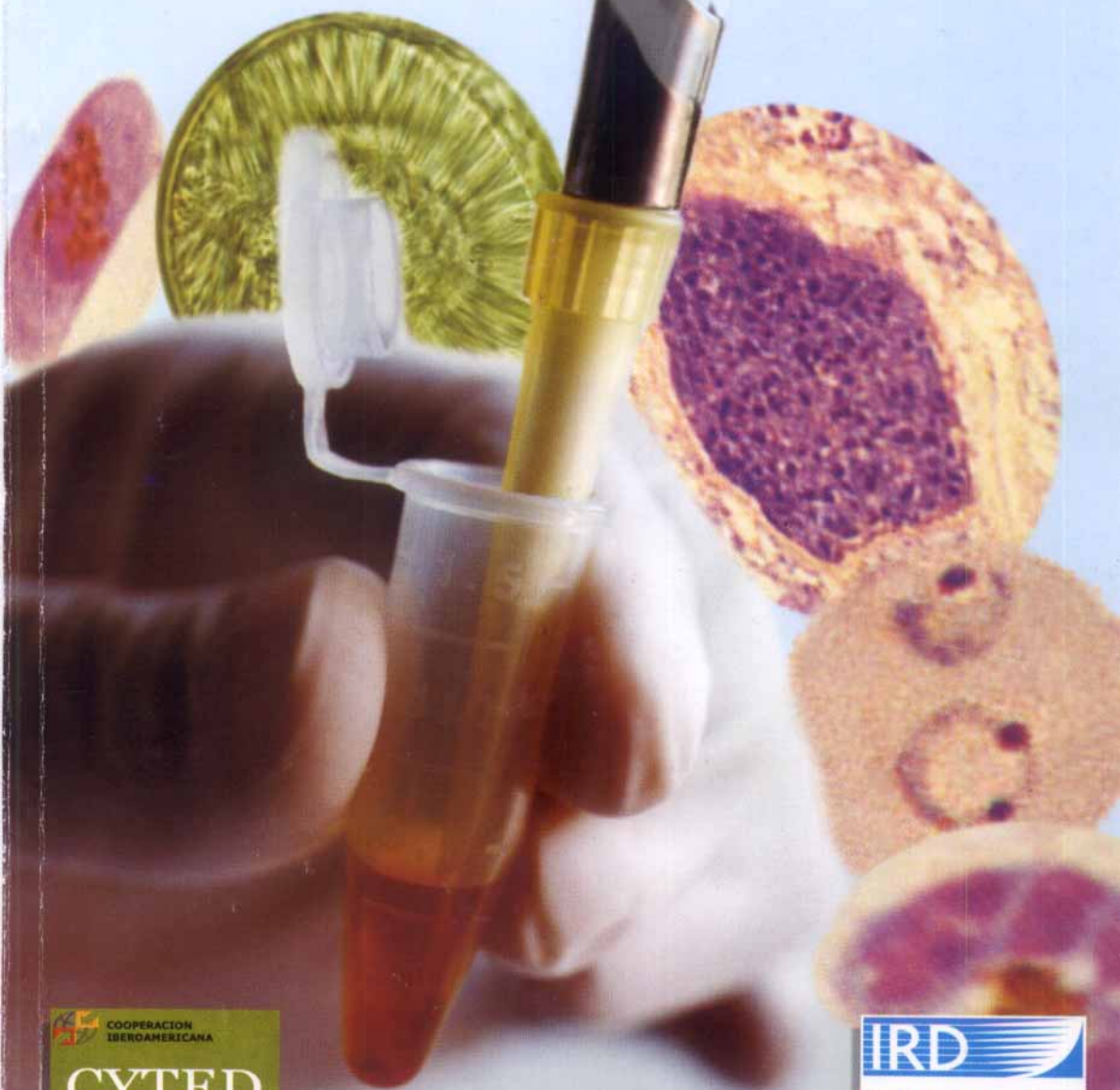


E. Deharo - Ph. Gautret - V. Muñoz - M. Sauvain

# TECNICAS DE LABORATORIO PARA LA SELECCION DE SUSTANCIAS ANTIMALARICAS



E. Deharo, Ph. Gautret, V. Muñoz, M. Sauvain

**TECNICAS DE LABORATORIO  
PARA LA SELECCION  
DE SUSTANCIAS ANTIMALARICAS**

*Editor*

Eric Deharo.

CYTED - IRD

Copyright © 2000 Eric Deharo, Philippe Gautret, Victoria Muñoz, Michel Sauvain

Título: Técnicas de laboratorio para la selección de sustancias antimaláricas

Primera edición: junio 2000

Autores: Eric Deharo, Philippe Gautret, Victoria Muñoz, Michel Sauvain

Depósito legal: 4-1-874-00

Impreso en: Imprenta Perez - La Paz, Bolivia

ISBN 99905-0-050-9

Fotografías: Doanh Baccam, Philippe Gautret y Eric Deharo.

Elaboración electrónica de las fotografías: Eric Deharo.

Elaboración electrónica del texto: Chiara Berlínzani Deharo.

Tapa: la fotografía reproduce un detalle del ciclo evolutivo de *Plasmodium falciparum*.

Los siguientes profesionales colaboraron en la redacción de algunos capítulos: Lic. Ruddy Baelmans (Instituto de Medicina Tropical, Antwerpen, Bélgica); Dr. Ingeborg Berger (Universidad de Viena, Austria); Dr. José Antonio Bravo (Universidad Mayor de San Andrés - UMSA, La Paz, Bolivia); Lic. Jeorgia Callapa (UMSA, La Paz, Bolivia); Ing. Frits Franssen (Universidad de Utrecht, Holanda); Univ. Patricia Oporto (UMSA, La Paz, Bolivia); Tec. Grace Ruiz (UMSA, La Paz, Bolivia).

Los autores:

#### **ERIC DEHARO**

Investigador del Institut de Recherche pour le Développement (IRD, Francia)

en la Universidad Mayor de San Andrés (La Paz, Bolivia).

Dirección postal: Misión IRD, CP 9214, La Paz, BOLIVIA - Fax: (591) 2 225846.

E-mail: plantibba@megalink.com

#### **PHILIPPE GAUTRET**

Investigador del Centre Hospitalier Universitaire de Poitiers (Francia).

Dirección postal: Laboratoire de Parasitologie et de Mycologie, Centre Hospitalier Universitaire la Milettrie, Pavillon Camille Guérin BP 577 - 86021 Poitiers, FRANCIA - Fax: (33) 5 49443908.

E-mail: parasitologie@chu-poitiers.fr

#### **VICTORIA MUÑOZ**

Docente Investigador de la Universidad Mayor de San Andrés (La Paz, Bolivia).

Dirección postal: Instituto de Investigación en Salud y Desarrollo (IINSAD), Facultad de Medicina, Avenida Saavedra n. 2246, CP 10367, La Paz, BOLIVIA. - Fax: (591) 2 224199.

E-mail: fraede@mail.megalink.com

#### **MICHEL SAUVAIN**

Investigador del IRD en el Centre de Recherche sur les Substances Naturelles (Toulouse, Francia).

Dirección postal: CRSN, Parc Technologique du Canal, 3, rue Ariane, 31527 Ramonville, FRANCIA

Fax: (33) 5 61737331

E-mail: sauvain@ns.ird.fr

## Indice

### TECNICAS DE LABORATORIO PARA LA SELECCION DE SUSTANCIAS ANTIMALARICAS

5	.....	Indice
11	.....	Indice de las tablas
12	.....	Indice de las figuras
13	.....	Indice de las fotografias
17	.....	Agradecimientos
19	.....	Prólogo
		<i>Introducción</i>
21		<b>Los Plasmodia humanos</b>
21	.....	Ciclo evolutivo de los <i>Plasmodia</i> humanos
26	.....	Características de los <i>Plasmodia</i> humanos
26	.....	<i>Plasmodium vivax</i>
26	.....	<i>Plasmodium ovale</i>
27	.....	<i>Plasmodium malariae</i>
27	.....	<i>Plasmodium falciparum</i>
		<i>Primera Parte</i>
29		<b>CICLO INTRAERITROCITARIO IN VITRO DE PLASMODIUM FALCIPARUM</b>
		<i>Capítulo 1</i>
31		<b>Cultivo de estadios intraeritrocitarios de <i>Plasmodium falciparum</i></b>
31	.....	Fundamento
33	.....	Material
33	.....	Material biológico
33	.....	Material de plástico, vidrio y otros
33	.....	Reactivos químicos
34	.....	Equipo
34	.....	Método
34	.....	Preparación del material biológico
34	.....	Obtención de glóbulos rojos
35	.....	Obtención de suero o plasma
35	.....	RPMI-1640
35	.....	RPS
36	.....	Descongelación de las cepas de <i>Plasmodium</i>
36	.....	Fundamento del proceso de congelación-descongelación
36	.....	Técnica 1
38	.....	Técnica 2
40	.....	Adaptación al cultivo
43	.....	Congelación de las cepas de <i>Plasmodium</i>

43.....	Técnica 1
44.....	Técnica 2
45.....	Sincronización
45.....	Concentración de estadios maduros por flotación
45.....	Fundamento
46.....	Material
46.....	Reactivos químicos
46.....	Método
46.....	Preparación de la gelatina
47.....	Preparación del Percoll®
49.....	Concentración de formas jóvenes
49.....	Fundamento
49.....	Material
49.....	Reactivos químicos
49.....	Método
	<b>Capítulo 2</b>
51	<b>Evaluación de la actividad antimalárica <i>in vitro</i> de productos naturales o de síntesis</b>
52.....	Métodos generales
52.....	Micrométodo radioisotópico
52.....	Fundamento
52.....	Material
52.....	Material de plástico, vidrio y otros
52.....	Reactivos químicos
53.....	Equipo
53.....	Método
53.....	Preparación de la hipoxantina marcada
54.....	Preparación de las drogas (extractos crudos)
54.....	Preparación de la placa
55.....	Incorporación de hipoxantina tritiada
56.....	Comparación 24/72 horas
56.....	Análisis de los resultados
58.....	Método visual
58.....	Fundamento
58.....	Material
58.....	Material de plástico, vidrio y otros
58.....	Reactivos químicos
59.....	Método
60.....	Análisis de los resultados
64.....	Método bioquímico
64.....	Fundamento
66.....	Material
67.....	Método
67.....	Preparación extemporánea de la solución de APAD (coenzima) y L-lactato (substrato)
67.....	Preparación extemporánea de la solución NBT/PES
69.....	Método fluorométrico
69.....	Fundamento
69.....	Material
69.....	Material de plástico, vidrio y otros
69.....	Reactivos químicos
70.....	Equipo
70.....	Método
70.....	Preparación de los reactivos
71.....	Preparación de las drogas (extractos crudos, fracciones, metabolitos puros)
71.....	Test
71.....	Aislamiento de ADN y fluorometría
72.....	Análisis de los resultados
72.....	Determinación de la CI <sub>50</sub>
74.....	Métodos particulares

74.....	Estudio de la interacción de drogas <i>in vitro</i>
74.....	Fundamento
75.....	Material
75.....	Material de plástico, vidrio y otros
75.....	Reactivos químicos
75.....	Equipo
75.....	Método
75.....	Método de los isobogramas
75.....	Preparación de la placa de 96 alvéolos
76.....	Análisis de los resultados
78.....	Método del cálculo del Índice de Incremento de Actividad (IIA)
80.....	Efecto de drogas sobre la permeabilidad membranaria de glóbulos rojos parasitados
80.....	Fundamento
80.....	Material
80.....	Material de plástico, vidrio y otros
80.....	Reactivos químicos
80.....	Equipo
80.....	Método 1
81.....	Método 2
82.....	Análisis de los resultados
84.....	Inhibición de la polimerización del heme
84.....	Fundamento
85.....	Material
85.....	Material biológico
85.....	Material de plástico, vidrio y otros
85.....	Reactivos químicos
85.....	Método

Segunda Parte

89 **CICLO INTRAERITROCITARIO *IN VIVO* DE *PLASMODIUM* DE ROEDORES**

*Introducción*

91 **Ética y cuidado de los animales**

*Capítulo 1*

95 **Los *Plasmodia* de roedores**

95..... Fundamento

97..... *Plasmodium vinckei*

97..... *Plasmodium chabaudi*

97..... *Plasmodium berghei*

98..... *Plasmodium yoelii*

*Capítulo 2*

101 **Mantenimiento de las cepas**

101..... Fundamento

101..... Material

101..... Material biológico

101..... Material de plástico, vidrio y otros

102..... Reactivos químicos

102..... Equipo

102..... Método

102..... Congelación de las cepas a partir de ratón infectado

102..... Descongelación de las cepas a partir de sangre infectada congelada

103..... Mantenimiento de la cepa (pase de un ratón a otro)

103..... Conteo de glóbulos rojos parasitados

Capítulo 3

105 Evaluación de la actividad antimalárica *in vivo* de productos naturales o de síntesis

- 105..... "Test supresivo de 4 días" (o "Test de Peters")  
 105..... Fundamento  
 105..... Material  
 105..... Material biológico  
 106..... Material de plástico, vidrio y otros  
 106..... Reactivos químicos  
 106..... Equipo  
 106..... Método  
 107..... Obtención de la cantidad requerida de glóbulos rojos parasitados/ml  
 108..... Cuento de glóbulos rojos  
 108..... *Lectura con la cámara de Thoma*  
 109..... *Lectura con la cámara de Neubauer*  
 110..... *Lectura con la cámara de Malassez*  
 111..... *Cálculos para preparar la suspensión de glóbulos parasitados para infectar los ratones*  
 112..... *Cálculos para preparar las drogas para el tratamiento de los ratones infectados*  
 113..... Administración de las drogas  
 114..... "Test Rane"  
 114..... Fundamento  
 114..... Material  
 114..... Material biológico  
 114..... Material de plástico, vidrio y otros  
 114..... Reactivos químicos  
 114..... Equipo  
 115..... Método  
 116..... Estudio de la interacción de drogas *in vivo*  
 116..... Fundamento  
 116..... Material  
 116..... Material biológico  
 116..... Material de plástico, vidrio y otros  
 116..... Reactivos químicos  
 116..... Equipo  
 117..... Método  
 117..... Análisis de los resultados

Capítulo 4

119 Determinación del estadio sensible

- 119..... Fundamento  
 120..... Definición de los estadios eritrocitarios  
 120..... Anillo  
 120..... Trofozoito joven  
 120..... Trofozoito maduro  
 120..... Trofozoito viejo  
 120..... Esquizonte  
 121..... Índice de sincronización  
 122..... Métodos de sincronización  
 122..... *Sincronización con la técnica del Percoll®-glucosa*  
 122..... Fundamento  
 123..... Material  
 123..... Material biológico  
 123..... Material de plástico, vidrio y otros  
 123..... Reactivos químicos  
 124..... Equipo  
 124..... Método  
 124..... Preparación del PBS 10X  
 124..... Preparación del PBS-G 10X  
 124..... Preparación de las muestras de sangre parasitada  
 125..... Preparación del Percoll®-glucosa  
 126..... Extracción de las fracciones

126	.....	Infección y seguimiento de la fórmula parasitaria
127	.....	<i>Sincronización con la técnica de la sangre congelada</i>
127	.....	Fundamento
127	.....	Material
127	.....	Material biológico
127	.....	Material de plástico, vidrio y otros
127	.....	Reactivos químicos
127	.....	Equipo
128	.....	Método
128	.....	Métodos de evaluación del impacto de una droga
128	.....	<i>Evaluación del período prepatente</i>
128	.....	Fundamento
128	.....	Material
128	.....	Método
129	.....	Análisis de los resultados
129	.....	<i>Seguimiento de la fórmula parasitaria</i>
129	.....	Fundamento
129	.....	Material
129	.....	Método
130	.....	Análisis de los resultados

*Capítulo 5*

131 **Evaluación de la cinética de actividad de una droga**

131	.....	Fundamento
131	.....	Material
131	.....	Material biológico
131	.....	Material de plástico, vidrio y otros
132	.....	Reactivos químicos
132	.....	Equipo
132	.....	Método

*Capítulo 6*

133 **Inducción de la resistencia**

133	.....	Fundamento
133	.....	Material
133	.....	Material biológico
133	.....	Material de plástico, vidrio y otros
134	.....	Reactivos químicos
134	.....	Equipo
134	.....	Método

Tercera Parte

137 **CICLO SEXUAL Y ESTADIO HEPATICO DE *PLASMODIUM* DE ROEDORES**

*Capítulo 1*

139 **Los mosquitos**

139	.....	Reproducción
139	.....	Fundamento
143	.....	Material
143	.....	Material biológico
143	.....	Material de plástico, vidrio y otros
145	.....	Reactivos químicos
145	.....	Equipo
147	.....	Método
147	.....	Adultos
148	.....	Huevos
150	.....	Larvas
151	.....	Manipulación
151	.....	Fundamento



151	.....	Material
151	.....	Material biológico
151	.....	Material de plástico, vidrio y otros
151	.....	Reactivos químicos
151	.....	Equipo
151	.....	Método
151	.....	Disección del estómago
154	.....	Extracción de las glándulas salivares
		<i>Capítulo 2</i>
157		<b>Test para la evaluación de las drogas gametocidas</b>
157	.....	Fundamento
157	.....	Material
157	.....	Material biológico
158	.....	Material de plástico, vidrio y otros
158	.....	Reactivos químicos
158	.....	Equipo
159	.....	Método
159	.....	Infección y tratamiento de los ratones
159	.....	Infección de los mosquitos
160	.....	Evaluación del número de ooquistes
		<i>Capítulo 3</i>
163		<b>Test para la evaluación de las drogas esporonticidas</b>
163	.....	Fundamento
163	.....	Material
164	.....	Método
164	.....	Infección y tratamiento de los ratones
164	.....	Infección de los mosquitos
164	.....	Evaluación del número de ooquistes
		<i>Capítulo 4</i>
165		<b>Test para la evaluación de las drogas activas sobre el estadio hepático</b>
165	.....	Fundamento
165	.....	Material
165	.....	Material de plástico, vidrio y otros
166	.....	Reactivos químicos
166	.....	Equipo
166	.....	Método
166	.....	Infección y tratamiento de los ratones
		<i>Cuarta Parte</i>
169		<b>PRODUCTOS NATURALES ANTIPALUDICOS DE AMERICA LATINA</b>
		<i>Introducción</i>
171		<b>Selección de plantas medicinales</b>
		<i>Capítulo 1</i>
173		<b>Alcaloides</b>
		<i>Capítulo 2</i>
179		<b>Compuestos grasos y terpenos</b>
179	.....	Compuestos grasos
179	.....	Terpenos
184	.....	Conclusión

## Índice de las tablas

21	Tabla 1	Taxonomía
42	Tabla 2	Tabla de dilución
55	Tabla 3	Disposición de 4 drogas a 4 concentraciones crecientes
57	Tabla 4	Fórmula para el cálculo del porcentaje de inhibición de la incorporación de la hipoxantina
59	Tabla 5	Preparación del colorante Giemsa
59	Tabla 6	Preparación de la solución tampón fosfato
61	Tabla 7	Fórmula para el cálculo del porcentaje de inhibición
72	Tabla 8	Cálculo de la interpolación lineal
75	Tabla 9	Contenido de un alvéolo antes de la incorporación de la hipoxantina
76	Tabla 10	Cuadro de las concentraciones
76	Tabla 11	Cálculo de las $CI_{50}$ fraccionales
83	Tabla 12	Cálculo del porcentaje de lisis
87	Tabla 13	Cálculo del porcentaje de inhibición de la polimerización del heme
103	Tabla 14	Cálculo del porcentaje de parasitemia
108	Tabla 15	Ejemplo de conteo con cámara de Thoma
109	Tabla 16	Ejemplo de conteo con cámara de Neubauer
110	Tabla 17	Ejemplo de conteo con cámara de Malassez
111	Tabla 18	Número de parásitos requeridos
111	Tabla 19	Número de parásitos/ml de sangre de ratón donador
111	Tabla 20	Volumen de sangre infectada a tomar
111	Tabla 21	Dilución de sangre obtenida
112	Tabla 22	Volumen de solvente para la preparación de las drogas
112	Tabla 23	Preparación de la suspensión de droga
113	Tabla 24	Porcentaje de inhibición
126	Tabla 25	Seguimiento del desarrollo de la fórmula parasitaria en un ratón infectado por <i>P. yoelii nigeriensis</i> sincronizado
130	Tabla 26	Seguimiento del desarrollo de la fórmula parasitaria en un ratón infectado por <i>P. vinckei petteri</i> tratado con arteether
161	Tabla 27	Cálculo del porcentaje de inhibición del número de ooquistes
167	Tabla 28	Grado de actividad antiesporozoitos

