits.* Journal of Ethnopharmacology. 22, 2, 183-190.

OPS, MPS. 1999. *Situación de la salud en el Perú - indicadores básicos.* Lima, Perú.

PETERS, W. 1970. *Chemotherapy and drug resistance in malaria.* Academic Press, New York.

PETERS, W. 1987. *Chemoterapy and drug resistance in malaria.* 2 voll., Academic Press, London.

PETERS, W. And ROBINSON, B.L. 1992. *The chemotherapy of rodent malaria. XLVII. Studies on pyronaridine and other mannich base antimalarials.* Annals of Tropical Medicine and Parasitology, 86, 455-65.

RAMAL C, VARGAS J, ARAMBURÚ J. 1999. *Epidemiología de la Malaria en la Región Loreto, Año 1997.* Libro de Resúmenes de Trabajos Libres. VI Congreso Peruano de Enfermedades Infecciosas y Tropicales. SPEIT Agosto. p.85.

RAYNES, K., et al. 1996. *Novel bisquinoline antimalarials.* Biochemical Pharmacology. 52, 551 – 559.

REA, et al., 1993. *Alkaloids contents of plants from Cinchonae tribu collected in the oriental valleys of Bolivian Andes.* "Phytochemistry of Plants used in Traditionnal Medicine", Lausanne, Suisse, 29 september - 1 october 1993.

RHODAIN, F. And PEREZ, C. 1985. *Précis d'entomolgy medicale et vétérinaire.* Ed. Maloine, Paris

SAUVAIN, M., et al. 1996. *Antimalarial activity of alkaloids from Pogonopus tubulosus.* Phytotherapy Research, 10,198-201.

SHERMAN, W.I. editor. 1999. *Malaria: Parasite Biology , Pathogenesis and Protection.* American Society for Microbiology, Sherman IW Ed. Washington D.C.

SMEIJSTERS, L., et al. 1996. *Simple, fast and accurate fluorometric method to determine drug susceptibility of Plasmodium falciparum in 24-well suspension cultures.* Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 40, 4, 835-838.

SPENCER, C.F. et al. 1947. *Survey of plants for antimalarial activity.* Journal of Natural Products. 10,145-174.

STEELE, J.C., et al. 1999. *Evaluation of the antiplasmodial activity of bisbenzylisoquinoline alkaloids from Abuta grandifolia.* Planta Medica. 65, 413-416.

TRAGER, W. And JENSEN, J.B. 1976. *Human malaria parasites in continuous culture.* Nature, 263, 5580, 767-769.

WAKI, S., et al. 1984. *Maintenance and propagation of human malaria parasites in culture using an ordinary CO_2 incubator.* Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene, 78, 3, 418.

WHO. 1981. *Malaria parasite strain characterization, cryopreservation, and banking of isolates*: a WHO Memorandum. Bulletin of the World Health Organization, 59, 4, 537-548.

WORLD HEALT ORGANIZATION (WHO) Homepagehttp://www.who.ch/

WORLD HEALT ORGANIZATION. 2000. *World Healt Report 2000*, WHO, Geneva – Switzerland.

WRIGHT, C.W., et al. 1991. *Antiamoebic and antiplasmodial activities of alkaloids isolated from Strychnos usambarensis*. Planta Medica. 57, 337-340.

ANEXOS

ANEXO I

PREPARACIÓN DE SOLUCIONES DIVERSAS

1.1 BUFFER ACETATO DE SODIO

- Preparar las siguientes soluciones stock:

a). Solución Stock A: Ácido acético 0.2 M

- Agregar 2.875 ml de ácido acético en 1000 ml de agua destilada y agitar.

b). Solución Stock B: Acetato de sodio 0.2 M

- Disolver 16.4 g de de acetato de sodio en 1000 ml de agua destilada

- En un frasco de 250 ml, colocar 30.5 ml de la solución stock A, agregar 19.5 ml de la solución stock B y finalmente adicionar 50 ml de agua destilada. Agitar bien, medir el pH y ajustar a 4.4. Almacenar a 4 °C hasta su uso.

1.2 SOLUCIONES DE DESCONGELACIÓN

1.2.1 Solución A: Cloruro de sodio al 12%

- Disolver 12 g de cloruro de sodio en 100 ml de agua destilada y esterilizar por filtración con filtro del tipo Millipore de 0.22 µm. Almacenar a 4 °C hasta su uso.

1.2.2 Solución B: Cloruro de sodio al 1.6 %

- Disolver 1.6 g de cloruro de sodio en 100 ml de agua destilada y esterilizar por filtración con filtro del tipo Millipore de 0.22 µm. Almacenar a 4 °C hasta su uso.

1.2.3 Solución C: Cloruro de sodio 0.9 %, dextrosa 0.2 %

- Disolver 0.9 g de cloruro de sodio y 0.2 g de dextrosa en 100 ml de agua destilada y esterilizar por filtración con filtro del tipo Millipore de 0.22 µm. Almacenar a 4 °C hasta su uso.