## Índice de las figuras

22.....	Figura 1.....	Ciclo evolutivo de los <i>Plasmodia</i> humanos
28.....	Figura 2.....	Características diferenciales de los <i>Plasmodia</i> humanos en su fase eritrocitaria
32.....	Figura 3.....	Reloj biológico de <i>Plasmodium falciparum</i>
37.....	Figura 4.....	Técnica 1 de descongelación
39.....	Figura 5.....	Técnica 2 de descongelación
43.....	Figura 6.....	Técnica 1 de congelación
45.....	Figura 7.....	Técnica 2 de congelación
47.....	Figura 8.....	Sincronización con gelatina
48.....	Figura 9.....	Sincronización con Percoll®
50.....	Figura 10.....	Concentración de formas jóvenes
60.....	Figura 11.....	Realización de un frotis
62.....	Figura 12.....	Fórmulas de algunas moléculas antimaláricas clásicas (I)
63.....	Figura 12.....	Fórmulas de algunas moléculas antimaláricas clásicas (II)
65.....	Figura 13.....	Conversión metabólica de la glucosa en <i>Plasmodium</i>
73.....	Figura 14.....	Representación gráfica del análisis tipo 3n-polinomial y de la interpolación lineal
77.....	Figura 15.....	Representación gráfica de un isoblograma
78.....	Figura 16.....	Representación gráfica del IIA
82.....	Figura 17.....	Estudio de la permeabilidad membranaria
85.....	Figura 18.....	Fórmulas del heme y del FPIX
87.....	Figura 19.....	Representación gráfica de la determinación de la $CI_{50}$ de la cloroquina
96.....	Figura 20.....	Mapa de las zonas de descubrimiento de los <i>Plasmodia</i> de roedores
109.....	Figura 21.....	Cámaras de conteo
110.....	Figura 22.....	Cámara de Malassez
122.....	Figura 23.....	Fórmula del índice de sincronización
140.....	Figura 24.....	Ciclo evolutivo del mosquito
152.....	Figura 25.....	Disección del estómago del mosquito
154.....	Figura 26.....	Extracción de las glándulas salivares del mosquito
175.....	Figura 27.....	Tubulosina
175.....	Figura 28.....	Cordobimina
176.....	Figura 29.....	Krukovina
176.....	Figura 30.....	Quinolinas substituidas en 2
177.....	Figura 31.....	Sarachina
180.....	Figura 32.....	Sergeolido
180.....	Figura 33.....	Glaucarubínona
181.....	Figura 34.....	Gutolactona
181.....	Figura 35.....	Simalikalactona D
182.....	Figura 36.....	Cedronina
182.....	Figura 37.....	Gedunina
183.....	Figura 38.....	Neuroleninas

## Índice de las fotografías

40	.....Foto 1	.....Caja Petri
41	.....Foto 2	.....Candle Jarr
46	.....Foto 3	.....Formas maduras intraeritrocitarias de <i>Plasmodium falciparum</i>
53	.....Foto 4	.....Colector de células
56	.....Foto 5	.....Colección de filtros radiomarcados
84	.....Foto 6	.....Hemozoína
86	.....Foto 7	.....Placa de lectura
107	.....Foto 8	.....Inyección intravenosa
108	.....Foto 9	.....Material de numeración
121	.....Foto 10	.....Estadios eritrocitarios de <i>Plasmodium vinckei petteri</i>
125	.....Foto 11	.....Separación por Percoll®
141	.....Foto 12	.....Mosquitos adultos
142	.....Foto 13	.....Larvas acuáticas
143	.....Foto 14	.....Criadero de plástico
144	.....Foto 15	.....Cubetas de plástico
144	.....Foto 16	.....Recipiente para agua azucarada
145	.....Foto 17	.....Cajas para mosquitos
146	.....Foto 18	.....Capturador de mosquitos
147	.....Foto 19	.....Captura de mosquitos
149	.....Foto 20	.....Alimentación de los mosquitos
153	.....Foto 21	.....Estómago infectado
155	.....Foto 22	.....Esporozoitos
158	.....Foto 23	..... <i>Anopheles</i> hembra
160	.....Foto 24	.....Inmovilización de los ratones
161	.....Foto 25	.....Mosquitos en ayuno y mosquitos alimentados



**TECNICAS DE LABORATORIO  
PARA LA SELECCIÓN DE SUSTANCIAS ANTIMALARICAS**



## *Agradecimientos*

*Agradecemos al Institut de Recherche pour le Développement (IRD), al programa CYTED, subprograma X (química fina farmacéutica), proyecto X5 (búsqueda, obtención y evaluación de nuevos agentes antiparasitarios) y al Ministerio de Previsión Social y Salud Pública Boliviano por haber contribuido económicamente a la realización de este trabajo.*

*La parte iconográfica fue enriquecida gracias al excelente software de identificación y de enseñanza Les anophèles de la région afro-tropicale elaborado por J.-P. Hery, G. Le Goff, B. Geoffroy, J.-P. Hervé, L. Manga, J. Brunhes (E-mail: Jacques.Brunhes@mpl.ird.fr), Orstom (IRD) Editions, 209-213 rue Lafayette, 75480 Paris cedex 10, France.*

*La sección "Ciclo sexual y estadio hepático de Plasmodium de roedores" recibió el apoyo técnico del Dr. François Miltgen y de la Sra Françoise Gonnet.*

*Un agradecimiento particular está dirigido a los profesores Irène Landau y Alain Gabriel Chabaud del Museum National d'Histoire Naturelle de Paris (France), así como al profesor Hagai Ginsburg del Institute of Life Sciences de Jerusalén (Israel), que brindaron a los autores sus conocimientos en el campo de la malaria.*





## *Prólogo*

La situación de la malaria en el mundo tropical se agrava cada año por tres razones principales:

1. La disminución de los esfuerzos de lucha contra el paludismo en muchos países. Esta situación es debida a la crisis económica así como al precio de los medicamentos antimaláricos, fuera del alcance de las poblaciones que viven en zonas endémicas.
2. El desarrollo de la resistencia de los vectores a los insecticidas.
3. La expansión de la resistencia del parásito a la cloroquina y a la mayoría de los otros antipalúdicos utilizados.

Desafortunadamente las perspectivas de una vacuna ideal no son inmediatas y el control de la malaria se basa esencialmente en los medicamentos antipalúdicos. Esta situación muestra la necesidad de una investigación prioritaria en nuevos fármacos con estructuras originales accesibles a las poblaciones afectadas, que en su mayor parte son de escasos recursos.

La investigación de medicamentos contra las grandes enfermedades parasitarias (malaria, leishmaniasis, tripanosomiasis), desde hace varios años ha disminuido en casi todas las empresas farmacéuticas internacionales. Este fenómeno es debido principalmente a la vida comercial muy corta de los antipalúdicos a causa del establecimiento rápido de la resistencia y a los bajos ingresos económicos provenientes de la venta de estos medicamentos, que por los elevados costos de desarrollo son denominados “huérfanos” de la ciencia “comercial”.

Actualmente la investigación en quimioterapia experimental antipalúdica, con la finalidad de obtener nuevas drogas efectivas, está limitada a algunos institutos estatales.

En este sentido, el propósito de los autores es dar a conocer la mayor información posible sobre los elementos básicos del estudio de la actividad antimalárica de sustancias naturales (o de síntesis) con la finalidad de brindar apoyo a los laboratorios involucrados en la búsqueda de nuevos fármacos para luchar contra esta plaga.

Luego de una breve *Introducción* sobre la biología del parásito, en la *Primera* y la *Segunda Parte* del libro detallamos los métodos de estudio *in vitro* e *in vivo* de moléculas potencialmente activas contra la fase eritrocitaria de desarrollo del parásito. La *Tercera Parte* comprende los métodos de estudio *in vitro* e *in vivo* de compuestos potencialmente activos contra la fase exoeritrocitaria. Finalmente, en la *Cuarta Parte*, presentamos una breve revisión bibliográfica de los productos naturales y de las plantas antimaláricas de mayor interés de América Latina.

## Referencias

- Malaria Database (WHOTDR) WEHI/Monash University  
<http://www.wehi.edu.au/MalDB-www/who.html>
- Malaria discussion mailserver  
<http://www.wehi.edu.au/MalDB-www/discuss/listserv.html>
- Malaria Foundation International  
<http://www.malaria.org/>
- Malaria Network (WHO)  
<http://www.malariainetwork.org/>
- Malaria parasite biochemistry,  
<http://sites.huji.ac.il/malaria/>
- NCBI Malaria Genetics and Genomics website  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Malaria/>
- NIAID Repository parasite, vector, and host cell reagents ATCCMR4 homepage  
<http://www.malaria.mr4.org/>
- NIH's support for malaria research and research training  
<http://www.niaid.nih.gov/slideshow/default.htm>
- Plasmodium falciparum* Genome Project Consortium  
[http://www.sanger.ac.uk/Projects/P\\_falciparum/who&what.shtml](http://www.sanger.ac.uk/Projects/P_falciparum/who&what.shtml)
- Plasmodium falciparum* (Pf) Genome Project Stanford DNA Sequence and Technology Center  
<http://sequence-www.stanford.edu/group/malaria/index.html>
- The *Plasmodium falciparum* Genome Database (PFDB)  
<http://www.tigr.org/tdb/edb/pfdb/pfdb.html>
- The Sanger Centre  
<http://www.sanger.ac.uk/>
- WHO: Division of Control of Tropical Diseases - Malaria  
<http://www.who.int/ctd/html/malaria.html>
- World Health Organization (WHO) Homepage  
<http://www.who.int/>

*Introducción*  
LOS PLASMODIA HUMANOS

CICLO EVOLUTIVO DE LOS PLASMODIA HUMANOS

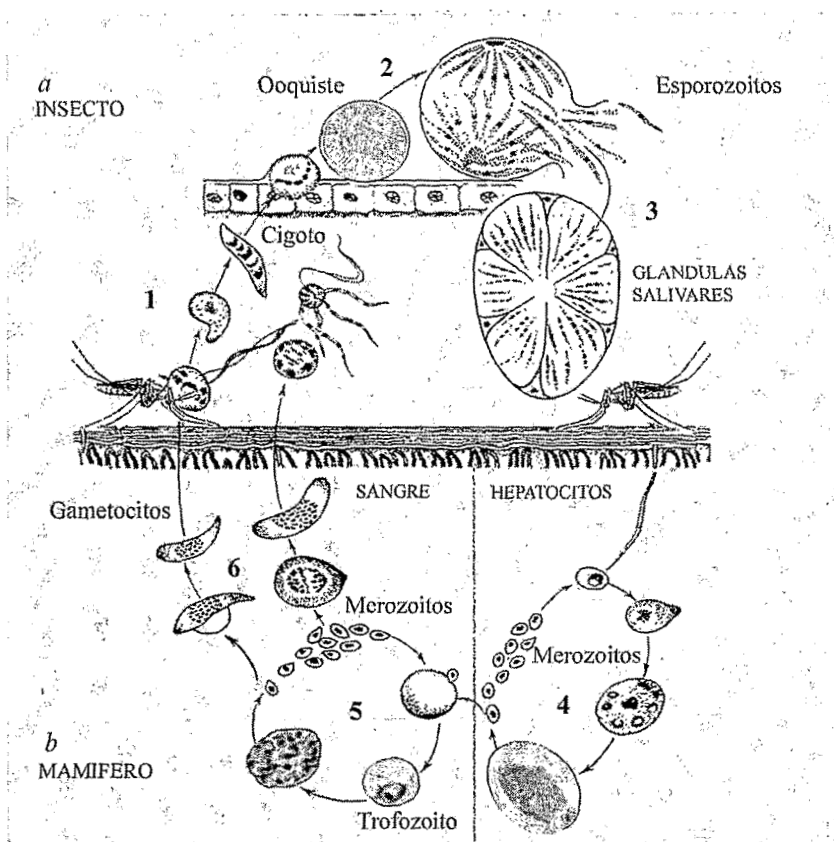
De las cien especies de *Plasmodium* conocidas, solamente cuatro se encuentran en el ser humano: *Plasmodium vivax*, *Plasmodium ovale*, *Plasmodium falciparum* y una especie común al hombre y al mono, el *Plasmodium malariae* (Tabla 1).

**Tabla 1**  
*Taxonomía*

Reino .....	Animalia
Subreino .....	Protozoa
Phylum .....	Sporozoa (apicomplexa)
Clase .....	Sporozoa
Subclase .....	Coccidia
Superorden .....	Euccocidiae
Orden .....	Haemosporida
Suborden .....	Aconoidina
Familia .....	Haemosporidae
Género .....	<i>Plasmodium</i>
Especies .....	<i>falciparum</i>
(en el humano) .....	<i>malariae</i>
.....	<i>ovale</i>
.....	<i>vivax</i>

Estas especies presentan ciclos evolutivos similares (Figura 1). Dos huéspedes son necesarios para completar el ciclo: el humano, huésped *intermediario*, donde tiene lugar la multiplicación asexual o *esquizogonia*, y el mosquito, huésped *definitivo*, donde se desarrolla la multiplicación sexual o *esporogonia*.

**Figura 1**  
Ciclo evolutivo de los Plasmodia humanos



Cuando el mosquito hembra (un Culicidae del género *Anopheles*) pica una persona infectada por *Plasmodium* (Figura 1a) 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.

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  $\mu\text{m}$  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 llega a la formación de un *cigoto*, la única forma diploide del ciclo parasitario.

El cigoto se alarga, se mueve, y por lo tanto se denomina *ookinete* (18 a 24  $\mu\text{m}$  de diámetro). Esta formación tiene un complejo apical apto a la penetración celular. Un complejo apical comprende:

- unos microtúbulos que mantienen una forma en pera y participan a la movilidad;
- un anillo apical, unos micronemas (pequeñas vesículas);
- unas estructuras denominadas roptrias (grandes vesículas).

El ookinete 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 sobresalen en la parte externa del estómago del mosquito que puede alojar centenares de ooquistes (no es el caso para *Plasmodium malariae* por lo cual las infecciones son siempre leves).

El desarrollo del ooquiste (hasta 40 o 80  $\mu\text{m}$  de diámetro) conduce a la producción asexual de numerosos esporozoitos (alrededor de 10.000), haploides, delgados, filiformes (15  $\mu\text{m}$  de largo), con complejo apical. Al liberarse, se dispersan en el cuerpo del mosquito. Las glándulas salivares del mosquito contienen de 100 hasta 70.000 esporozoitos.

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. malariae*).

El ciclo en el ser humano presenta dos fases de multiplicación asexual, 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 salivares del mosquito son inyectados con la saliva del insecto en el momento de la picadura (Figura 1b). 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 Kupffer*. 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 Kupffer, 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. malariae* de *P. vivax* y *P. ovale*.

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 estadio, llamado *hipnozoito*, puede permanecer meses antes de iniciar la división asexual.

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 *esquizonte hepático*, libera 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. malariae*.

Cuando el merozoito toca la superficie del eritrocito la invagina ligeramente; 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.

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.

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.

Debido a que al inicio de la infección la ruptura de los eritrocitos infectados no es sincrónica, la fiebre es raramente intermitente pero 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).

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.

La fecundidad de *Plasmodium* es extraordinaria: de un ookinete 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 ookinete podría dar teóricamente hasta un millar de nuevos parásitos...

### Referencias

- Peters, W. (1987) *Chemotherapy and drug resistance in malaria*. 2 voll., Academic Press, London.
- Rhodain, F. and Perez, C. (1985) *Précis d'entomologie médicale et vétérinaire*. Ed. Maloine, Paris.
- Sherman, W.I. editor (1999) *Malaria: Parasite Biology, Pathogenesis and Protection*. American Society for Microbiology, Washington, D.C.



*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.

*Plasmodium ovale*

Es muy próximo de *P. vivax*, con el cual fue confundido por mucho tiempo. Está ampliamente distribuido en Africa 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.

### *Plasmodium malariae*

Es menos frecuente que *P. vivax* o *P. 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. malariae* 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. malariae* 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.

### *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.

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.

**Figura 2**  
*Características diferenciales de los Plasmodia humanos en su fase eritrocitaria*

	<i>falciparum</i>	<i>malariae</i>	<i>vivax</i>	<i>ovale</i>
<b>Glóbulo parasitado</b>	 normal monocromático	 normal o retractado monocromático	 hipertrofiado granulaciones de Schüffner	 hipertrofiado ovalado gran. Schüffner
<b>Trofozoito joven</b>	 pequeño, multiparasitado, cromatina doble	 en banda o anillado	 anillado grande	 ovalado irregular
<b>Trofozoito adulto</b>	rara vez en sangre periférica	grande en banda, 1/3 del glóbulo	grande, ameboide, 2/3 del glóbulo	grande, irregular, ovale
<b>Esquizonte</b>	rara vez en sangre periférica 16 merozoitos	en banda, roseta, 8 merozoitos	grande, ameboide, 16 merozoitos	irregular, pigmentado, 8 a 16 merozoitos
<b>Gametocito</b>	 semiluna, pigmento	 idem vivax, más pequeño	 grande, pigmento abundante	 ovoide, pigmento

### Referencias

- Gentilini, M. (1995) *Médecine Tropicale*. Flammarion, Paris.
- Markell, E.K., Voge, M. and John, D.T. (1994). *Parasitología Médica*. InterAmericana Mc Graw-Hill, Madrid.

*Primera Parte*

**CICLO INTRAERITROCITARIO *IN VITRO*  
DE *PLASMODIUM FALCIPARUM***



## Capítulo 1

### CULTIVO DE ESTADIOS INTRAERITROCITARIOS DE *PLASMODIUM FALCIPARUM*

Las primeras fases eritrocitarias 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.

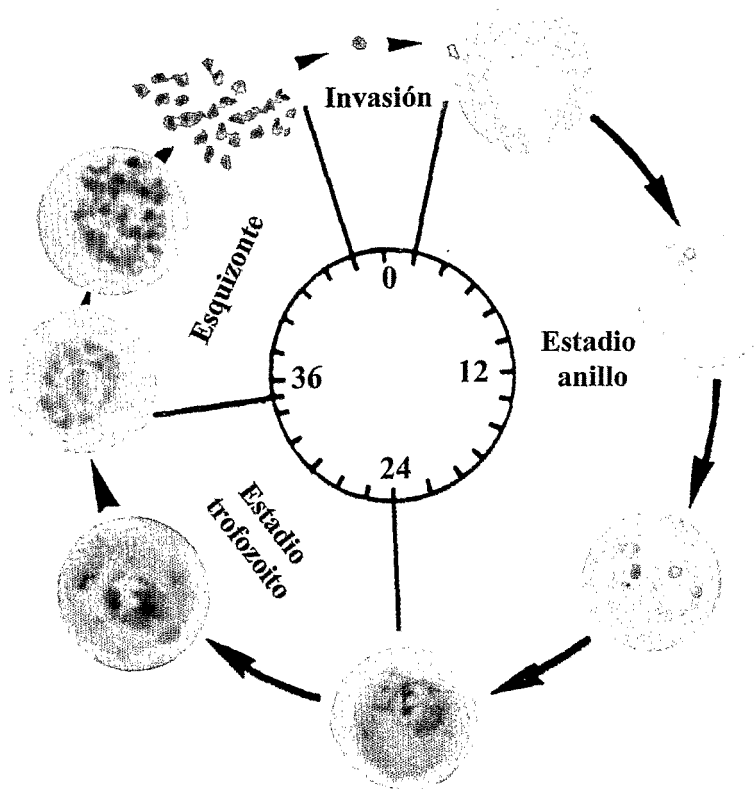
#### FUNDAMENTO

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

- 1) el buen conocimiento del ciclo biológico intraeritrocitario del parásito (Figura 3);
- 2) el uso de un medio de cultivo particular, el RPMI (*Roswell Park Memorial Institute*), suplementado con suero o plasma humano (10-20%);
- 3) la regeneración del medio de cultivo por cambios frecuentes;
- 4) la reducción de la tensión de oxígeno (2-10%) y el incremento del CO<sub>2</sub> (3-5%).

Seguir cuidadosamente los pasos descritos en este capítulo asegurará el crecimiento de los estadios intraeritrocitarios de *Plasmodium falciparum*.

**Figura 3**  
*Reloj biológico de Plasmodium falciparum*



Los problemas de cultivo provienen generalmente de las siguientes causas:

- 1) utilización de agua de mala calidad para preparar el medio;
- 2) suero proveniente de donadores tratados con antibióticos o antimaláricos;
- 3) variaciones de temperatura (estufa mal regulada, medio de cultivo no atemperado a 37 °C antes de su uso);
- 4) pH no óptimo;
- 5) contaminación con bacterias y hongos;
- 6) frecuencia insuficiente de cambio de medio de cultivo;
- 7) congelación y descongelación de cepas efectuadas de manera no adecuada.

## MATERIAL

### Material biológico

- ◇ Eritrocitos humanos no infectados (utilizar siempre el mismo grupo sanguíneo).
- ◇ Glóbulos rojos humanos (GR) infectados con *Plasmodium falciparum*.
- ◇ Medio de cultivo RPMI 1640 (tipo GIBCO 079-03018A o Sigma R-4130), que contiene:
  - 25 mM de HEPES;
  - 300 mg/l de L-glutamina;
  - 2 g/l de glucosa.
- ◇ Suero o plasma humano (compatible con el mismo grupo sanguíneo de los GR-empleados).

### Material de plástico, vidrio y otros

- ◇ Cajas Petri estériles de 100 mm, 60 mm o 35 mm de diámetro.
- ◇ Criotubos de 2 ml estériles.
- ◇ Filtros Millipore® de 0,22  $\mu$ m.
- ◇ Frascos estériles de cultivo de 25 cm<sup>2</sup> (50 ml) de cuello inclinado.
- ◇ Frascos estériles de cultivo de 75 cm<sup>2</sup> (150 ml) de cuello inclinado.
- ◇ Frascos estériles de cultivo de 250 ml.
- ◇ Guantes.
- ◇ Jeringas de 1 ml, 5 ml y 50 ml, con agujas de 25 G y 20 G.
- ◇ Láminas de vidrio para realizar frotis.
- ◇ Matraz Erlenmeyer de 1000 ml.
- ◇ Micropipetas de 5-50  $\mu$ l.
- ◇ Micropipetas de 50-200  $\mu$ l.
- ◇ Micropipetas de 200-1000  $\mu$ l.
- ◇ Pipetas estériles de 1, 2, 5 y 10 ml.
- ◇ Pipetas Pasteur estériles.
- ◇ Porta-objetos.
- ◇ Probetas de 1000 ml.
- ◇ Puntas estériles amarillas de 2-200  $\mu$ l.
- ◇ Puntas estériles azules de 200-1000  $\mu$ l.
- ◇ Tubos estériles de centrifugación de 15 ml.
- ◇ Tubos estériles de centrifugación de 50 ml.
- ◇ Tubos tipo Eppendorf® de 1,5 ml.
- ◇ Vela.

### Reactivos químicos

- ◇ Agua bidestilada desionizada.
- ◇ Antibióticos (gentamicina, neomicina, penicilina o estreptomina).
- ◇ Anticoagulante ACD (en 1 litro de agua: 7,3 g de ácido cítrico; 22 g de citrato; 24,5 g de dextrosa).
- ◇ Bicarbonato de sodio anhidro.
- ◇ Cloruro de potasio p.a.



- ◇ Cloruro de sodio p.a.
- ◇ Colorante Giemsa (ver la preparación en el párrafo “Método visual”, Capítulo 2, Primera Parte).
- ◇ Dextrosa.
- ◇ Dimetilsulfóxido (DMSO).
- ◇ D-sorbitol.
- ◇ Glicerina.
- ◇ Lactato de sodio p.a.
- ◇ Metanol.
- ◇ Tampón fosfato PBS (ver la preparación en el párrafo “Sincronización con la técnica del Percoll®-glucosa”, Capítulo 5, Segunda Parte), pH 7,4.

Equipo
--------

- ◇ Agitador magnético.
- ◇ Autoclave.
- ◇ Baño-maría.
- ◇ Candle Jarr (desecador con llave).
- ◇ Centrífuga.
- ◇ Congelador.
- ◇ Contenedor de nitrógeno líquido (con su cuaderno de congelación).
- ◇ Estufa básica para cultivo (37 °C) o con alimentación para CO<sub>2</sub>.
- ◇ Flujo laminar.
- ◇ Microscopio.
- ◇ pHmetro.
- ◇ Pipeta automática (tipo Pipetus®).
- ◇ Refrigeradora.
- ◇ Vortex.

## METODO

Preparación del material biológico
------------------------------------

### *Obtención de glóbulos rojos*

- 1) Colectar sangre estérilmente, empleando 1,5 ml del anticoagulante ACD por 10 ml de sangre. Se puede utilizar sangre de cualquier grupo, pero no mezclar diferentes grupos. Los donadores no deben haber recibido tratamiento alguno en los días previos a la toma de sangre. La sangre colectada (aproximadamente 11,5 ml) se transfiere asépticamente a un tubo estéril de centrifugación de 15 ml.
- 2) Centrifugar durante 10 minutos a 800-1000 g.
- 3) Colectar el plasma en otro tubo bajo flujo laminar, eliminar la capa intermedia que contiene los elementos nucleados de la sangre, dejando sólo los eritrocitos.
- 4) Lavar con centrífuga durante 5 minutos a 500 g, dos veces los GR con RPMI sin suero (para la preparación del RPMI ver más abajo), resuspendiendo los eritrocitos en volumen igual al plasma que se eliminó (un volumen de RPMI para cada volumen de GR).
- 5) Centrifugar durante 5 minutos a 800-1000 g y eliminar bajo flujo laminar el sobrenadante. Estos eritrocitos son utilizados en los cultivos y pueden ser almacenados por una semana a 4 °C.

### *Obtención de suero o plasma*

- 1) El plasma es obtenido a partir de sangre colectada con anticoagulante ACD. Para la obtención del suero se deja retraer el coágulo de sangre tomada sin anticoagulante. Luego centrifugar durante 15 minutos a 600 g.
- 2) Colectar el suero, centrifugar nuevamente para eliminar los GR aún presentes (bajo las mismas condiciones).
- 3) Esterilizar con filtros descartables tipo Millipore® de 0,22  $\mu\text{m}$ .
- 4) Descomplementar por 45 minutos a 56 °C, distribuir bajo flujo laminar en tubos de 50 ml y congelar a - 70 °C.

### *RPMI-1640 (Roswell Park Memorial Institute)*

Este medio se utiliza tanto para el lavado de los glóbulos rojos, como para el cultivo al que se debe añadir suero o plasma. Para la preparación, proceder de la manera siguiente.

- 1) En un Matraz Erlenmeyer de 1000 ml disolver el contenido del frasco (15,89 g) en 900 ml de agua bidestilada desionizada con la ayuda de un agitador magnético, luego añadir:
  - ◇ 60 mg de gentamicina o neomicina (40  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ); se puede también utilizar 100 UI/ml de penicilina con 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  de estreptomina (en los ensayos de actividad es recomendable no utilizar antibióticos);
  - ◇ 2,1 g de bicarbonato de sodio (25 mM).
- 2) Completar a un volumen final de 1 litro, ajustar el pH a 7,4, luego esterilizar con filtro de 0,22  $\mu\text{m}$  bajo flujo laminar.
- 3) Dividir en frascos estériles de 250 ml.
- 4) Anotar en cada frasco el número de lote del medio, la fecha de preparación y, si fuera necesario, otras especificaciones que ayuden a su correcta identificación (nombre del operador etc.).
- 5) Mantenerlo a 4 °C hasta su uso (se puede también congelar a - 20 °C por varios meses). Se aconseja no guardar más de cuatro semanas a 4 °C.
- 6) Antes de utilizar el RPMI, siempre se lo debe atemperar a 37 °C.

### *RPS (RPMI más suero)*

- 1) Añadir al medio de cultivo RPMI, en condiciones estériles, 10 o 20% de suero humano previamente esterilizado (de acuerdo al requerimiento del cultivo): 20% si es el inicio o si las células no se desarrollan bien; mientras que si los parásitos crecen sin dificultad alguna, es suficiente poner 10% de suero.
- 2) Anotar en cada frasco la cantidad de suero (RPS 10 o RPS 20), el número de lote del medio, la fecha de preparación y, si fuera necesario, otras especificaciones que ayuden a su correcta identificación (nombre del operador etc.).
- 3) Mantenerlo a 4 °C hasta su uso (se puede también congelar a - 20 °C por varios meses). Se aconseja no guardar más de cuatro semanas a 4 °C.
- 4) Antes de utilizar el RPS, siempre se lo debe atemperar a 37 °C.

## Descongelación de las cepas de *Plasmodium*

### *Fundamento del proceso de congelación-descongelación*

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 en 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, así eliminada 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). 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.

La eliminación de estas moléculas durante la descongelación es una etapa clave que se debe realizar por grados progresivos 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.

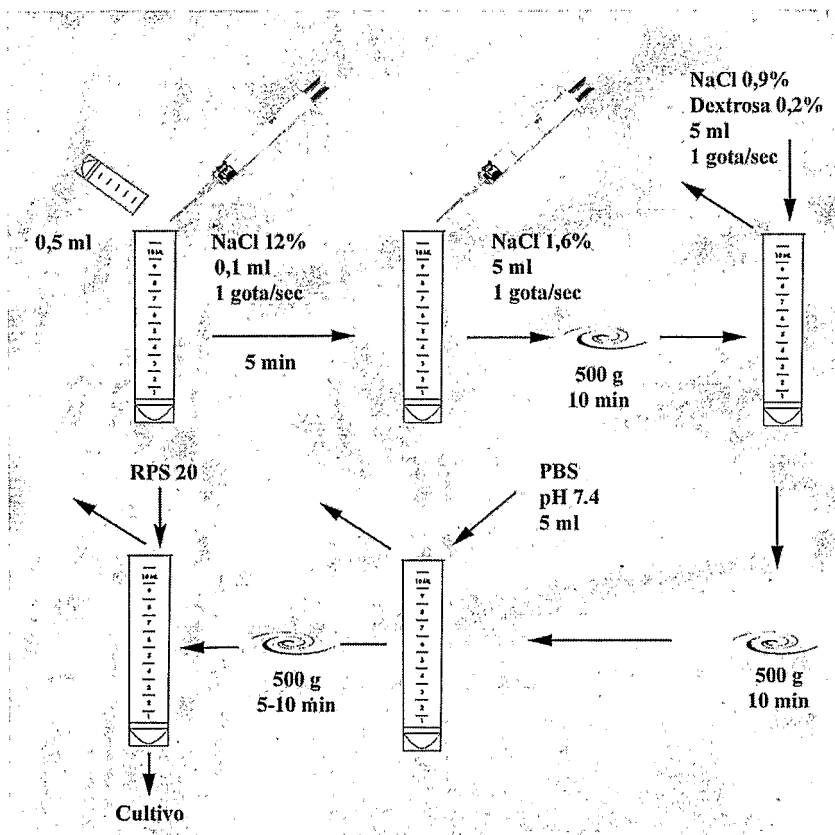
### *Técnica 1*

- 1) Sacar del nitrógeno líquido los tubos que contienen los GR infectados y descongelar en baño-maría a 37 °C, durante 1 minuto (anotar en el cuaderno de congelación). Precalentar a 37 °C todas las soluciones de descongelación. (Figura 4)
- 2) En un tubo estéril de 10 ml introducir bajo flujo laminar el contenido ya descongelado de los tubos (aproximadamente 0,5 ml) y añadir 0,1 ml de una solución estéril de NaCl al 12% (una gota por segundo, con una jeringa de 1 ml montada con una aguja de 25 G), agitando con suavidad y con mucho cuidado ya que esta etapa es fundamental.
- 3) Esperar 5 minutos y luego añadir 5 ml de una solución estéril de NaCl al 1,6% (una gota por segundo, aguja de 20 G) agitando con suavidad.
- 4) Centrifugar a 500 g durante 10 minutos, luego eliminar el sobrenadante pero sin dejar el sedimento seco.
- 5) Con una jeringa de 5 ml añadir al sedimento 5 ml de una solución estéril de NaCl al 0,9% con dextrosa al 0,2% (una gota por segundo, aguja de 20 G), agitando siempre con suavidad.
- 6) Centrifugar a 500 g durante 10 minutos, luego eliminar el sobrenadante, sin dejar el sedimento seco.
- 7) Finalmente añadir al sedimento 5 ml de PBS (pH 7,4) y centrifugar a 500 g durante 5-10 minutos. Luego eliminar el sobrenadante.

Los glóbulos rojos deben ser puestos en suspensión en RPS20 para el inicio del cultivo (ver el parágrafo "Adaptación al cultivo" en este mismo capítulo).

Siempre sobran glóbulos rojos infectados en el fondo del tubo: con una pipeta Pasteur sacar una gota y realizar un frotis y la preparación del colorante Giemsa en la Figura 11 y en las Tablas 5 y 6 del parágrafo "Método visual", Capítulo 2, Primera Parte).

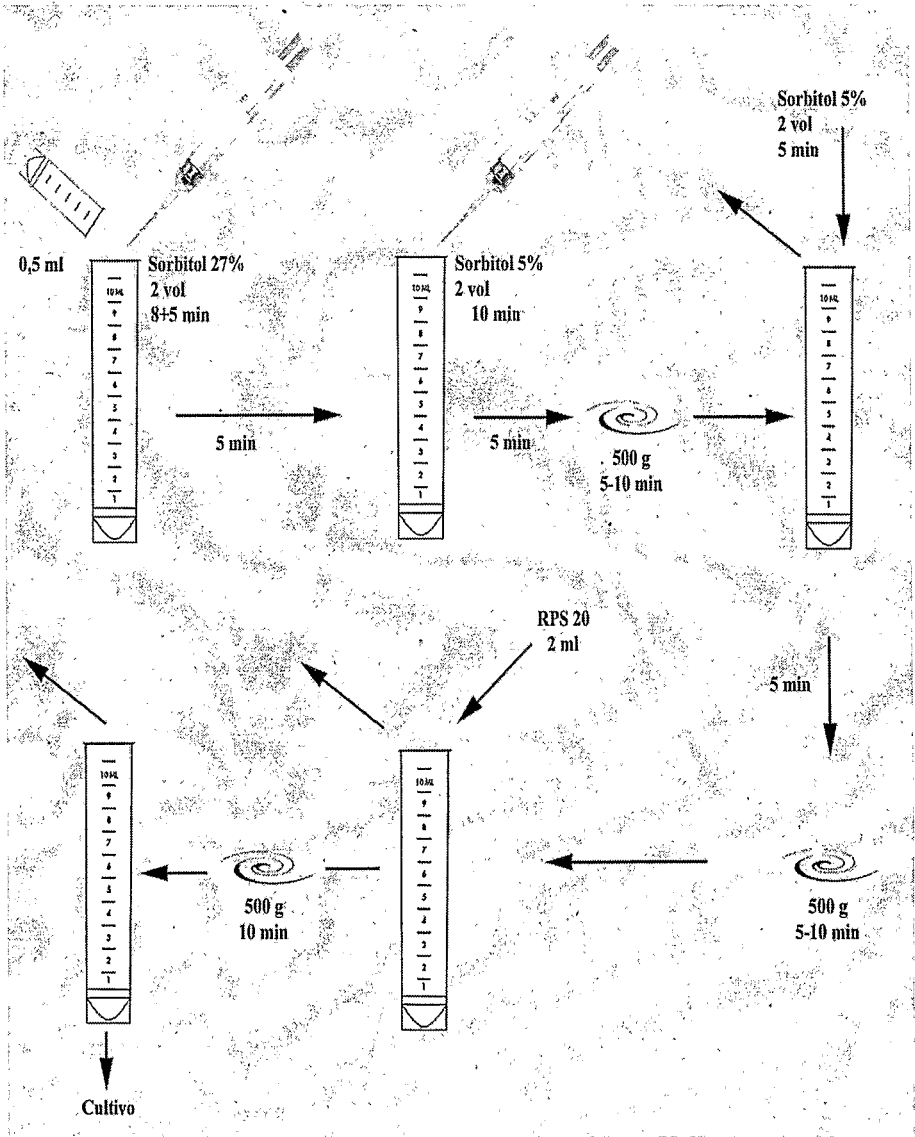
**Figura 4**  
*Técnica 1 de descongelación*



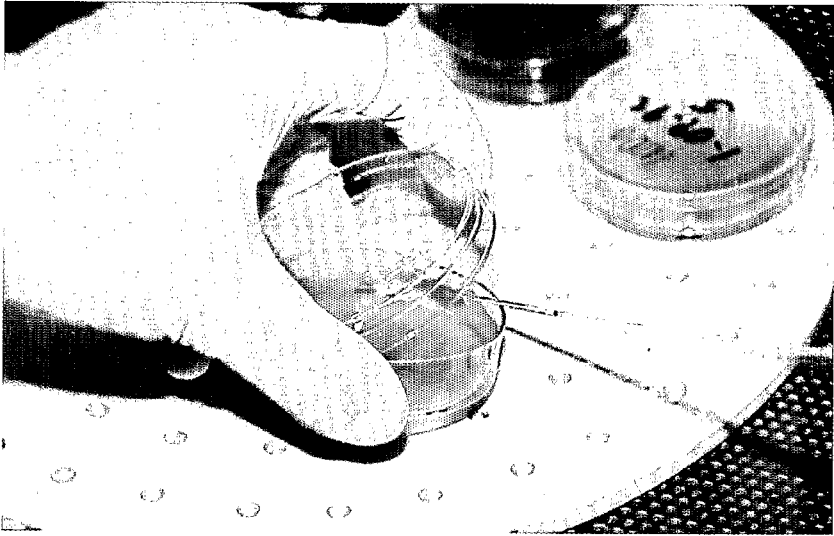
## *Técnica 2*

- 1) Preparar un tampón fosfato con:
  - 2,86 g de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$  (8 mM);
  - 0,31 g de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$  (2 mM);
  - en 1000 ml de agua bidestilada desionizada.
  - Ajustar el pH a 7,4.
- 2) Con este tampón, preparar soluciones de sorbitol al 27% y al 5%. Filtrar a 0,22  $\mu\text{m}$ . Conservar a 4 °C.
- 3) Sacar del nitrógeno líquido los tubos que contienen los GR infectados y descongelar en baño-maría a 37 °C, durante 1 minuto (anotar en el cuaderno de congelación).
- 4) Precalear a 37 °C todas las soluciones de descongelación.
- 5) Vaciar el contenido de los tubos (aproximadamente 0,5 ml) a otros de 10 ml estériles y añadir 2 volúmenes de una solución estéril de sorbitol al 27%, previamente calentada (se añade el primer volumen en 8 minutos y el segundo en 5 minutos), agitando con suavidad.
- 6) Esperar 5 minutos.
- 7) Añadir 2 volúmenes de sorbitol estéril al 5% en 10 minutos.
- 8) Esperar 5 minutos.
- 9) Centrifugar a 500 g durante 5-10 minutos, luego eliminar el sobrenadante.
- 10) Añadir de nuevo 2 volúmenes de sorbitol estéril al 5% en 5 minutos.
- 11) Esperar 5 minutos.
- 12) Centrifugar a 500 g durante 5-10 minutos, luego eliminar el sobrenadante.
- 13) Añadir 1 a 2 ml de medio de cultivo RPS20, luego centrifugar a 500 g durante 10 minutos.
- 14) Recuperar el sedimento para el cultivo. Siempre sobran GR infectados en el fondo del tubo: con una pipeta Pasteur sacar una gota por capilaridad y realizar un frotis (ver el parágrafo "Método visual", Capítulo 2, Primera Parte).

**Figura 5**  
*Técnica 2 de descongelación*



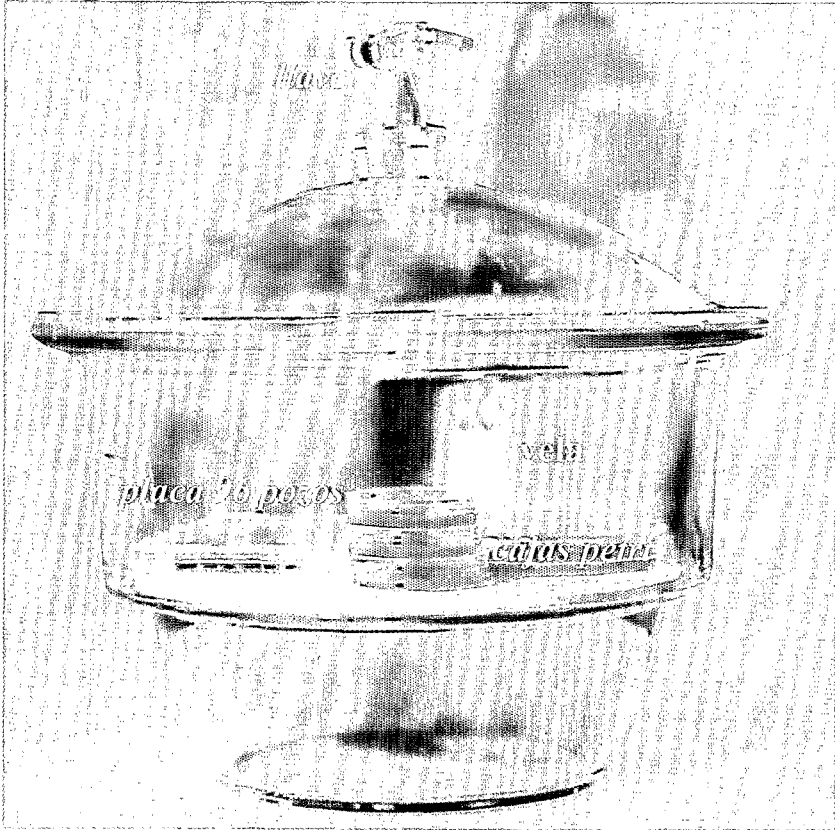
**Foto 1**  
*Caja Petri*



### Adaptación al cultivo

- 1) Luego de descongelar los parásitos, el sedimento se coloca en una caja Petri estéril (Foto 1) de 60 mm de diámetro y 15 mm de profundidad (o en un frasco de plástico con cuello inclinado).
- 2) Cada caja recibe 5 ml de una suspensión de eritrocitos (con un hematocrito del 5% y una parasitemia inicial del 0,5-1%) que figura a continuación:
  - 0,25 ml de eritrocitos parasitados y no parasitados (0,5-1% de parasitemia);
  - 4,5 ml de RPMI;
  - 0,5 ml de suero o plasma (para iniciar el cultivo es preferible utilizar RPS20, o sea añadir 1 ml de suero).
- 3) Se coloca la caja Petri o el frasco con cuello inclinado en una incubadora a una temperatura constante de 37 °C, dentro de un Candle Jarr (Foto 2) - es decir un recipiente cerrado de vidrio con una llave de paso en la tapa y con una candela encendida en su interior, de tal modo que permita la salida del oxígeno y la saturación al interior del anhídrido carbónico.
- 4) Cerrar con la llave de paso cuando se apague la vela.
- 5) Si se utiliza el frasco, es necesario no cerrar por completo la tapa.

Foto 2  
Candle Jarr



- 6) Si se tiene acceso a la mezcla gaseosa (3% de  $O_2$ , 4% de  $CO_2$  y 93% de  $N_2$  o 10% de  $O_2$ , 5% de  $CO_2$  y 85% de  $N_2$ ), se puede llenar el frasco con esta combinación durante 10 segundos y cerrar el frasco herméticamente antes de colocarlo en la estufa a  $37^\circ C$ . Asimismo, es posible cultivar en una estufa a  $37^\circ C$  con 5% de  $CO_2$  y atmósfera (aire normal) húmeda en frascos de cultivo celular con cuello inclinado; en este caso no se debe cerrar totalmente el frasco. Es igualmente posible utilizar la mezcla de gas del comercio para gasificar los frascos durante 1 minuto y luego se debe cerrar el frasco por completo.
- 7) Diariamente es preciso cambiar el medio de cultivo por otro fresco (y colocar gas, si se utiliza la mezcla de gas). El cambio de medio es necesario por la producción de ácido láctico de parte del parásito, dando lugar a una disminución del pH del



medio de cultivo. Con la adición de 50 mg/l de hipoxantina al medio RPMI 1640 el cambio de medio puede realizarse excepcionalmente cada 72 horas (para no volver al laboratorio el fin de semana...). En este caso es recomendable diluir la parasitemia con glóbulos rojos y aumentar el volumen del medio.