1.3 SOLUCIÓN DE CONGELACIÓN

- Disolver 3.024 g de sorbitol y 0.65 g de cloruro de sodio en 72 ml de agua destilada. Mezclar la solución con 28 ml de glicerol y esterilizar por filtración con filtro del tipo Millipore de 0.22 µm. Almacenar a 4 °C hasta su uso.

1.4 SOLUCIÓN DE SINCRONIZACIÓN

- Disolver 5 g de D-sorbitol en 100 ml de agua destilada y esterilizar por filtración con filtro del tipo Millipore de 0.22 µm. Almacenar a 4 °C hasta su uso.

1.5 SOLUCIÓN MADRE GIEMSA

- Colocar en un matraz de 250 ml, 50 ml de glicerina y agregar 0,76 g de polvo Giemsa.
- Calentar a 60 °C hasta su completa solubilización.
- Luego agregar 50 ml de metanol y dejar en la oscuridad por 5 días. Transcurrido el tiempo filtrar con papel de filtro y almacenar en un frasco oscuro.
- Esta solución madre, se utiliza para preparar el colorante al 10 % disolviéndolo en Buffer PBS pH 7,4.

1.6 BUFFER FOSFATO

- Disolver en 1000 ml de agua destilada:
  0,2 g de fosfato de potasio monobásico anhidro
  0,5 g de fosfato de sodio dibásico anhidro
- Ajustar el pH a 7,4 con soluciones saturadas de hidróxido de sodio y ácido clorhídrico. Esterilizar por filtración con filtro del tipo Millipore de 0.22 µm y almacenar a 4 °C hasta su uso.

1.7 ANTICOAGULANTE ACD (ÁCIDO CÍTRICO, CITRATO Y DEXTROSA)

- Disolver en 1000 ml de agua destilada:
  7,3 g de ácido cítrico
  22 g de citrato de sodio
  24,5 g de dextrosa
- Esterilizar por filtración con filtro del tipo Millipore de 0.22 µm. Almacenar a 4 °C hasta su uso.

ANEXO II

CÁLCULO DE LA IC_{50}

- Se introduce dos columnas en la hoja de cálculo. Una conteniendo las concentraciones evaluadas y la otra columna sus respectivos porcentajes de inhibición.
- En la columna siguiente se inserta la función **TENDENCIA** y se selecciona primero las 2 celdas contiguas que contienen las concentraciones cuyos valores de porcentajes de inhibición se encuentran por encima y por debajo del 50 por ciento. Luego se selecciona los porcentajes de inhibición respectivos y finalmente se agrega "50". El dato aparecerá automáticamente en la celda

	A	B	C	D	E	E
1	DROGA	CC (mg/ml)	SD	% INH	IC_{50}	IC_{50}
2	A10	1.25	0.027	78.69	=TENDENCIA(**B4:B5,E4:E5,50**)	**0.21**
3	A10	0.625	0.037	78.08		
4	A10	0.3125	0.017	74.06		
5	A10	0.15625	0.034	36.76		
6	A10	0.078	0.142	33.12		

ANEXO III

EJEMPLO PARA LA EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMALÁRICA IN VIVO DE UN EXTRACTO CONTRA *Plasmodium berghei* MEDIANTE EL TEST SUPRESIVO DE 4 DÍAS O "TEST DE PETERS" A UNA DOSIS DE 250 mg/kg

3.1 Cálculo del volumen y preparación de la suspensión de sangre parasitada para infectar los ratones

- Se evalúa la parasitemia (**P**) de los ratones infectados:

  P = 28 %

- Luego se realiza el conteo de GR en los cuatro cuadrantes de los extremos de la cámara con objetivo de 40 X, y se calculó el promedio (**PGR**):

  Conteo : 50, 53, 50, 56

  PGR = 49.75

- Con los datos anteriores se procede a calcular el número de parásitos existentes por ml de sangre total (**NP/ml**):

  NP/ml = PGR x P x 250 x 200 x 1000

  NP/ml = 49.75 x 0.28 x 250 x 200 x 1000

  NP/ml = 69.65×10^7

- Luego se calcula el número de parásitos requeridos para infectar al total de ratones (**NPR**) del experimento:

  NPR = 10^7 x NRG x NG

NPR = $10^7 \times 6 \times 11$

NPR = 66×10^7

Nota: Durante el proceso de infección se pierde pequeñas cantidades de suspensión, es por ello que se recomienda incrementar el número de ratones por grupo de 5 a 6 para efectos de cálculo, con la finalidad de evitar la falta de la suspensión de GRP.