- 8) Cada 24-48 horas se realiza el control de la parasitemia: sacar las cajas de la incubadora cuidadosamente para no resuspender los eritrocitos que se encuentran en una delgada capa asentada, y dejar sin mover por 15 minutos. Luego eliminar la fase superior de la caja con ayuda de una pipeta Pasteur, con el Pipetus®, inclinando la caja (o el frasco).
- 9) Con un pequeño volumen del sedimento de glóbulos rojos realizar un frotis, directamente, o luego de centrifugar 0,1 ml de eritrocitos en un tubo Eppendorf® (ver el parágrafo "Método visual", Capítulo 2, Primera Parte).
- 10) Añadir un volumen igual al que se eliminó del medio RPMI con 10-15% de suero o plasma descomplementado.

Si la parasitemia es superior al 2%, disminuirla mediante la adición de glóbulos rojos no parasitados (Tabla 2) y volver a colocar GR frescos en la misma cantidad.

**Tabla 2**  
Tabla de dilución

% de parasitemia.....	8 .....	6 .....	4 .....	2
Cantidad de GR a botar.....	3/4 .....	2/3 .....	1/2 .....	0

Las contaminaciones por bacterias y hongos ocurren frecuentemente en los cultivos. Para solucionar este problema se puede hacer lo siguiente.

- 1) Eliminar los cultivos contaminados, limpiar y desinfectar el lugar de trabajo antes de volver a empezar con un cultivo congelado.
- 2) En caso de *contaminación por hongos*, tratar el cultivo con nistatina hasta 60 µg/ml por 96 horas (el cultivo puede recibir 6 µg/ml durante varias semanas).
- 3) En caso de *contaminación bacteriana*, lavar el cultivo con RPMI para eliminar la gentamicina, si ha sido utilizada. Luego, el cultivo recibe de 3 a 10 mg% de cloramfenicol durante cuatro horas. El tratamiento puede ser repetido una vez y el cultivo debe ser lavado con RPMI antes de su uso. Es preferible tratar un cultivo que contiene estadios jóvenes, menos sensibles al cloramfenicol que los demás estadios.

### Referencias

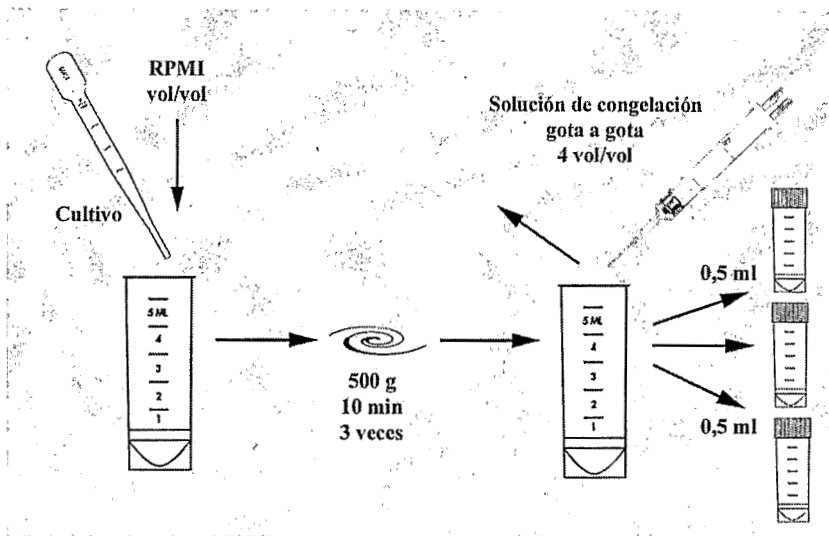
- Trager, W. and Jensen, J.B. (1976) Human malaria parasites in continuous culture. *Nature*, 263, 5580, 767-769.
- Waki, S., Miyagami, T., Nakazawa, S., Igarashi, I. and Suzuki, M. (1984) Maintenance and propagation of human malaria parasites in culture using an ordinary CO<sub>2</sub> incubator. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 78, 3, 418.
- Yayon, A., Friedman, S. and Ginsburg, H. (1984) *Plasmodium falciparum*: elimination of fungal and bacterial contamination from *in vitro* culture. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, 78, 2, 167-168.

## Congelación de las cepas de *Plasmodium*

### Técnica 1

- 1) Recuperar 1 ml de sangre infectada con parásitos en el estadio "anillo" (ver el parágrafo "Definición de los estadios eritrocitarios", Capítulo 4, Segunda Parte) y una parasitemia superior al 4%.
- 2) Lavar estérilmente con el mismo volumen de RPMI, en la centrífuga durante 10 minutos a 500 g, 3 veces.
- 3) Recuperar el sedimento.
- 4) Utilizar la siguiente solución estéril de congelación:  
28 ml de glicerol;  
3,024 g de sorbitol;  
0,65 g de cloruro de sodio;  
72 ml de agua bidestilada desionizada.
- 5) Añadir, gota a gota y agitando con suavidad, 4 volúmenes de la solución crioprotectora estéril a 1 volumen del sedimento obtenido.
- 6) Distribuir 0,5 ml de este producto homogeneizado a criotubos y congelarlos inmediatamente a - 70 °C por 24 horas.
- 7) Guardar los tubos, identificados y fechados, en nitrógeno líquido (anotar en el cuaderno de congelación).

**Figura 6**  
*Técnica 1 de congelación*



## Técnica 2

- 1) Centrifugar los cultivos durante 5 minutos a 500 g.
- 2) Lavar estérilmente 2 veces con RPMI a temperatura ambiente.
- 3) Utilizar la siguiente solución estéril de congelación:

285,48 g (6,2 M) de glicerol;  
7,84 g (0,14 M) de lactato de sodio;  
0,186 g (0,005 M) de KCl;  
50 ml de agua bidestilada desionizada.

- 4) Ajustar el pH a 7,4 con NaOH.
- 5) Añadir H<sub>2</sub>O, hasta alcanzar 500 ml.
- 6) Filtrar a 0,22  $\mu$ m.
- 7) Añadir gota a gota 1 volumen del crioprotector precalentado correspondiente a 0,4 volumen del sedimento.
- 8) Esperar 5 minutos.
- 9) Añadir gota a gota 1 volumen del crioprotector correspondiente a 1,2 volumen del sedimento.
- 10) Esperar 5 minutos.
- 11) Añadir gota a gota 1 volumen del crioprotector correspondiente a 2,4 volumen del sedimento.
- 12) Distribuir en criotubos (0,5 ml/tubo).
- 13) Congelarlos a - 70 °C por 24 horas.
- 14) Guardar los tubos, identificados y fechados, en nitrógeno líquido (anotar en el cuaderno de congelación).

## Referencias

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.

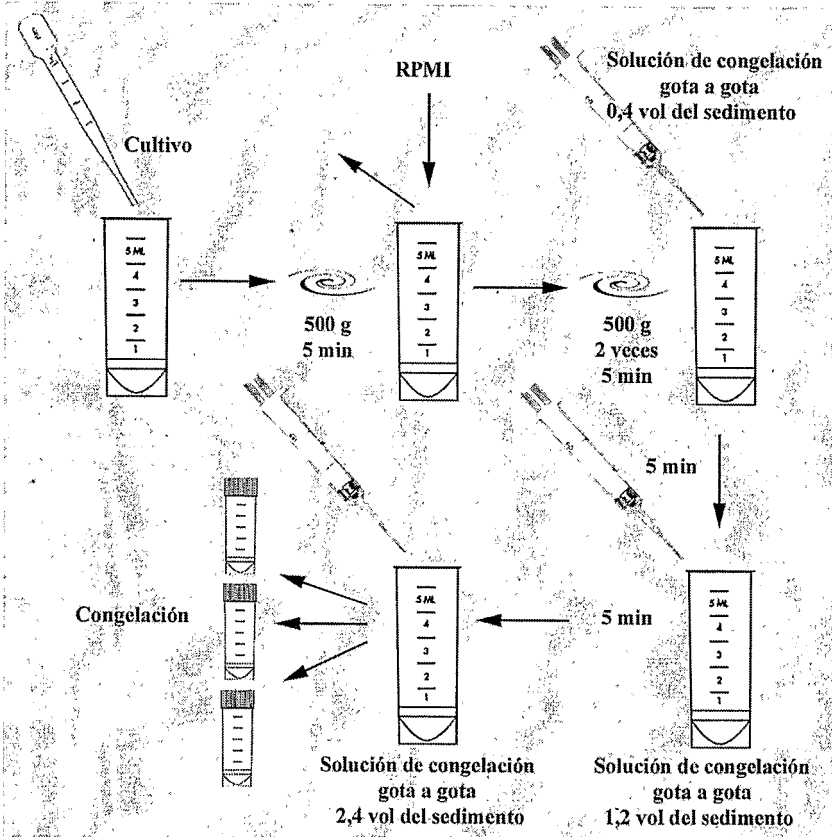
Diggs, C.L., Aikawa, M. and Haynes, J.D. (1977) Ultrastructure and viability of cryopreserved *Plasmodium falciparum*. *Bulletin of the World Health Organization*, 55, 2-3, 299-304.

McColm, A.A. and Latter, V.S. (1986) Comparison of fast (one-step) and interrupted slow cooling methods using a range of intracellular and extracellular cryoprotectants for the freeze-preservation of *Plasmodium yoelii*-infected mouse erythrocytes. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 80, 1, 29-33.

Mutetwa, S.M. and James, E.R. (1985) Low temperature preservation of *Plasmodium* spp. [Trends and Perspectives]. *Parasitology*, 90, 3, 589-603.

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

Figura 7  
Técnica 2 de congelación



### Sincronización

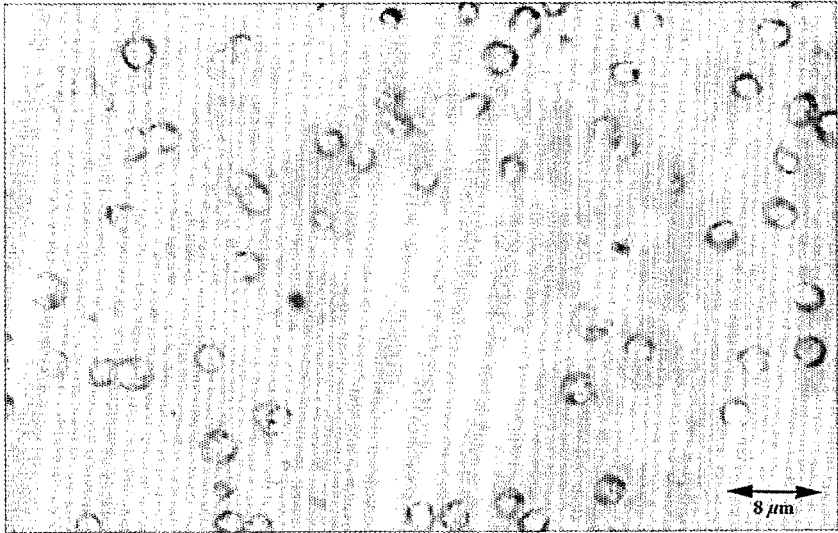
#### Concentración de estadios maduros por flotación

#### FUNDAMENTO

Los glóbulos parasitados por formas maduras de *Plasmodium* (Foto 3) son menos densos que los glóbulos sanos o infectados por estadios anillos. Este fenómeno permite la separación, por simple decantación, en medios como la gelatina o también con solución de Percoll® (polivinilo pirolidone) en la centrífuga. Con estos métodos se consigue concentrar 70-90% de glóbulos rojos parasitados con formas maduras.

### Foto 3

*Formas maduras intraeritrocitarias de Plasmodium falciparum*



### MATERIAL

#### Reactivos químicos

- ◇ Gelatina Sigma o Plasmagel Roger Bellon.
- ◇ Percoll®.
- ◇ Tampón fosfato concentrado 10X:
  - 1 g de KCl
  - 1 g de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$
  - 40 g de NaCl
  - 14,3 g de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$
  - 0,5 g de  $\text{MgCl}_2 (6 \text{ H}_2\text{O})$ , o 0,250 g de  $\text{MgCl}_2$  anhidro
  - 500 ml de agua bidestilada desionizada.

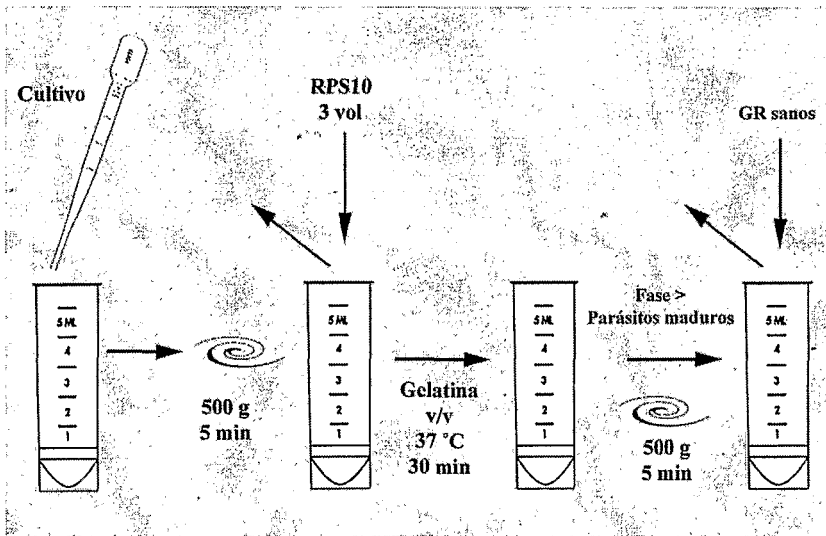
### METODO

#### Preparación de la gelatina

- 1) Centrifugar el cultivo (con predominancia del estadio maduro) 5 minutos a 500 g.
- 2) Eliminar el sobrenadante.
- 3) Añadir a 1 volumen de sedimento 3 volúmenes de RPS 10.
- 4) A este volumen total (1 + 3), añadir 1 volumen igual de gelatina o plasmagel al 3% en solución fisiológica previamente calentada a 37 °C.
- 5) Incubar por 30 minutos a 37 °C en un tubo posicionado perfectamente vertical.

- 6) Recuperar la fase superior que contiene los parásitos maduros.
- 7) Centrifugar esta fase durante 5 minutos a 500 g.
- 8) Realizar un frotis para cuantificar la parasitemia (Figura 11).
- 9) Llevar a cultivo los parásitos sincronizados, agregar glóbulos rojos lavados no parasitados hasta tener un hematocrito del 5% y una parasitemia del 1% para permitir la reinvasión por los merozoítos resultantes de la ruptura de los eritrocitos.

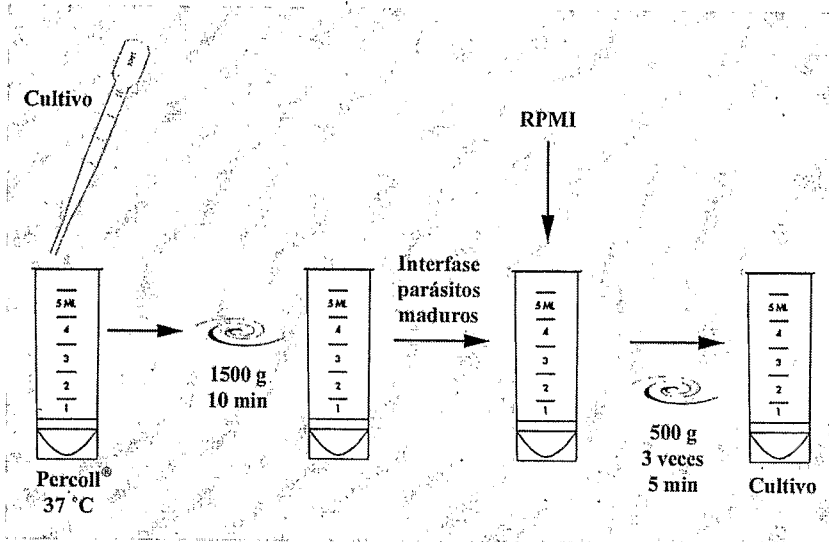
**Figura 8**  
*Sincronización con gelatina*



#### Preparación del Percoll®

- 1) Mezclar 1 volumen de tampón fosfato 10X concentrado con 9 volúmenes de solución de Percoll®.
- 2) Esta solución al 90% se diluye al 65% (para concentrar los esquizontes; la densidad de Percoll® es 1,081 g/cm<sup>3</sup>) o 75% (para incluir los trofozoítos menos maduros con densidad de 1,091 g/cm<sup>3</sup>).
- 3) El cultivo, que contiene 1,5 x 10<sup>9</sup> GR/ml (con una presencia de 5 a 10% de formas maduras), se coloca directamente sobre 3 ml de solución de Percoll® previamente calentada a 37 °C.
- 4) Centrifugar durante 10 minutos a 1500 g; los parásitos maduros se encuentran en la interfase.
- 5) Recoger esta fase y lavar con RPMI (durante 5 minutos a 500 g, 3 veces en la centrifuga) antes de volverla a cultivar.

**Figura 9**  
Sincronización con Percoll®



## Referencias

### Gelatina

Jensen, J.B. (1978) Concentration from continuous culture of erythrocytes infected with trophozoites and schizonts of *Plasmodium falciparum*. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, 27, 6, 1274-1276.

Pasvol, G., Wilson, R.J.M., Smalley, M.E. and Brown, J. (1978) Separation of viable schizont-infected red cells of *Plasmodium falciparum* from human blood. Annals of Tropical Medicine and Parasitology, 72, 1, 87-88.

Reese, R.T., Langreth, S.G. and Trager, W. (1979) Isolation of stages of the human parasite *Plasmodium falciparum* from culture and from animal blood. Bulletin of the World Health Organization, 1979, 57, 53-61.

### Percoll®

Dluzewski, A.R., Ling, I.T., Rangachari, K., Bates, P.A. and Wilson, R.J.M. (1984) A simple method for isolating viable mature parasites of *Plasmodium falciparum* from cultures. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene, 78, 5, 622-624.

## Concentración de formas jóvenes

### FUNDAMENTO

La multiplicación del parásito en el interior del glóbulo rojo requiere un metabolismo intenso que tiene lugar en la célula huésped con una actividad metabólica propia extremadamente reducida. Por lo tanto, el parásito debe permeabilizar la membrana eritrocitaria para aumentar el tráfico transcelular de substratos y catabolitos. Por ejemplo, ni hematíes ni *Plasmodium* tienen reservas de carbohidratos; en consecuencia, las dos células son dependientes de un aporte externo continuo.

En el caso de *P. berghei*, el consumo de glucosa por un glóbulo infectado es casi 30 veces superior al consumo de un glóbulo sano. La gran permeabilidad a los hexitolos de los eritrocitos infectados por *P. falciparum* se utiliza para lisar de manera selectiva los glóbulos rojos infectados por parásitos maduros, puesto que la permeabilidad se incrementa con el envejecimiento de los parásitos. Los parásitos maduros concentran los hexitolos llegando a una lisis.

Con el método siguiente se trabaja con cultivo de parásitos con predominancia de estadios jóvenes. Se obtienen parásitos de 0-20 horas de edad. Si se repite el proceso siguiente 30 horas después, se obtiene una población parasitaria de 0-6 horas de edad.

Si se trabaja a partir de un cultivo asincrónico, es recomendable concentrar, con la técnica con gelatina, a los parásitos maduros 24 horas después del tratamiento con sorbitol (ver Figura 8). 6 horas más tarde, se trata de nuevo el cultivo con sorbitol para la obtención de formas anillo de 0-6 horas.

### MATERIAL

Reactivos químicos
--------------------

- ◇ D-sorbitol.
- ◇ PBS pH 7,4 (ver la preparación en el parágrafo "Sincronización con la técnica del Percoll®-glucosa", Capítulo 4, Segunda Parte).

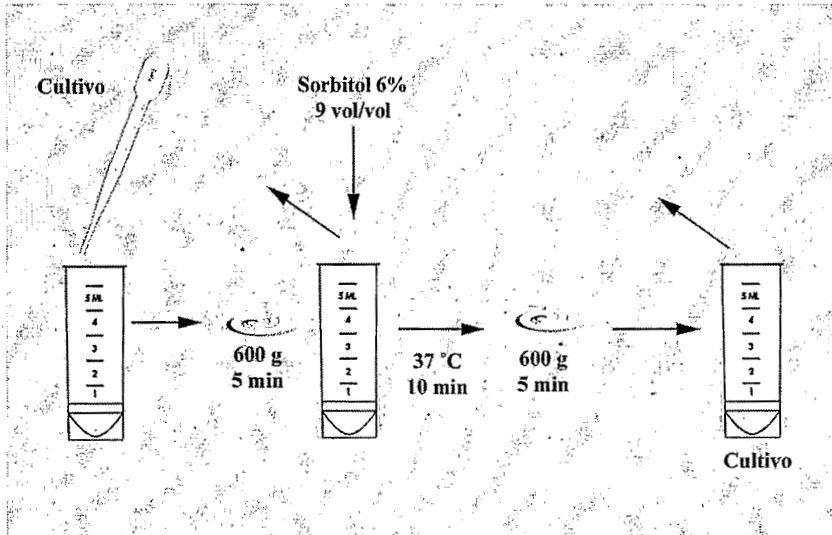
### METODO

- 1) Preparar una solución de D-sorbitol al 6% (6 g en 100 ml de PBS pH 7,4, filtrar a 0,22  $\mu$ m, conservar a 4 °C).
- 2) Calentar a 37 °C.
- 3) Centrifugar el cultivo de parásitos (con predominancia del estadio joven) a 600 g durante 5 minutos.



- 4) Eliminar el sobrenadante.
- 5) A una parte del sedimento, añadirle 9 partes de sorbitol al 6%.
- 6) Dejar a 37 °C por 10 minutos.
- 7) Centrifugar a 600 g durante 5 minutos.
- 8) Colocar el sedimento en cultivo.
- 9) Se puede también utilizar D-sorbitol 5% (p/v) en agua destilada o alanina (300 mM) en vez de sorbitol 6% en PBS pH 7,4.

**Figura 10**  
Concentración de formas jóvenes



### Referencias

Lambros, C. and Vanderberg, J.P. (1979) Synchronization of *Plasmodium falciparum* erythrocytic stages in culture. *Journal of Parasitology*, 65, 3, 418-20.

## Capítulo 2

### EVALUACION DE LA ACTIVIDAD ANTIMALARICA *IN VITRO* DE PRODUCTOS NATURALES O DE SINTESIS

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

- 1) la capacidad de obtener una información confiable con cantidades pequeñas (microgramos) de material;
- 2) la medición de la actividad intrínseca antimalárica donde no intervienen factores de hospedador;
- 3) la mayor precisión de la medición que generalmente no es posible con sistemas de test *in vivo*;
- 4) la evaluación de un mayor número de compuestos en un experimento, comparado con el método *in vivo*;
- 5) 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*.

Algunas limitaciones de los métodos *in vitro*:

- 1) 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;
- 2) el curso artificial de la droga expuesta a una concentración constante por un período determinado;

- 3) la incapacidad para distinguir, selectivamente, la seguridad y la toxicidad de los compuestos con respecto a la tolerancia del huésped;
- 4) los problemas de ciertas propiedades físico-químicas, como por ejemplo la solubilidad acuosa y la adherencia al vidrio o plástico;
- 5) la necesidad de conseguir sangre humana previamente evaluada (HIV, hepatitis, Chagas etc.).

## METODOS GENERALES

### *Micrométodo radioisotópico*

#### FUNDAMENTO

*Plasmodium* es incapaz de sintetizar *ex novo* las bases purinas (hipoxantina, adenina y guanina), pero sí las pirimidinas (uracilo, timina y citosina). Por lo tanto, extrae las purinas exógenas para la síntesis de sus nucleótidos púricos. La hipoxantina es la base utilizada principalmente por el parásito para la síntesis de sus nucleótidos adenosina y guanosina. Si se introduce en el medio de cultivo hipoxantina marcada, los parásitos la incorporarán en sus ácidos nucleicos. Con un contador beta se puede detectar el nivel de radioactividad, que es proporcional a la parasitemia. La incorporación de la hipoxantina es mayor en los trofozoitos y esquizontes que en los estadios anillos. El ruido de fondo de los glóbulos rojos sanos es débil puesto que no sintetizan ADN ni ARN.

#### MATERIAL

##### Material de plástico, vidrio y otros

- ◇ Todo el material para el cultivo de *P. falciparum* (ver Primera Parte, Capítulo 1: "Cultivo de estadios intraeritrocitarios de *Plasmodium falciparum*").
- ◇ Bolsa de plástico para desechar los materiales contaminados.
- ◇ Filtros de fibra de vidrio tipo Skatron®.
- ◇ Tubos de hemólisis de vidrio de 5 ml.
- ◇ Viales de centelleo de poliestireno de 4 ml.

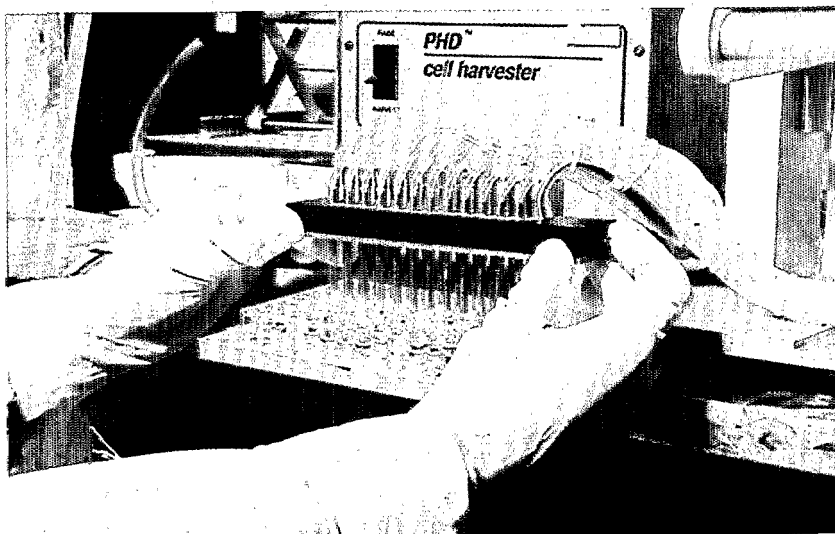
##### Reactivos químicos

- ◇ Dimetilsulfóxido.
- ◇ Etanol absoluto.
- ◇ Hipoxantina tritiada (37 MBq, 1 mCi).
- ◇ Líquido de centelleo tipo ScintiVerse®.

## Equipo

- ◇ Contador beta.
- ◇ Colector de células tipo PHD *Cell harvester*<sup>®</sup> (Foto 4).

Foto 4  
Colector de células



## METODO

### Preparación de la hipoxantina marcada

- 1) Disolviendo el contenido del frasco (37 MBq, 1 mCi) en 1 ml de agua bidestilada desionizada estéril, se obtiene una solución de hipoxantina marcada al 1 mCi/ml (1  $\mu\text{Ci}/\mu\text{l}$ ).
- 2) Anotar en el tubo la fecha de preparación y la concentración.
- 3) Guardar en el congelador a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ .
- 4) Anotar en el cuaderno de congelación la fecha así como el número de cuaderno de congelación.
- 5) Para una placa (72 pozos) preparar la solución siguiente:
  - 3,6 ml de RPMI
  - 0,4 ml de suero
  - 40  $\mu\text{l}$  de hipoxantina
  - (50  $\mu\text{l}$  de esta solución/pozo = 0,05  $\mu\text{Ci}/\text{pozo}$ )

### Preparación de las drogas (extractos crudos)

- 1) La solución madre se prepara disolviendo 2 mg de extracto en 200  $\mu$ l de etanol absoluto o DMSO o tween 80 en un tubo de 5 ml. Si la droga no tiene una buena disolución, llevar a ultrasonido algunos minutos para facilitar la disolución. Esta solución tiene una concentración de 10 mg/ml.
- 2) Luego se preparan diluciones seriales:

<i>Código</i>	<i>Diluciones</i>	=	
(a)	200 $\mu$ g/ml	=	1,96 ml de RPMI + 40 $\mu$ l de solución madre;
(b)	20 $\mu$ g/ml	=	1,8 ml de RPMI + 200 $\mu$ l de solución a;
(c)	2 $\mu$ g/ml	=	1,8 ml de RPMI + 200 $\mu$ l de solución b;
(d)	0,2 $\mu$ g/ml	=	1,8 ml de RPMI + 200 $\mu$ l de solución c.

- 3) Como se introducen 100  $\mu$ l de estas soluciones en los alvéolos con 100  $\mu$ l de suspensión globular (ver más abajo), la concentración final será de 100  $\mu$ g/ml, 10, 1 y 0,1  $\mu$ g/ml.
- 4) Los controles se preparan de la manera siguiente:

T1:	2 ml de RPMI;
T2:	4 ml de RPMI + 12 $\mu$ l de solvente (etanol absoluto, DMSO o tween);
RF (Ruido de Fondo):	0,6 ml RPMI + 70 $\mu$ l suero humano + 7 $\mu$ l de glóbulos rojos sanos.

### Preparación de la placa

- 1) Llenar los alvéolos de los bordes superiores e inferiores con 200  $\mu$ l de agua bidestilada desionizada, para mantener una humedad suficiente y descartar el "efecto borde" (es decir la posible perturbación del crecimiento parasitario debido a la proximidad del borde de la placa).
- 2) Como se utilizan solamente 72 pozos para el estudio, preparar una suspensión globular para 80 pozos (para compensar las pérdidas):

6,4 ml de RPMI;  
1,3 ml de suero (se obtendrá un RPS20%);  
320  $\mu$ l de sedimento globular sincronizado en el estadio anillo con una parasitemia al 2%.

- 3) Se obtiene así un hematocrito al 4% que será diluido a la mitad con la adición de la solución de droga.
- 4) Distribuir 100  $\mu$ l de esta suspensión por cada alvéolo y posteriormente añadir 100  $\mu$ l de concentraciones crecientes de las drogas, lo que resultará en un volumen final de 200  $\mu$ l.
- 5) Incubar en estufa a 37 °C de acuerdo al método Candle Jarr.

En la Tabla 3 se muestra la disposición de 4 drogas a 4 concentraciones crecientes en una placa de 96 alvéolos.

**Tabla 3**  
*Disposición de 4 drogas a 4 concentraciones crecientes*

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
<b>A</b>	///	///	///	///	///	///	///	///	///	///	///	///
<b>B</b>	a1	a1	a1	b1	b1	b1	c1	c1	c1	d1	d1	d1
<b>C</b>	T1	T1	T1	a2	a2	a2	b2	b2	b2	c2	c2	c2
<b>D</b>	d2	d2	d2	T1	T1	T1	a3	a3	a3	b3	b3	b3
<b>E</b>	c3	c3	c3	d3	d3	d3	a4	a4	a4	b4	b4	b4
<b>F</b>	c4	c4	c4	d4	d4	d4	T2	T2	T2	a5	a5	a5
<b>G</b>	b5	b5	b5	c5	c5	c5	d5	d5	d5	RF	RF	RF
<b>H</b>	///	///	///	///	///	///	///	///	///	///	///	///

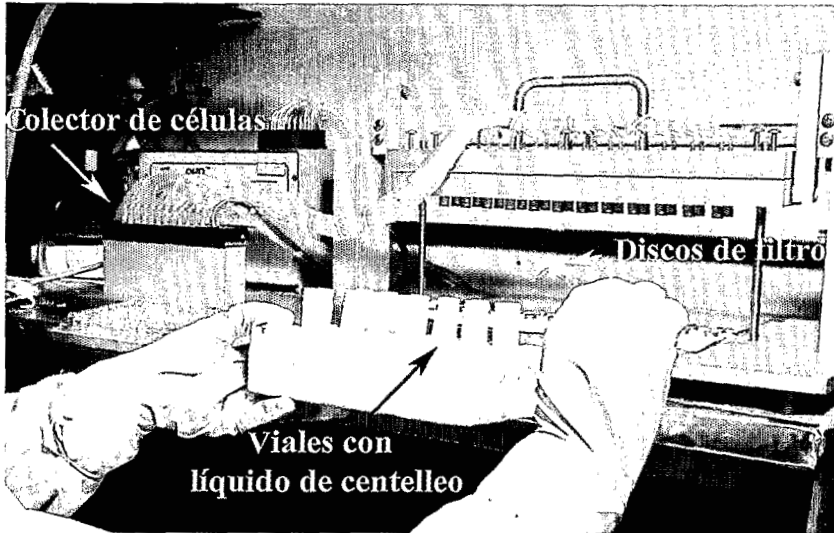
- /// = Borde (200  $\mu$ l de agua estéril);  
T1 = Testigo (RPMI);  
T2 = Testigo (RPMI con el solvente sin la droga);  
a1, 2 = Concentración superior de la droga 1, 2...;  
d1, 2 = Concentración inferior de la droga 1, 2...;  
RF = Ruido de Fondo (medio de cultivo con GR no parasitados).

#### Incorporación de hipoxantina tritiada

- 1) Luego de 18 horas de incubación, añadir a cada alvéolo 1 volumen de 50  $\mu$ l de solución de hipoxantina en RPS10 conteniendo 0,05  $\mu$ Ci. Agitar suavemente la placa y dejar incubar 24 horas más a 37 °C.
- 2) Finalmente, poner las placas en el congelador a - 70 °C para provocar hemólisis de los eritrocitos.
- 3) Descongelar y colectar las células con un colector semiautomático, depositando los ácidos nucleicos de cada alvéolo sobre discos de filtro de fibra de vidrio, lisando completamente las células con abundante agua destilada.
- 4) Posteriormente, secar los discos durante 2 horas a 60 °C y colocarlos en viales con 2 ml de líquido de centelleo (Foto 5).
- 5) Esperar una hora y determinar la radioactividad de cada vial en un contador beta.

La lectura se expresa en golpes por minuto.

Foto 5  
Colección de filtros radiomarcados



Comparación 24/72 horas

Con la finalidad de diferenciar si las drogas tienen un efecto sobre la maduración del parásito o sobre la reinvasión de los eritrocitos, el tiempo de contacto de las drogas con los parásitos es de 24 o 72 horas. El contacto de 24 horas nos permitirá medir el efecto de las drogas sobre la maduración, el de 72 horas determinará la existencia eventual de un efecto mensurable sobre las etapas esenciales de la reinvasión.

**ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS**

Para determinar la  $CI_{50}$  (concentración que inhibe el 50% de incorporación de hipoxantina) ver el párrafo "Determinación de la  $CI_{50}$ " en este mismo capítulo.

Calcular el porcentaje de inhibición de la incorporación de la hipoxantina de acuerdo a la fórmula indicada en la Tabla 4.

**Tabla 4**  
*Fórmula para el cálculo*  
*del porcentaje de inhibición de la incorporación de la hipoxantina*

$$\% \text{ Inhibición} = 100 - \left( \frac{\text{P} - \text{RF}}{\text{T} - \text{RF}} \times 100 \right)$$

- P = Promedio de g.p.m. (golpes por minutos) de cada concentración en triplicado;  
 RF = Ruido de fondo (cultivo de glóbulos rojos no parasitados);  
 T = Testigo (cultivo de glóbulos rojos parasitados sin la droga).

### Referencias

- Bravo, J.A., Sauvain, M., Gimenez, A., Muñoz, V., Callapa, J., Le Men-Olivier, L., Massiot, G. and Lavaud, C. (1999) Bioactive phenolic glycosides from *Amburana cearensis*. *Phytochemistry*, 50, 71-74.
- D'Ambrosio, M., Guerriero, A., Deharo, E., Debitus, C., Muñoz, V. and Pietra, F. (1998) New types of potentially antimalarial agents: Epidioxy-substituted norditerpene and norsesterpenes from the marine sponge *Diacarnus levii*. *Helvetica Chimica Acta*, 81, 1285-1292.
- Desjardins, R.E., Canfield, C.J., Haynes, J.D. and Chulay, J.D. (1979) Quantitative assessment of antimalarial activity *in vitro* by a semiautomated microdilution technique. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 16, 6, 710-718.
- Le Bras, J. and Deloron, P. (1983) *In vitro* study of drug sensitivity of *Plasmodium falciparum*: evaluation of a new semi-micro test. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 32, 3, 447-451.
- Muñoz, V., Sauvain, M., Mollinedo, P., Callapa, J., Rojas, I., Gimenez, A., Valentin, A. and Mallié, M. (1999) Antimalarial activity and cytotoxicity of (-) roemrefidine isolated from the stem bark of *Sparattanthelium amazonum*. *Planta Medica*, 65, 1-2.



## Método visual

### FUNDAMENTO

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. 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. Para tener una buena reproductividad en las tinciones es recomendable:

- 1) utilizar material de vidrio limpio sin trazas de colorante precedente (acelera la precipitación del colorante);
- 2) poner el colorante poco a poco en el agua, moviéndolo suavemente para mezclar. Un movimiento brusco puede producir la precipitación;
- 3) preparar la solución de manera extemporánea;
- 4) 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.

### MATERIAL

#### Material de plástico, vidrio y otros

- ◊ Todo el material para el cultivo de *P. falciparum* (ver Primera Parte, Capítulo 1: "Cultivo de estadios intraeritrocitarios de *Plasmodium falciparum*").

#### Reactivos químicos

- ◊ Colorante Giemsa (preparado como se indica en las Tablas 5 y 6);
- ◊ Tampón fosfato (preparado como se indica en las Tablas 5 y 6).

**Tabla 5**  
*Preparación del colorante Giemsa*

<b>Solución madre a diluir al 10% en el tampón fosfato</b>	
Polvo Giemsa.....	0,76 g
Glicerina.....	50 ml
<i>Calentar a 60 °C hasta solubilización completa</i>	
Metanol.....	50 ml
<i>Dejar en la oscuridad por 5 días, luego filtrar</i>	
<i>Mezclar 5 ml del filtrado con 45 ml de la solución de tampón fosfato</i>	

**Tabla 6**  
*Preparación de la solución tampón fosfato*

<b>Solución de tampón fosfato</b>	
$\text{KH}_2\text{PO}_4$ .....	0,2 g
$\text{Na}_2\text{HPO}_4$ (2 $\text{H}_2\text{O}$ ).....	0,5 g
$\text{H}_2\text{O}$ destilada .....	1 l
<i>Ajustar el pH a 7,4</i>	

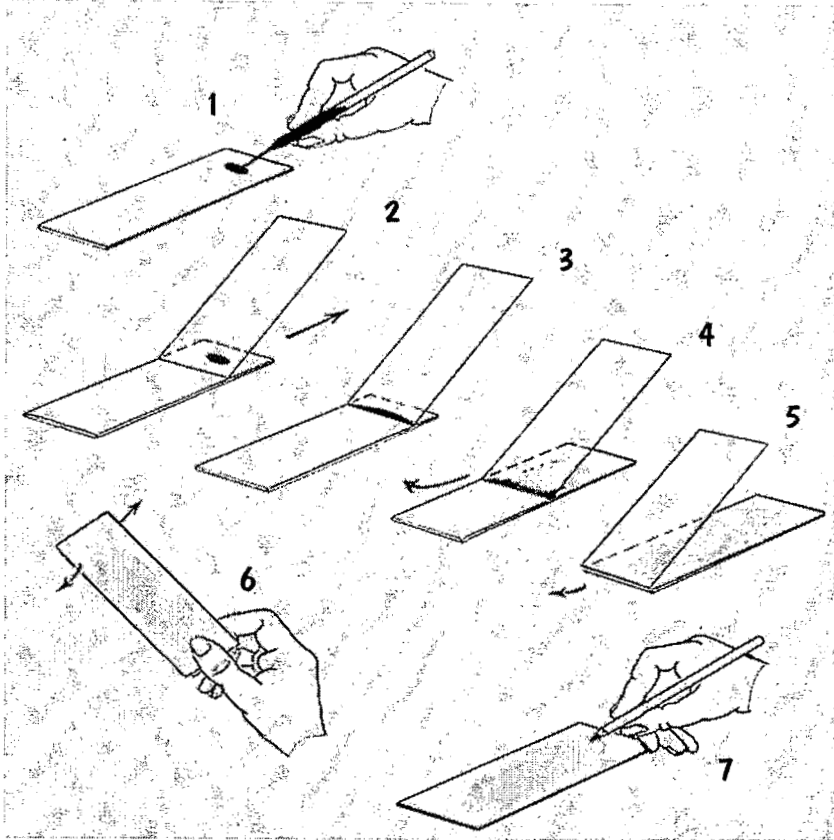
Si el agua tiene un pH de 5-6 se la neutraliza con una solución acuosa de carbonato de sodio al 1% en presencia de rojo neutro (solución al 1%), hasta que cambie el color al amarillo-anaranjado persistente.

Es importante conocer la concentración del colorante en la solución metanólica comercial (generalmente la solución comercial contiene 1% de colorante y se hacen diluciones al 10%).

### METODO

- 1) Seguir la misma metodología indicada en el parágrafo "Micrométodo radioisotópico" de este mismo capítulo, sin añadir la hipoxantina.
- 2) Luego de 48 horas de incubación, eliminar completamente la fase superior del cultivo.
- 3) Realizar frotis de cada alvéolo (Figura 11).
- 4) Fijar rápidamente el frotis con metanol (1 min).
- 5) Tefir por 45 minutos con la solución de Giemsa al 10%.
- 6) Enjuagar con agua del grifo.
- 7) Dejar secar.
- 8) Leer al microscopio con lente de inmersión x 100.

**Figura 11**  
*Realización de un frotis*



### **ANALISIS DE LOS RESULTADOS**

Realizar el recuento de glóbulos rojos parasitados y no parasitados en 2000 glóbulos rojos totales. Calcular el porcentaje de inhibición con la fórmula indicada en la Tabla 7.

**Tabla 7**  
*Fórmula para el cálculo del porcentaje de inhibición*

$\% \text{ de Inhibición} = \frac{\text{Parasitemia del testigo} - \text{Parasitemia con la droga}}{\text{Parasitemia del testigo}} \times 100$
---

Para determinar la  $CI_{50}$  ver el parágrafo “Determinación de la  $CI_{50}$ ” en este mismo capítulo.

Confirmamos los diferentes grados de sensibilidad de las cepas utilizadas a compuestos antimaláricos clásicos (como la quinina, la cloroquina y la mefloquina), por ejemplo partiendo de soluciones madres a 1 mM en medio de cultivo. Luego se pueden hacer diluciones seriales al 1/2 en la placa misma.