- Se calcula el volumen de sangre total parasitada (**VSP**) necesario para preparar la suspensión de sangre:

$$\mathbf{VSP} = \frac{\text{NPR} \times 1000}{\text{NP/ml}}$$

VSP = $\dfrac{66\times10^7 \text{ parásitos} \times 1000}{69.65\times10^7 \ \mu l}$

VSP = 947.6 µl

- A continuación se calcula el volumen de suspensión de sangre parasitada (**VSSP**) necesaria para infectar al total de ratones en el experimento:

$$\mathbf{VSSP} = 100 \times \text{NRG} \times \text{NG}$$

VSSP = $100 \times 6 \times 11$

VSSP = 6600 µl

- Finalmente se calcula el volumen de suero fisiológico (**VSF**) a utilizar para la preparación de la suspensión de sangre parasitada, la cual será extraída mediante punción cardiaca del ratón donador:

$$\mathbf{VSF} = VSSP - VSP$$

VSF = 6600 µl – 947.6 µl

VSF = 5652.4 µl

- Con los datos obtenidos se procede a preparar la **suspensión de sangre parasitada** necesaria para inocular el grupo de ratones del experimento de la siguiente manera:

  En un tubo estéril de 15 ml, se coloca:

  - 5652.4 µl de suero fisiológico (**VSF**)

  - 946.6 µl de sangre total parasitada (**VSP**

  Se mezcla con suavidad y se procede a inocular por vía intraperitoneal 100 µl de esta suspensión por ratón.

3.2 Cálculo del volumen y preparación de las suspensiónes de extractos

- Antes de realizar los cálculos respectivos se realiza la formación de grupos de **5 ratones** según el número de extractos a evaluar más un grupo control. Se pesa cada ratón y se forman grupos según la proximidad de sus pesos. Luego se realiza el cálculo del peso promedio de los ratones por grupo (**PRG**). Para el ejemplo tomaremos el peso de uno de los grupos:

  PRG = 19.8 g

- Luego se calcula el volumen de solvente (**VS**) necesario para disolver el extracto e inocular los 5 ratones por grupo durante 4 días:

$$\mathbf{VS} = 100 \times NRG \times 4$$

VS = 100 µl x 6 x 4

VS = 2400 µl

Nota: Al igual que con la suspensión de sangre parasitada, el volumen de solvente o de suspensión de extracto se calcula incrementado en 1 el número de ratones del experimento.

- Finalmente se calcula la cantidad de extracto (**PE**) necesario que se disolverá para obtener la concentración a evaluar, en este caso 250 mg/kg:

$$\mathbf{PE} = \frac{C \times PRG \times NRG \times 4}{1000}$$

$$\mathbf{PE} = \frac{250\ mg/ml \times 19.8\ g \times 6 \times 4}{1000}$$

PE = 118.8 mg

- Con los datos obtenidos se procede a preparar la suspensión de extracto de la siguiente manera:

  En un tubo de hemólisis estéril de 5 ml, se colocó:

  - 118.8 mg de extracto (**PE**)

  - 2.4 ml de DMSO (**VS**).

  Utilizando un agitador vortex y en algunos casos el baño maría y/o el ultrasonicador, se procede a disolver el extracto y su inoculación dos horas después de la inoculación de la suspensión de sangre parasitada durante 4 días.

  Este mismo procedimiento se repite con todos los extractos y con las diferentes concentraciones a evaluar.

ANEXO IV

Características de las 10 especies vegetales seleccionadas para la evaluación de actividad antimalárica

Nombre Científico	Hábito	Región:ecología/altitud	Otros usos	Dptos.
Aspidosperma rigidum	Árbol	Amazónica y andina I: tierra firme. 0-1000m	Madera para construcción	HU, LO, MD, PA
Campsiandra angustifolia	Árbol	Amazónica: bosques inundados estacionalmente. 0-500m	Antirreumático y Antidiarreico	LO
Crecentia cujete	Árbol cultivado	Amazónica: zonas alteradas. 0-500m.	Parasitosis intestinal, fiebres y bronquitis	LO
Doliocarpus dentatus	Liana	Amazónica y Andina I: Bosques. 0-1500m		HU, JU, LO, MD, SM
Erythrina fusca	Arbusto o Árbol	Amazónica: orillas de los ríos. 0-500m	Ulceras, Hemorroides, antimicótico.	LO, SM
Euterpe oleraceae	Palmera	Amazónica, Andina I-II: bosques de arena blanca y de tierra firme. 0-2000m	Hepatitis y cólicos. Comestible	AM, CU, HU, LO, MD, PA, SM, UC
Geissospermun reticulatum	Árbol	Amazónica: Bosque de tierra firme. 0-500m.		HU, MD
Grias neuberthii	Árbol	Amazónica, Andina I: Selva. 0-1000m.	Procesos respiratorios	LO, SM
Remijia peruviana	Arbusto, árbol o enredadera	Amazónica, andina I: zonas alteradas, bosques de arena blanca. 0-1000m.		LO, SM
Virola calophylla	Árbol	Amazónica, Andina I: bosques de tierra firme e inundables estacionalmente: 0-1000m.	Antimuguetico	AM, LO, MD, PA, UC

Esta investigación fue realizada gracias al apoyo del Instituto de Investigaciones de la Amazonía Peruana y la Universidad Nacional de la Amazonía Peruana en el marco del Proyecto conjunto ***UNAP-IIAP "Aprovechamiento Sostenible de Plantas Medicinales y Biocidas para Malaria"***

C