La placa se carga como en los métodos anteriores tomando 100  $\mu$ l de solución y añadiendo 100  $\mu$ l de suspensión globular.

Por lo tanto la concentración final de droga en el primer pozo será la mitad de la solución inicial (por ejemplo, si se utiliza la solución a 1000 nM, la concentración final en el primer pozo será de 500 nM).

*Artemisinina* (PM = 282,3)  $C_{15}H_{22}O_5$

*Clorhidrato de amodiaquina* (PM = 464,8)  $C_{20}H_{22}ON_3Cl, 2HCl, 2H_2O$

*Dapsona* (PM = 248,3)  $C_{12}H_{12}O_2N_2S$

*Difosfato de primaquina* (PM = 455)  $C_{15}H_{21}ON_3, 2PO_4H_3$

*Fosfato de cloroquina* (PM = 515,9)  $C_{18}H_{26}N_3Cl, 2PO_4H_3$

*Halofantrina* (PM = 486)  $C_{26}H_{30}OF_3Cl_2$

*Mefloquina* (PM = 350)  $C_{17}H_{16}OF_6$

*Pirimetamina* (PM = 248,7)  $C_{12}H_{13}N_4Cl$

*Proguanil* (PM = 241,5)  $C_{10}H_{16}N_5Cl$

*Quinina* (PM = 324,4)  $C_{20}H_{22}N_2O_2$

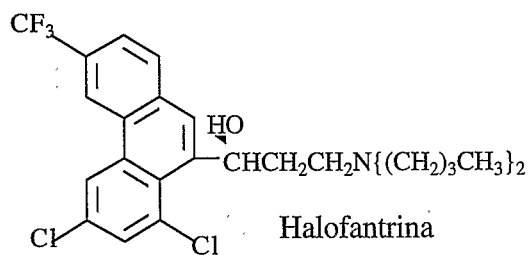
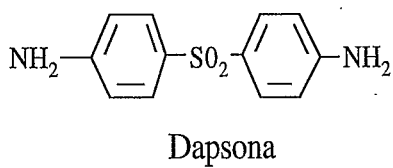
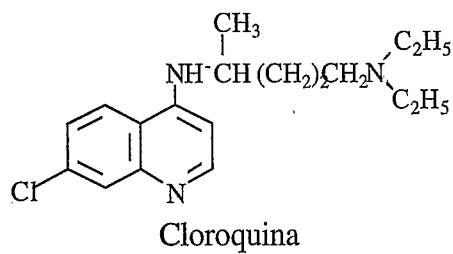
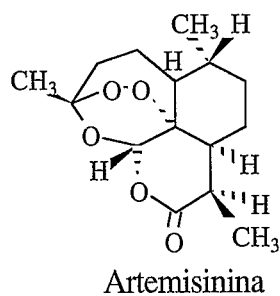
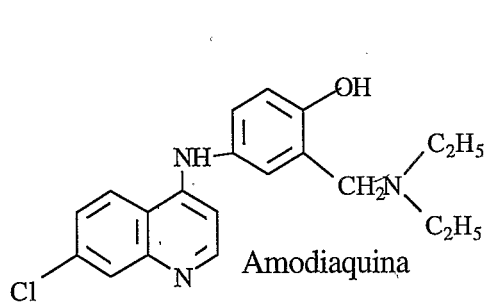
*Sulfadoxina* (PM = 310,3)  $C_{12}H_{14}O_4N_4S$

*Sulfato de cloroquina* (PM = 436)  $C_{18}H_{26}N_3Cl, H_2SO_4, H_2O$

La cepas son consideradas resistentes si sus  $CI_{50}$  son:

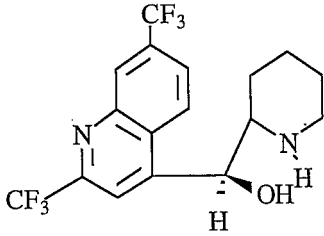
- > 500 nM para la quinina;
- > 100 nM para la cloroquina;
- > 60 nM para la mefloquina.

**Figura 12**  
*Fórmulas de algunas moléculas antimaláricas clásicas*  
 (primera parte)

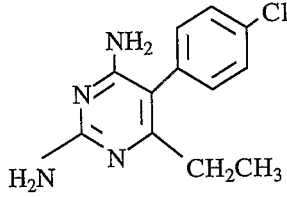


**Figura 12**

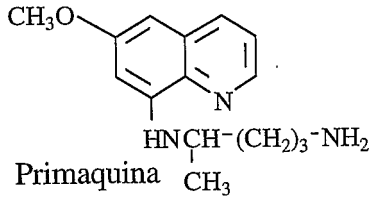
*Fórmulas de algunas moléculas antimaláricas clásicas*  
(segunda parte)



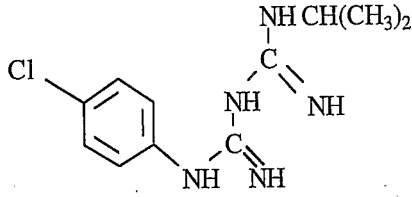
Mefloquina



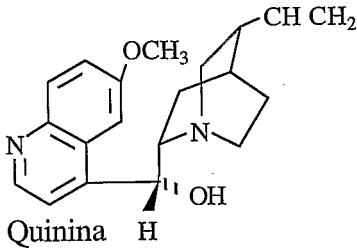
Pirimetamina



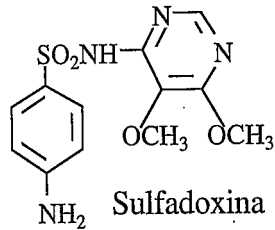
Primaquina



Proguanil = Clorguanidina



Quinina



Sulfadoxina

## Referencias

- Muñoz, V., Sauvain, M., Bourdy, G., Callapa, J., Bergeron, S., Rojas, I., Bravo, J.A., Balderrama, L., Ortiz, B., Gimenez, A. and Deharo, E. (2000) A search for natural bioactive compounds in Bolivia through a multidisciplinary approach. Part I. Evaluation of the antimalarial activity of plants used by the Chacobo Indians. *Journal of Ethnopharmacology*, 69, 127-137.
- Muñoz, V., Sauvain, M., Bourdy, G., Callapa, J., Vargas, L., Tae, A. and Deharo, E. (2000) The search for natural bioactives compounds in Bolivia. Part II. Antimalarial activity of some plants used by Mosekene Indians. *Journal of Ethnopharmacology*, 69, 139-155.
- Muñoz, V., Sauvain, M., Bourdy, G., Arrázola, S., Callapa, J., Ruiz, G., Choque, J. and Deharo, E. (2000) A search for natural bioactive compounds in Bolivia through a multidisciplinary approach. Part III. Evaluation of the antimalarial activity of plants used by Alteños Indians. *Journal of Ethnopharmacology*, 71, 123-131.
- Pradines, B., Rogier, C., Fusai, T., Tall, A., Trape, J.F. and Douvy, J.C. (1996) Sensibilité *in vitro* de 81 isolats de *Plasmodium falciparum* dans la région de Fatick, Sénégal. *Médecine Tropicale*, 56, 141-145.
- Ringwald, P., Bickii, J. and Basco, L.K. (1996) *In vitro* activity of antimalarials against clinical isolats of *Plasmodium falciparum* in Yaounde, Cameroon. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 55, 3, 254-258.

### Método bioquímico

(prueba *in vitro* de la lactato deshidrogenasa parasitaria)

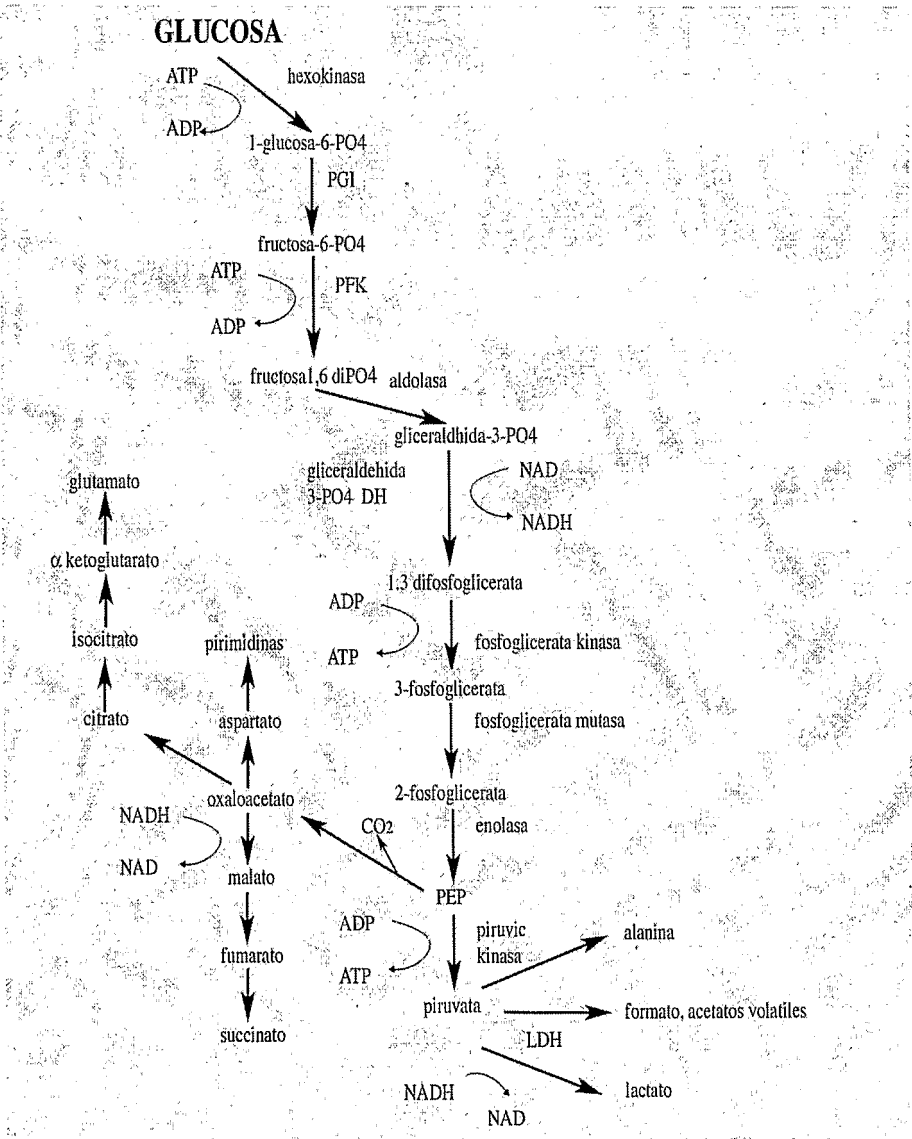
### FUNDAMENTO

Los estudios de las vías metabólicas del *Plasmodium* han conducido a la identificación de enzimas estructuralmente diferentes de las del huésped (Figura 13). La lactato deshidrogenasa (LDH) del parásito ha sido identificada como diferente de la LDH humana tanto a nivel bioquímico como a nivel inmunológico.

La tipificación enzimática de la LDH (EC 1.1.1.27) de las diferentes especies plasmodiales reveló diferencias entre *P. falciparum* (3 bandas), *P. gallinaceum* (1 banda), *P. berghei* (2 bandas), *P. cynomolgi* (4 bandas) y *P. knowlesi* (5 bandas). Los *Plasmodia* necesitan la presencia de la LDH para asegurar el metabolismo de los carbohidratos (25-50 veces mayor que en los glóbulos rojos sanos), considerando que requieren un alto nivel de producción energética para una rápida multiplicación durante el desarrollo intraeritrocitario.

La acidosis láctica complica frecuentemente las infecciones severas constituyéndose en señal predictiva de mortalidad.

**Figura 13**  
*Conversión metabólica de la glucosa en Plasmodium*





La LDH parasitaria (pLDH) puede ser detectada en el estadio anillo como en el estadio trofozoito.

La pLDH y la del eritrocito utilizan la nicotinamida-adenina dinucleótido (NAD) para la transformación de la lactato en piruvato; pero sólo la pLDH tiene la capacidad de utilizar la coenzima 3-acetilpiridina adenina dinucleótido (APAD).

La lactato deshidrogenasa es la última enzima de la vía glicolítica que regenera el NAD necesario para la producción de ATP.

El incremento de la lactato deshidrogenasa está en relación directa con la densidad parasitaria; por lo tanto, la enzima puede ser utilizada como un marcador de *P. falciparum*.

En presencia de la coenzima APAD, la detección de la LDH es específica de la enzima parasitaria y su medición permite la evaluación de la intensidad parasitaria en el cultivo.

La evaluación de la actividad de la LDH se basa en la reacción bioquímica que conduce a la formación de piruvato a partir de la L-lactato en presencia de la LDH parasitaria y de la coenzima APAD.

Esta reacción lleva a la formación de APAD reducida que en su momento reduce NBT (*Nitro Blue Tetrazolium*) formando un derivado formazan azul, detectable a 650 nm.

Este método es tan útil como el "método visual" y el "método radioisotópico", pero tiene la desventaja que la parasitemia inicial tiene que ser superior a 0,5%.

Se obtienen buenos resultados si se inicia con una parasitemia del 1% o 2% y con un Hct de 1,5%.

Un Hct del 5% conduce a un ruido de fondo demasiado elevado (actividad LDH humana).

### MATERIAL

- 1) Utilizar el mismo material indicado en el párrafo "Micométodo radioisotópico", hasta la etapa de congelación con la variación del cambio de la hipoxantina tritiada por hipoxantina normal.
- 2) APAD (3-acetilpiridina adenina dinucleótido).
- 3) L-lactato.
- 4) NBT (*Nitro Blue Tetrazolium*).
- 5) PES (*Phenazine Ethosulfate*).
- 6) Tampón TRIS (*Tris[hydroxymethyl]aminomethane*).
- 7) Triton.

## METODO

### Preparación extemporánea de la solución de APAD (coenzima) y L-lactato (substrato)

- 1) Mezclar a 5 ml de agua bidestilada desionizada, 13,8  $\mu$ l Triton x 100 a 50 °C, hasta su disolución.
- 2) Añadir 220 mg de L-lactato y 60,5 mg de tampón TRIS.
- 3) Mezclar hasta su disolución y enfriar.
- 4) Añadir 40,7 mg de 3-acetilpiridina adenina dinucleótido (APAD).
- 5) Agregar agua hasta un volumen de 11 ml.
- 6) Verificar el pH que debe ser de 9,2 a 20 °C.

### PRIMERA FASE DEL ENSAYO

- 7) Colocar 100  $\mu$ l de la solución previa en cada alvéolo, en una placa de fondo plano de 96 alvéolos.
- 8) A esta mezcla, añadir 20  $\mu$ l de las fases eritrocitarias más las drogas a evaluar (provenientes de la descongelación de la placa previamente preparada).
- 9) Incubar durante 30 minutos a temperatura ambiente.

### Preparación extemporánea de la solución NBT/PES (Nitro Blue Tetrazolium/Phenazine Ethosulfate)

- 1) Disolver, en 20 ml de agua bidestilada desionizada, 32 mg de *Nitro Blue Tetrazolium* (NBT = 1,96 mM), luego añadir 1,6 mg de *Phenazine Ethosulfate* (PES = 0,24 mM).

### SEGUNDA FASE DEL ENSAYO

- 2) Añadir 25  $\mu$ l de solución de NBT/PES en cada alvéolo de la placa de fondo plano de 96 alvéolos
- 3) Incubar durante 35 minutos a temperatura ambiente, protegiendo con papel aluminio la placa de la luz.
- 4) Añadir 25  $\mu$ l de solución de ácido acético a 25% para parar la reacción enzimática.
- 5) Leer a una densidad óptica de 650 nm, para determinar el porcentaje de inhibición del parásito.

## Referencias

- Basco, L., Marquet, F., Makler, M.T. and Le Bras, J. (1995) *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax*: Lactate dehydrogenase activity and its application for *in vitro* drug susceptibility assay. *Experimental Parasitology*, 80, 260-271.
- Delhaes L., Lazaro J.E., Gay F., Thellier M., Danis M. (1999) The microculture tetrazolium assay (MTA): another colorimetric method of testing *Plasmodium falciparum* sensitivity. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, 93, 31-40.
- Kaushal, D., Kaushal, N. and Chandra, D. (1995). Monoclonal antibodies against lactate dehydrogenase of *Plasmodium knowlesi*. *Indian Journal of Experimental Biology*, 33, 1, 6-11.
- Makler, M.T. and Hinrichs, D.J. (1993) Measurement of the lactate dehydrogenase activity of *Plasmodium falciparum* as an assessment of parasitaemia. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 48, 2, 205-10.
- Makler, M.T., Ries, J.M., Williams, J.A., Bancroft, J.E., Piper, R.C., Gibbins, B.L. and Hinrichs, D.J. (1993) Parasite lactate dehydrogenase as an assay for *Plasmodium falciparum* drug sensitivity. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 48, 6, 739-741.
- Ngangoue, N. (1995). Enzymatic syndrome in *Plasmodium falciparum* malaria. *Medecine d'Afrique Noire*, 42, 2, 54-57.
- Pasha, S., Rawat, D., Sethi, P. and Husain, Q. (1984). Enzyme variation in *Plasmodium* spp. *Indian Journal of Parasitology*, 8, 2, 325-328.
- Sessions, R.B., Dewar V., Clarke A.R. and Holbrook, J.J. (1997) A model of *Plasmodium falciparum* lactate dehydrogenase and its implication for the design of improved antimalarials and the enhanced detection of parasitaemia. *Protein Engineering*, 10, 4, 301-306.
- Subbayya, S., Ray, S., Balaram, P. and Balaram, H. (1997). Metabolic enzymes as potential drug targets in *Plasmodium falciparum*. *Indian Journal of Medical Research*, 106, 79-94.
- Wang, F.Y. and Allan, S. (1994). Purification and characterization of lactate dehydrogenase from *Plasmodium falciparum*. *Chinese Journal of Parasitic Disease Control*, 7, 1, 14-18.

## Método fluorométrico

### FUNDAMENTO

El método se basa en la determinación de la fluorescencia del fluorocromo Hoechst 33258-ADN de *Plasmodium falciparum*.

Los ensayos biológicos son realizados en placas de 24 alvéolos, en las cuales el parásito es confrontado con las drogas a diferentes concentraciones. El número de parásitos es directamente proporcional a la cantidad de ADN de los mismos. Por lo tanto, la concentración inhibitoria del 50% puede ser determinada a través de la cuantificación de ADN presente al terminar el ensayo biológico. Se aísla el ADN y se agrega el fluorocromo de la familia de los bis-benzimidazoles, Hoechst 33258, que tiene la capacidad de fijarse sobre los ácidos nucleicos al nivel de la adenina y de la timidina. La sensibilidad llega hasta niveles de ng/ml con una afinidad 100 veces más alta para ADN que para ARN. Posteriormente se mide la fluorescencia y se calcula la  $CI_{50}$ .

### MATERIAL

#### Material de plástico, vidrio y otros

- ◇ Cubetas para el lector de fluorescencia.
- ◇ Placas de 24 pozos.
- ◇ Tubos de vidrio o viales de 4 ml.
- ◇ Tubos Eppendorf® de 2 ml.

#### Reactivos químicos

- ◇ Todos los reactivos indicados para el cultivo de *P. falciparum* (ver el Capítulo 1 de la Primera Parte: "Cultivo de estadios intraeritrocitarios de *Plasmodium falciparum*").
- ◇ Acetato de sodio.
- ◇ ADN de timo de bovino (para calibrar el fluorómetro).
- ◇ Alcohol isoamflico.
- ◇ Cloroformo.
- ◇ Cloruro de sodio p.a.
- ◇ EDTA  $Na_2 \cdot 2 H_2O$ .
- ◇ Guanidinium HCl.
- ◇ HCl, 2-6 N.
- ◇ Hoechst 33258.
- ◇ NaOH, 2 N.
- ◇ Saponina.
- ◇ Tampón PBS ( $NaH_2PO_4 \cdot 2 H_2O$ ,  $Na_2HPO_4 \cdot 12 H_2O$ , NaCl).
- ◇ TRIS HCl.

## Equipo

- ◇ El mismo equipo indicado para el cultivo de *P. falciparum* (ver el Capítulo 1 de la Primera Parte: "Cultivo de estadios intraeritrocitarios de *Plasmodium falciparum*").
- ◇ Fluorómetro tipo Hoefer Dyna Quant 200 o TKO 100 (Amersham Biotech Pharmacia; espectro de emisión de lámpara de mercurio  $365 \pm 7$  y  $365 \pm 50$  nm, detección de fluorescencia de Hoechst 33258  $460 \pm 15$  y  $460 \pm 5$  nm).

## METODO

### Preparación de los reactivos

#### 1) 0,08% de saponina en PBS

PBS: 0,31 g de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$  (2 mM);  
2,86 g de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$  (= 1,14 g de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ) (8 mM);  
7,66 g de NaCl (131 mM).

Agua bidestilada c.s.p. 1000 ml.

Ajustar el pH a 7,4.

Disolver 0,2 g de saponina en 250 ml de PBS.

#### 2) 6 M guanidinium HCl en acetato de sodio 0,1 M, pH 5,5

13,61 g de acetato de sodio en 1000 ml de agua bidestilada.

Ajustar el pH a 6,0 con HCl (2-6 N).

Añadir 57,32 g de guanidinium-HCl a 100 ml de la solución de acetato de sodio.

Ajustar el pH a 5,5 con HCl (2-6 N) o con NaOH.

#### 3) Reactivo fluorométrico

HOECHST 33258

Solución madre: disolver Hoechst 33258 en agua bidestilada [1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ]:

Tampón TNE: 12,11 g TRIS (100 mM);  
3,72 g EDTA  $\text{Na}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$  (10 mM);  
116,89 g de NaCl (2 M).  
Agua bidestilada c.s.p. 800 ml.  
Ajustar el pH a 7,4 con HCl conc.  
Agregar agua bidestilada c.s.p. 1000 ml.

Mezclar 33  $\mu\text{l}$  de la solución madre de Hoechst con 100 ml de TNE (0,33  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ).

#### 4) Cloroformo/alcohol isoamílico (24:1)

### Preparación de las drogas (extractos crudos, fracciones, metabolitos puros)

- 1) Pesar 20 mg del producto natural y disolver en 1 ml de metanol o DMSO (concentración final de DMSO = 0,5%).
- 2) Para lograr solubilidad usar ultrasonido durante 5 minutos o calentar a 37 °C.
- 3) Esterilizar con filtros de 0,22  $\mu\text{m}$ .
- 4) Preparar una solución de 200  $\mu\text{g/ml}$  de la solución madre en medio RPMI sin suero (concentración inicial 100  $\mu\text{g/ml}$ ).
- 5) Diluir a partir de esta solución con RPMI sin suero a las concentraciones deseadas (en tubos o directamente en la placa).

### Test

- 1) Utilizar un cultivo sincronizado al estadio anillo con parasitemia superior al 4%.
- 2) Preparar aproximadamente 15 ml de una suspensión de parásitos con 2% de hematocrito, 1-1,5% de parasitemia en RPMI con 20% de suero humano por placa de 24 pozos.
- 3) Colocar 0,6 ml de las diluciones de las drogas en duplicado, el control positivo y negativo, en los pozos.
- 4) Agregar 0,6 ml de la suspensión de parásito en cada pozo.

*Control positivo:* cloroquina 2  $\mu\text{M}$  (para corregir el ruido de fondo de la fluorescencia derivada de los parásitos presentes al inicio del ensayo).

*Control negativo:* solvente, en el cual se disolvió la droga, con medio de cultivo.

*Muestra:* diferentes concentraciones de las drogas.

- 5) Incubar 48 horas con 2% de  $\text{O}_2$ , 5% de  $\text{CO}_2$  y 93% de  $\text{N}_2$  o en Candle Jarr (colocar una placa con agua destilada en el Candle Jarr para evitar evaporación del medio de cultivo).

### Aislamiento de ADN y fluorimetría

- 1) Pipetear exactamente 0,85 ml de cada pozo de la placa a tubos Eppendorf® de 2 ml.
- 2) Agregar 0,85 ml de saponina 0,08% en PBS y mezclar (vortex).
- 3) Centrifugar durante 3 minutos a 15.800 g inmediatamente después de que la lisis de los glóbulos rojos se haya completado.
- 4) Eliminar el sobrenadante. Los parásitos pueden ser congelados a - 20 °C o ser utilizados inmediatamente.
- 5) Disolver el sedimento de parásitos en 25-50  $\mu\text{l}$  de guanidinium HCl 6 M en acetato de sodio, pH 5,5 (tiene que ser el mismo volumen para todos los tubos).
- 6) Agregar 2 ml de reactivo fluorométrico y 50  $\mu\text{l}$  de cloroformo/alcohol isoamílico.
- 7) Mezclar y centrifugar a 15.800 g durante 1 minuto.
- 8) Transferir 1 ml del sobrenadante a una cubeta del fluorómetro.
- 9) Medir la fluorescencia del Hoechst 33258 en un fluorómetro tipo Dyna Quant 200 o TKO 100.

Para determinar la  $\text{CI}_{50}$  ver a continuación el párrafo "Determinación de la  $\text{CI}_{50}$ " en este mismo capítulo.

## Referencias

Franssen, F.F.J., Smeijsters, L.J.J.W., Berger, I. and Medinilla Aldana, B.E. (1997) *In vivo* and *in vitro* antiplasmodial activities of some plants traditionally used in Guatemala against Malaria. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 41, 7, 1500-1503.

Smeijsters, L.J.J.W., Zijlstra, N.M., Franssen, F.F.J. and Overdulve, J.P. (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.

## ANALISIS DE LOS RESULTADOS

### Determinación de la $CI_{50}$

La  $CI_{50}$  de la droga se puede determinar a través de una interpolación lineal (Tabla 8) o utilizando programas informáticos de gráficos para análisis de regresión tipo logit, probit o análisis polinomial (Figura 14).

El valor de  $CI_{50}$  es calculado por una curva de actividad: porcentaje de inhibición vs logaritmo de la concentración de la droga.

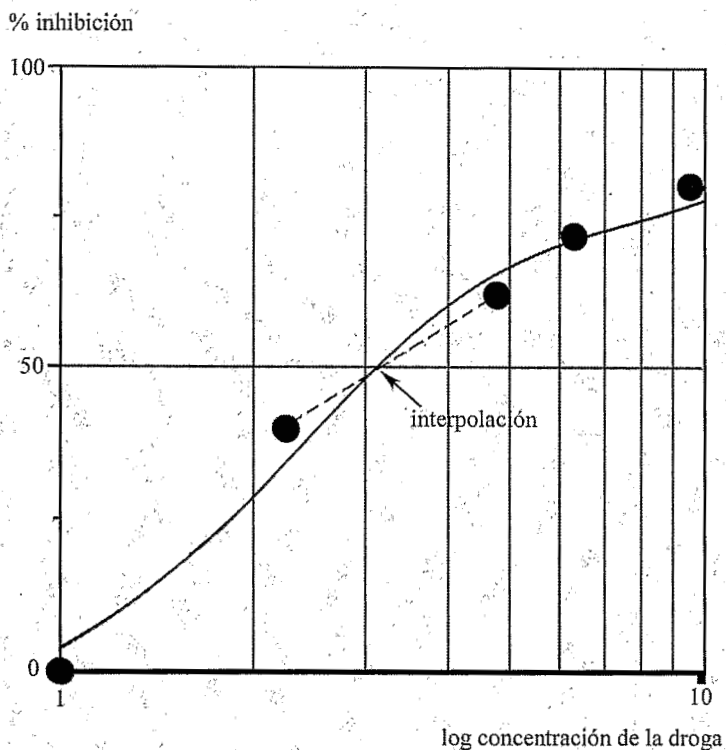
**Tabla 8**

*Cálculo de la interpolación lineal*

$$\log (CI_{50}) = \log (X_1) + \frac{50 - Y_1}{Y_2 - Y_1} [\log (X_2) - \log (X_1)]$$

$X_1$  = concentración de la droga que da una inhibición de la parasitemia  $Y_1 > 50\%$ ;  
 $X_2$  = concentración de la droga que da una inhibición de la parasitemia  $Y_2 < 50\%$ .

**Figura 14**  
*Representación gráfica del análisis tipo 3n-polinomial  
y de la interpolación lineal*



En la figura 14 se puede apreciar que el eje de los  $x$  está constituido por los logaritmos de las concentraciones de droga utilizada, mientras que el eje de los  $y$  está constituido por los porcentajes de inhibición de la parasitemia de los grupos tratados.

Cada punto negro representa el promedio de la respuesta del grupo tratado a una concentración dada.

La línea punteada corresponde a una interpolación entre las dos concentraciones  $x_1$  y  $x_2$ .

### Referencias

Huber, W. and Koella, J.C. (1993) A comparison of three methods of estimating  $EC_{50}$  in studies of drug resistance of malaria parasites. *Acta Tropica*, 55, 257-61.



## METODOS PARTICULARES

### *Estudio de la interacción de drogas in vitro*

#### FUNDAMENTO

La combinación racional de drogas con modalidades independientes de acción en el tratamiento de la malaria está dirigida principalmente a tres objetivos fundamentales:

- 1) acción sobre estadios diferentes del ciclo del parásito;
- 2) incremento de la actividad antiparasitaria aumentando las tasas de curación;
- 3) prevención de la resistencia a las drogas.

Existen suficientes evidencias que las combinaciones que potencializan son mucho más efectivas que las combinaciones aditivas. Por ejemplo, el artesunato o el artemether producen una reducción de la biomasa del parásito del estadio asexual de la sangre aproximadamente de 10.000 veces por ciclo. Así, cada dos días, la biomasa de los parásitos es reducida hasta 10.000 veces. Con tres días de tratamiento, que cubre dos ciclos asexuales, la biomasa de la infección es aproximadamente reducida por un factor de 100.000.000. Las combinaciones con la mefloquina quitan los parásitos residuales.

Esta biomasa residual está expuesta a concentraciones máximas de mefloquina: de esta manera, asociando una droga de acción rápida y fugaz con otra de acción lenta y prolongada, se obtiene un inicio rápido y una duración prolongada.

Por otra parte, las combinaciones con la mefloquina permiten administrar drogas sinérgicas en menores dosis, evitando o disminuyendo los efectos adversos o colaterales de ellas.

En el caso de la cloroquina, se consigue una reversión total cuando los valores de  $CI_{50}$  disminuyen a menos de 70 nM y una reversión parcial cuando se obtienen valores de  $CI_{50}$  inferiores a 100 nM (considerando que el umbral de resistencia en cepas cloroquina-resistentes fluctúa entre 90 y 120 nM).

## MATERIAL

### Material de plástico, vidrio y otros

- ◇ Todo el material general para el cultivo de *P. falciparum* (ver Primera Parte, Capítulo 1: "Cultivo de estadios intraeritrocitarios de *Plasmodium falciparum*").
- ◇ Bolsa de plástico para desechar los materiales contaminados.
- ◇ Filtros de fibra de vidrio tipo Skatron®.
- ◇ Tubos de hemólisis de vidrio de 5 ml.
- ◇ Viales de centelleo de poliestireno de 4 ml.

### Reactivos químicos

- ◇ Dimetilsulfóxido.
- ◇ Etanol absoluto.
- ◇ Hipoxantina tritiada (37 MBq, 1 mCi).
- ◇ Líquido de centelleo tipo ScintiVerse®.

### Equipo

- ◇ Contador beta (estudio radioisotópico).
- ◇ Colector de células tipo PHD *Cell harvester*®.

## METODO

- ◇ Idéntico al método indicado en el Capítulo 2 de la Primera Parte: "Evaluación de la actividad antimalárica *in vitro* de productos naturales o de síntesis".

### Método de los isobogramas

#### *Preparación de la placa de 96 alvéolos*

El volumen final de cada alvéolo es de 200  $\mu\text{l}$  (antes de la incorporación de hipoxantina) y está constituido según los valores reportados en la Tabla 9.

**Tabla 9**

*Contenido de un alvéolo antes de la incorporación de la hipoxantina*

100  $\mu\text{l}$  de la suspensión de glóbulos rojos con parasitemia inicial  
50  $\mu\text{l}$  de solución de droga 1 (diluciones seriadas)  
50  $\mu\text{l}$  de solución de droga 2 (diluciones seriadas)

Preparar un cuadro con las concentraciones respectivas de las drogas a evaluar, como lo de la Tabla 10 (el test se hace en triplicado).

**Tabla 10**  
*Cuadro de las concentraciones*

	D2.0	D2.1	D2.2	D2.3	D2.4	D2.5	CI <sub>50</sub> D2
D1.0							
D1.1							
D1.2							
D1.3							
D1.4							
D1.5							
CI <sub>50</sub> D1							

- D1.0 = Testigos sin droga;  
D2.0 = Testigos sin droga;  
D1.1 = Concentración inferior de la droga 1;-  
D1.5 = Concentración superior de la droga 1;  
D2.1 = Concentración inferior de la droga 2;  
D2.5 = Concentración superior de la droga 2.

Si la droga 2 tiene actividad antimalárica propia es recomendable utilizar dosis subinhibitorias inferiores a la CI<sub>50</sub> de la droga 2. Al final de la prueba se llena el cuadro con el promedio de los valores obtenidos en triplicado. Las líneas D1.0 permiten el cálculo de las CI<sub>50</sub> y de las CI<sub>90</sub> de la droga 2. Las columnas D2.0 posibilitan el cálculo de las CI<sub>50</sub> y de las CI<sub>90</sub> de la droga 1.

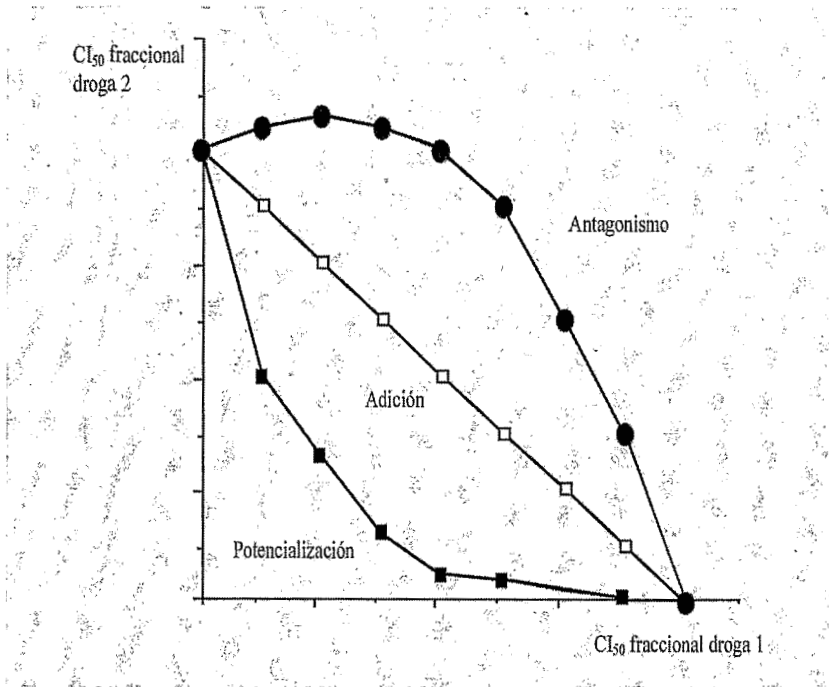
### ANALISIS DE LOS RESULTADOS

Construir isobogramas (Figura 15) para representar la actividad resultante de la asociación de las 2 drogas tomando en cuenta las CI<sub>50</sub> fraccionales para cada combinación de droga 1 y droga 2. La CI<sub>50</sub> fraccional se obtiene empleando las fórmulas indicadas en la Tabla 11.

**Tabla 11**  
*Cálculo de las CI<sub>50</sub> fraccionales*

CI <sub>50</sub> fraccional de la droga 1 =	$\frac{\text{CI}_{50} \text{ de la droga 1 combinada}}{\text{CI}_{50} \text{ droga 1 sola}}$
CI <sub>50</sub> fraccional de la droga 2 =	$\frac{\text{Concentración subinhibitoria de la droga 2}}{\text{CI}_{50} \text{ droga 2 sola}}$

**Figura 15**  
*Representación gráfica de un isoblograma*



En el caso donde las dos moléculas se substituyen mutuamente, la curva trazada es una diagonal, lo que muestra una *sinergia aditiva*.

Cuando las dos moléculas acentúan mutuamente su actividad respectiva, la curva que resulta se acerca al origen de los ejes y toma un aspecto cóncavo. Se trata en este caso de una *sinergia potencializadora*.

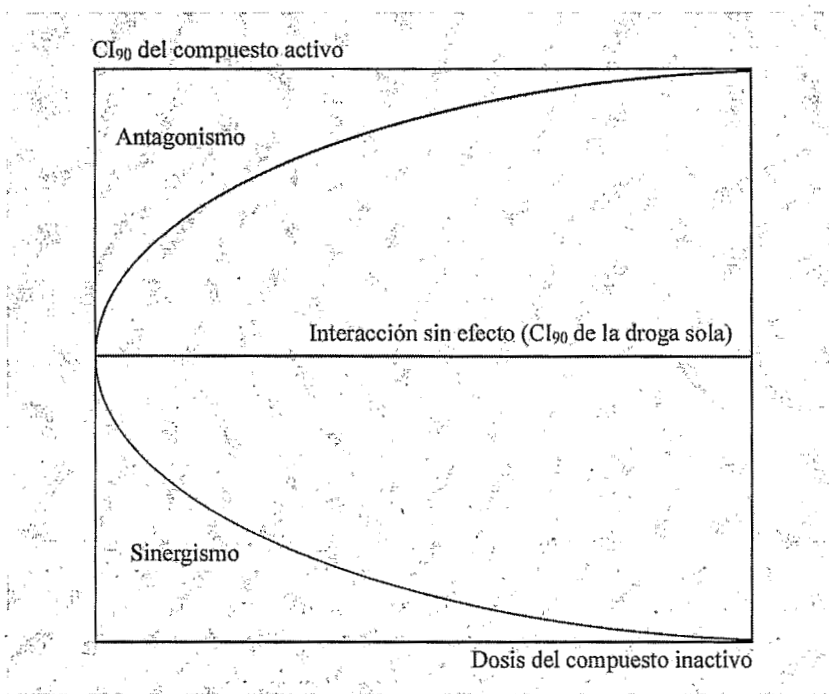
A la inversa, cuando la curva es convexa y se sitúa por encima de la diagonal, la inhibición mútua de las actividades indica que se está en presencia de un *antagonismo*.

### Método del cálculo del Índice de Incremento de Actividad (IIA)

Este método se utiliza, especialmente, cuando uno de los dos compuestos no tiene actividad antimicrobica propia. Por lo tanto, es imposible determinar una  $CI_{50}$  para este producto. En este caso, no se puede utilizar el método de los isobogramas puesto que para este último es necesario conocer la  $CI_{50}$  de ambos productos.

El IIA se obtiene dividiendo la  $CI_{90}$  de la droga activa sola por la  $CI_{90}$  de la droga activa combinada con una dosis de la droga inactiva. Se obtiene, entonces, un IIA por cada dosis de droga inactiva.

**Figura 16**  
*Representación gráfica del IIA*



Si el IIA es  $> 1$ , la combinación es sinérgica; si el IIA es  $= 1$ , la combinación no modifica la actividad de la droga activa; si el IIA es  $< 1$ , la combinación es antagonista.

## Referencias

- Basco, L.K. and Le Bras, J. (1991). *Plasmodium falciparum*: *in vitro* drug interaction between chloroquine and enantiomers of amlodipine. *Experimental Parasitology*, 72, 262-70.
- Berenbaum, M.C. (1978) A method for testing for synergy with any number of agents. *The Journal of Infectious Diseases*, 137, 2, 122-130.
- Gennings, C., Carter, W.H., Campbell, E.D., Staniswalis, J.G., Martin, T.J., Martin, B.R. and White, K.L. Jr. (1990) Isobolographic characterization of drug interactions incorporating biological variability. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 252, 1, 208-17.
- Deloron, Ph., Basco, L.K., Dubois, B., Gaudin, C., Clavier, F., Le Bras, J. and Verdier, F. (1991) *In vitro* and *in vivo* potentiation of chloroquine against malaria parasites by an enantiomer of amlodipine. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 35, 7, 1338-42.
- Frappier, F., Jossang, A., Soudon, J., Calvo, F., Rasoanaivo, Ph., Ratsimamanga-Urverg, S., Saez, J., Schrével, J. and Grellier, Ph. (1996) Bisbenzylisoquinolines as modulator of chloroquine resistance in *Plasmodium falciparum* and multidrug resistance in tumor cells. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 40, 6, 1476-81.
- Martin, S.K., Oduola, A.M.J. and Milhous, W.K. (1987) Reversal of chloroquine resistance in *Plasmodium falciparum* by verapamil. *Science*, 235, 899-90.
- Rasoanaivo, P., Ratsimamanga-Urveg, S., Milijaona, R., Rafatro, H., Rakoto-Ratsimamanga, A., Galeffi, C. and Nicoletti, M. (1993) *In vitro* and *in vivo* chloroquine-potentiating action of *Strychnos myrtoides* alkaloids against chloroquine-resistant strains of *Plasmodium malariae*. *Planta Medica*, 60, 13-16.
- Ratsimamanga-Urveg, S., Rasoanaivo, P., Milijaona, R., Rakotoarimanga, J., Rafatro, H., Robijaona, B., Rakoto-Ratsimamanga, A., Verdier, F. and Le Bras, J. (1994) *In vitro* antimalarial activity, chloroquine potentiating effect and cytotoxicity of alkaloids of *Hernandia voyronii* Jum. (Hernandiaceae). *Phytotherapy Research*, 8, 18-21.
- Ratsimamanga-Urveg, S., Rasoanaivo, P., Rafatro, H., Robijanoa, B. and Rakoto-Ratsimamanga, A. (1994) *In vitro* antiplasmodial activity and chloroquine-potentiating action of three new isoquinoline alkaloid dimers isolated from *Hernandia voyronii* Jumelle. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, 88, 3, 271-77.
- Ratsimamanga-Urveg, S., Rasoanaivo, P., Ramiaramanana, L., Milijaona, R., Rafatro, H., Verdier, F., Rakoto-Ratsimamanga, A. and Le Bras, J. (1992) *In vitro* antimalarial activity and chloroquine potentiating action of two bisbenzylisoquinoline enantiomer alkaloids isolated from *Strychnopsis thouarsii* and *Spirospermum penduliflorum*. *Planta Medica*, 58, 540-43.

## *Efecto de drogas sobre la permeabilidad membranaria de glóbulos rojos parasitados*

### FUNDAMENTO

El parásito en desarrollo dentro del glóbulo rojo induce notables cambios en la permeabilidad de la membrana, permitiendo el transporte de diferentes solutos vitales para su metabolismo mediante activación de nuevas vías necesarias para este efecto. En el test serán utilizados cultivos sincronizados de *P. falciparum*, en estadios maduros (parasitemia > 70%), puesto que las nuevas vías son detectadas 6 horas después de la infección y aumentan en número, en el transcurso del desarrollo del parásito, dependiendo de la síntesis de las proteínas. Se estudia la capacidad de las drogas de impedir la entrada de sorbitol midiendo el porcentaje de lisis de glóbulos infectados por parásitos maduros expuestos a las drogas más el sorbitol. Bloqueando las vías utilizadas por el parásito se podría, consecuentemente, inhibir el desarrollo del mismo.

### MATERIAL

#### Material de plástico, vidrio y otros

- ◇ Todo el material general para el cultivo de *P. falciparum* (ver Primera Parte, Capítulo 1: "Cultivo de estadios intraeritrocitarios de *Plasmodium falciparum*").

#### Reactivos químicos

- ◇ Solución sorbitol 5% en TRIS 10 mM (TRIS[hydroxymethyl]aminomethane).
- ◇ Solución tampón PBS, pH 7,4 (ver la preparación en el párrafo "Sincronización con la técnica del Percoll®-glucosa", Capítulo 5, Segunda Parte).

#### Equipo

- ◇ Cronómetro.
- ◇ Espectrofotómetro.

### METODO 1

- 1) Preparar las concentraciones de los productos a evaluar al doble de su  $CI_{50}$ .
- 2) Realizar un cálculo para el volumen total de sorbitol (1,5 ml x número de tubos) que será utilizado en la prueba (Figura 17).
- 3) En el test, utilizar cultivos sincronizados de *P. falciparum* con estadios maduros (parasitemia > 70%), aplicando el método de flotación en gelatina (Figura 8).
- 4) Resuspender los glóbulos rojos parasitados en RPMI sin suero (hematocrito final de 0,5%).

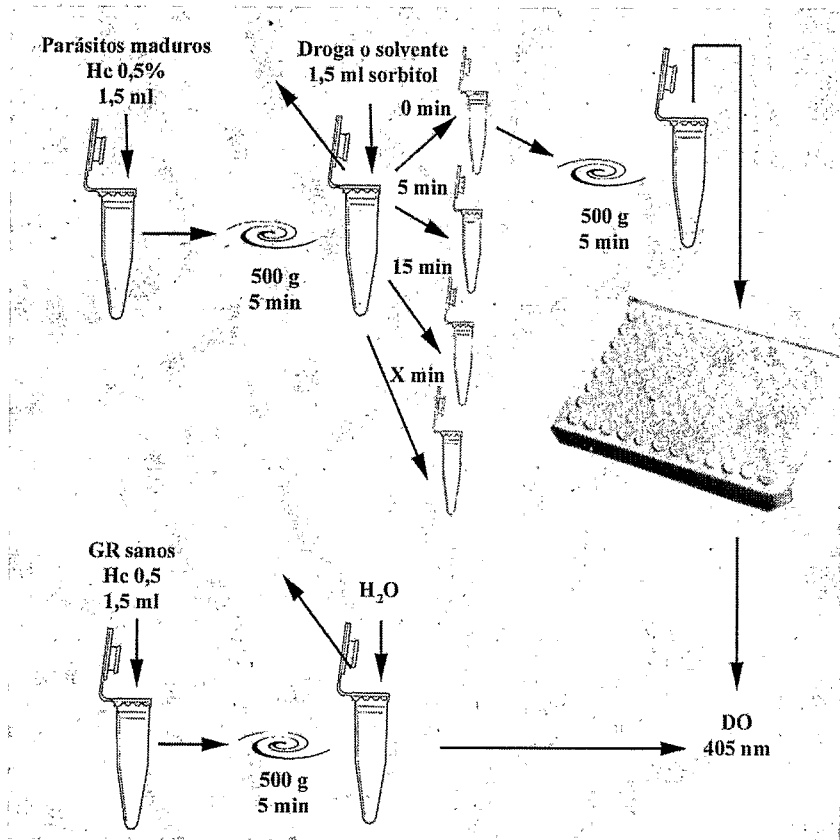
- 5) Colocar 1,5 ml de la suspensión globular en tubos de centrifugación tipo Eppendorf®.
- 6) Utilizar una cantidad de tubos de acuerdo al número de productos a ensayar.
- 7) Centrifugar durante 5 minutos a 500 g.
- 8) Eliminar el sobrenadante.
- 9) Añadir 100  $\mu$ l de una solución de droga al doble de su  $CI_{50}$  (calculado para un volumen total de 1,5 ml).
- 10) Rápidamente, añadir 1,4 ml de solución sorbitol.
- 11) Realizar controles positivos (solvente utilizado + sorbitol 5%) y negativos (PBS pH 7,4, con la droga)
- 12) Preparar el estándar lisando con agua destilada el mismo número de glóbulos rojos parasitados utilizados en el test.
- 13) Posteriormente, sacar 200  $\mu$ l de suspensión en diferentes intervalos de tiempo (0-5-15-30 y 60 minutos) y colocar en tubos Eppendorf®; luego de centrifugar los mismos (durante 5 minutos a 500 g), colocar 100  $\mu$ l de sobrenadante en una placa de microtitulación de 96 alvéolos en duplicado.
- 14) Medir el contenido de hemoglobina en el espectrofotómetro a 405 nm de longitud de onda.

## **METODO 2**

- 1) Incubar los parásitos con los productos a evaluar (a varias concentraciones) durante varias horas.
- 2) Al final del período de incubación, lavar las células 2 veces con PBS.
- 3) Resuspender las células en una solución isotónica de sorbitol (200 mM) + NaCl (50 mM) + Na-fosfato (5 mM), pH 7,4 (hematocrito 5-10%).
- 4) Posteriormente, sacar 400  $\mu$ l de suspensión en diferentes intervalos de tiempo (0-5-15-30 y 60 minutos) y colocarlos en tubos Eppendorf®.
- 5) Centrifugar durante 5 minutos a 500 g.
- 6) Diluir 5 veces 300  $\mu$ l de sobrenadante con agua destilada previamente a la lectura a 405 nM.
- 7) En paralelo, diluir 50  $\mu$ l de la suspensión globular en 4 ml de agua destilada para el calculo de lisis.



**Figura 17**  
*Estudio de la permeabilidad membranaria*



### ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS

Calcular el porcentaje de lisis en relación al estándar: hemoglobina total presente en la suspensión celular luego de lisar la muestra con agua (Tabla 12).

**Tabla 12**  
*Cálculo del porcentaje de lisis*

$$\% \text{ de lisis} = 100 \times \frac{(\text{DO droga}) - (\text{DO PBS con droga})}{(\text{DO estándar})}$$

Luego construir una curva tiempo vs % lisis.

Si la droga bloquea las vías de la membrana del glóbulo rojo parasitado, la curva será similar a la curva obtenida para el PBS.

Si la droga no tiene efecto sobre la permeabilidad, la curva será similar a la curva obtenida para el sorbitol.

### Referencias

Ginsburg, H. (1990) Alterations caused by the intraerythrocytic malaria parasite in the permeability of its host cell membrane. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 95, 1, 31-39.

Ginsburg, H. (1990) Some reflections concerning host erythrocyte malaria parasite interrelationships. *Blood cells*, 16, 225-235.

Ginsburg, H. and Stein, W. D. (1987) New permeability pathways induced by the malaria parasite in the membrane of its host erythrocyte: Potential routes for targeting drugs into infected cells. *Bioscience Report*, 7, 6, 455-463.

Ginsburg, H. and Stein, W.D. (1987) Biophysical analysis of novel transport pathways induced in red blood cell membranes. *Journal of Membrane Biology*, 96, 1-10.

Kutner, S., Baruch, D., Ginsburg, H. and Cabantchik, Z.I. (1982) Alterations in membrane permeability of malaria-infected human erythrocytes are related to the growth stage of the parasite. *Biochimica et Biophysica Acta*, 687, 113-117.

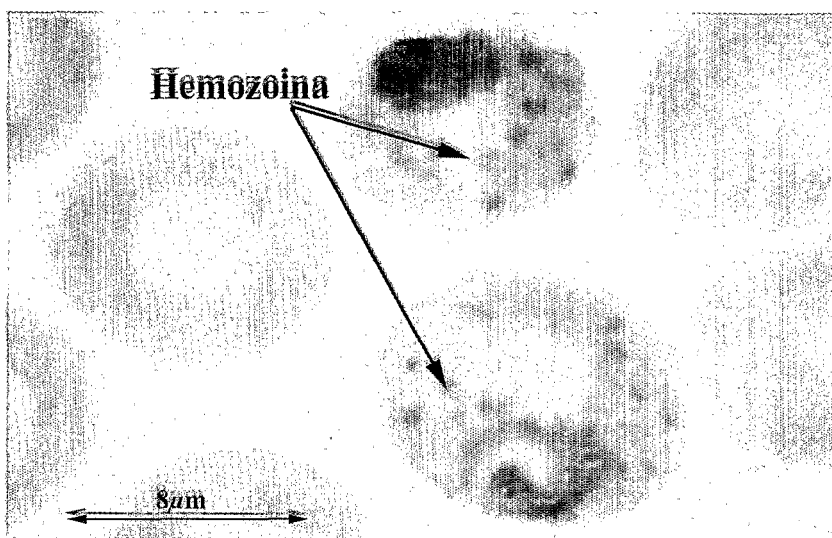
Kutner, S., Breuer, W.V. and Ginsburg H. (1985) Characterization of permeation pathways in the plasma membrane of human erythrocytes infected with early stages of *Plasmodium falciparum*: association with parasite development. *Journal of Cellular Physiology*, 125, 521-527.

## *Inhibición de la polimerización del heme*

### FUNDAMENTO

En su fase eritrocitaria, el *Plasmodium* consume las cadenas de aminoácidos de la globina dejando libre a los grupos hemínicos de la hemoglobina ya que los polimeriza bajo una forma denominada *hemozoína* (Foto 6). Este fenómeno es indispensable para el crecimiento del parásito.

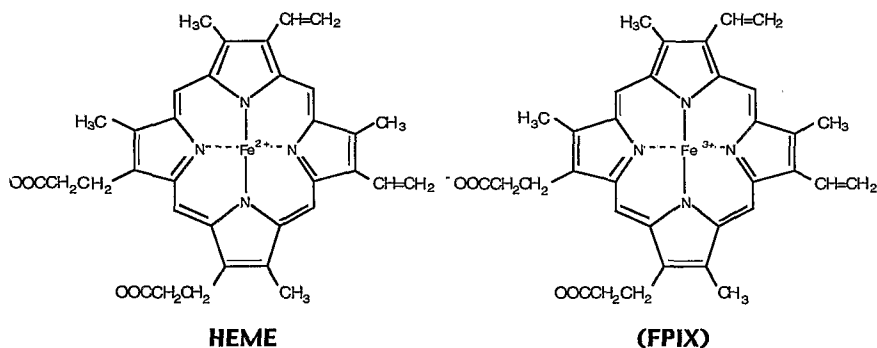
**Foto 6**  
*Hemozoína*



Los aminoácidos obtenidos de la globina le sirven al parásito para construir sus propias proteínas, y la detoxificación del heme, bajo forma de un polímero, lo protege de la acción oxidante de los grupos porfíricos. Según el criterio de algunos autores, el heme tendría las características espectrales infrarrojas idénticas a las de la beta-hematina. La síntesis de estas moléculas, en el laboratorio, se efectúan en condiciones operacionales relativamente fáciles a partir de la hemina o de la hematina. En base a este hecho se puede evaluar simplemente la actividad de drogas sobre la formación de la beta-hematina. Los productos inhibitorios de la polimerización son potencialmente antimaláricos.

**Figura 18**

*Fórmulas del heme y del FPIX*



### MATERIAL

#### Material biológico

- ◇ Productos a evaluar.

#### Material de plástico, vidrio y otros

- ◇ Micropipetas de 50-200  $\mu$ l.
- ◇ Microplacas de cultivo de 96 alvéolos de fondo plano.
- ◇ Tubos Eppendorf® de 1,5 ml.

#### Reactivos químicos

- ◇ Acido acético concentrado (17,4 M).
- ◇ Dimetilsulfóxido.
- ◇ Hemina ( $C_{34}H_{32}ClFeN_4O_4$ , PM: 652) o hematina ( $C_{34}H_{33}FeN_4O_5$ , PM: 633,5) 6,5 mM (42 mg en 10 ml de NaOH 0,2 M).
- ◇ NaOH 0,1 N (NaOH 0,2 M diluida al 50%).
- ◇ NaOH 0,2 N (80 mg NaOH en 10 ml de agua destilada).
- ◇ Tampón acetato de sodio ( $C_2H_3NaO_2 \cdot 3H_2O$  68,1 g en 1 l de agua destilada).

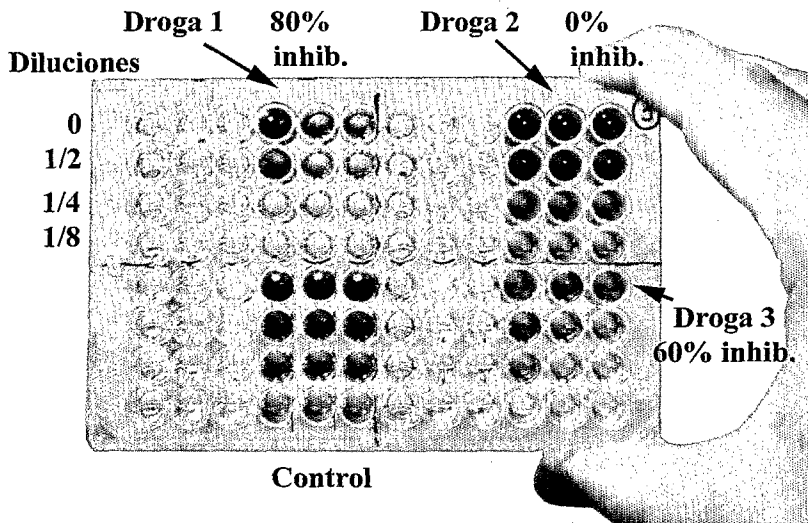
### METODO

- 1) Colocar en un tubo Eppendorf® de 1,5 ml:

100  $\mu$ l de solución de hematina recién preparada;  
50  $\mu$ l de droga a evaluar (o 50  $\mu$ l de agua como control) a la concentración de 20 mg/ml;  
50  $\mu$ l de ácido acético glacial a 17,4 M;  
200  $\mu$ l de tampón acetato de sodio;  
pH final de 3,8.

- 2) Incubar durante 24 horas a 37 °C.
- 3) Centrifugar los tubos Eppendorf® durante 15 minutos a 3300 g.
- 4) Eliminar el sobrenadante que contiene la fracción soluble de la hematina no polimerizada.
- 5) Lavar con 200  $\mu$ l de DMSO.
- 6) Centrifugar los tubos Eppendorf® durante 10 minutos a 3300 g.
- 7) Eliminar el sobrenadante.
- 8) Lavar otra vez con 200  $\mu$ l de DMSO.
- 9) Centrifugar los tubos Eppendorf® durante 5 minutos a 3300 g.
- 10) Eliminar el sobrenadante.
- 11) Disolver el precipitado con 200  $\mu$ l de NaOH 0,2 N.
- 12) Diluir hasta 1/8 con NaOH, 0,1 N.
- 13) Distribuir 100  $\mu$ l de muestra en una placa de microtitulación.
- 14) Leer a 405 nm con un fotómetro (Foto 7).

Foto 7  
Placa de lectura

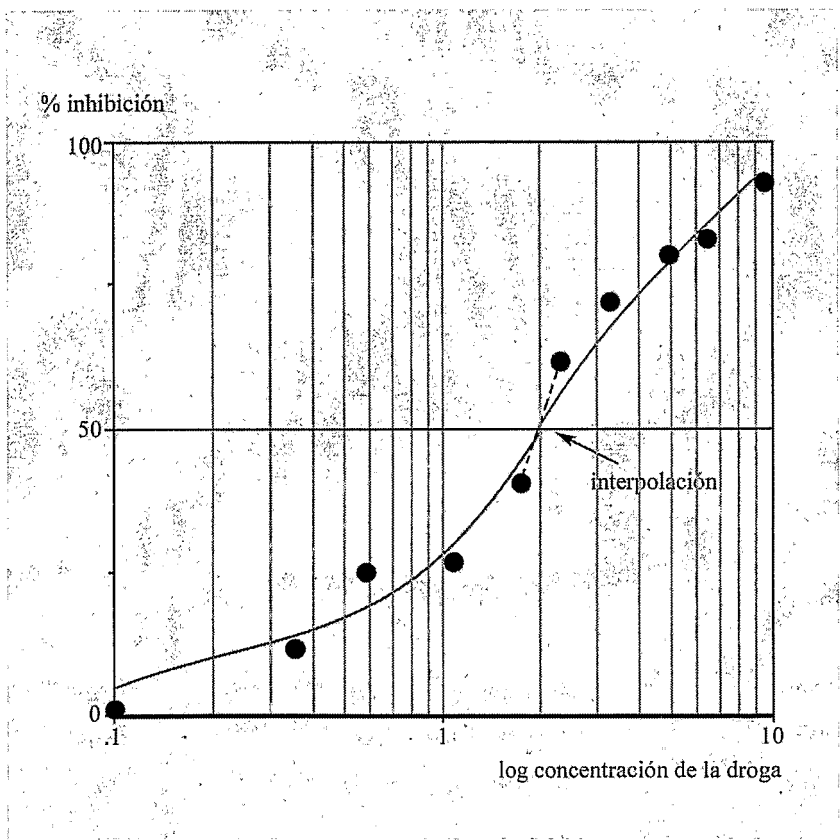


Los valores de la lectura permitirán determinar el porcentaje de inhibición de la polimerización del heme, con la fórmula indicada en la Tabla 13.

**Tabla 13**  
*Cálculo del porcentaje de inhibición de la polimerización del heme*

$$\% \text{ inhibición} = 100 \times \frac{1 - (\text{DO extracto})}{(\text{DO control})}$$

**Figura 19**  
*Representación gráfica de la determinación de la CI<sub>50</sub> de la cloroquina*



## Referencias

- Baelmans, R., Deharo, E., Muñoz, V., Sauvain, M., Ginsburg, H. (2000) Experimental conditions for testing the inhibitory activity of chloroquine on the formation of  $\beta$ -haematin. *Journal of Experimental Parasitology*. *Submitted*.
- Baelmans, R., Deharo, E., Muñoz, V., Quenevo, C., Bourdy, G., Ginsburg, H. (2000) A Search for natural bioactive compounds in Bolivia through a multidisciplinary approach. Part IV. A modified haempolymerization inhibitory activity test. Application to the evaluation of the antimalarial activity of natural products. *Journal of Ethnopharmacology*. *In press*.
- Basilico, N., Monti, D., Olliaro, P. and Taramelli, D. (1998) Non-iron porphyrins inhibit  $\beta$ -haematin (malaria pigment) polymerization. *FEBS letters*, 409, 297-299.
- Basilico, N., Pagani, E., Monti, D., Olliaro, P. and Taramelli, D. (1998) A microtitre-based method for measuring the haem polymerization inhibitory activity (HPIA) of antimalarial drugs. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 42, 55-60.
- Dorn, A., Vippagunta, S.R., Matile, H., Bubendorf, A., Vennerstrom, J.L. and Ridley, R.G. (1998) A comparison and analysis of several ways to promote haematin (Haem) polymerization and an assessment of its initiation *in vitro*. *Biochemical Pharmacology*, 55, 737-747.
- Dorn, A., Vippagunta, S.R., Matile, H., Jacquet, C., Vennerstrom, J.L. and Ridley, R.G. (1998) An assessment of drug-haematin binding as a mechanism for inhibition of haematin polymerization by quinoline antimalarials. *Biochemical Pharmacology*, 55, 727-736.
- Egan, J.T., Ross, D.C. and Adams, P.A. (1994) Quinoline anti-malarial drugs inhibit spontaneous formation of  $\beta$ -haematin (malaria pigment). *FEBS letters*, 352, 54-57.

*Segunda Parte*

**CICLO INTRAERITROCITARIO *IN VIVO*  
DE *PLASMODIUM* DE ROEDORES**





## Introducción

### ETICA Y CUIDADO DE LOS ANIMALES

*La protección de todos los seres vulnerables es signo de humanitarismo.  
Se debe enfatizar la importancia ética que tiene el sufrimiento animal  
para la sociedad humana.*

(David.B. Morton)

En toda experimentación en la que se manipule animales debe aplicarse la *Regla de las 3 R*: “Reducción; Refinamiento, Reemplazo” (*Reduce, Refine, Replace*).

1. *Reducción*: utilizar el número mínimo imprescindible de animales. De este modo se evitarán las repeticiones de los estudios (protocolos de ensayo bien definidos y estudio previos, bibliografía etc.).
2. *Refinamiento*: mejorar las pruebas experimentales y las condiciones de vida de los animales para prevenir todo tipo de sufrimiento inútil, aprovechando las informaciones obtenidas en un sólo experimento (estudios histopatológicos complementarios etc.).
3. *Reemplazo*: reemplazar cuando sea posible los ensayos sobre animales por métodos alternativos (*ex vivo, in vitro*, modelización matemática etc.).

Por lo tanto, todo experimentador tiene el deber de preguntarse:

1. Si está capacitado (o si la estructura donde trabaja tiene personal capacitado) para el manejo de los animales y de las técnicas invasivas.

2. Si la estructura donde trabaja tiene los requisitos para alojar o criar animales en condiciones reconocidas por la comunidad científica internacional y el legislador.
3. Si los animales provienen de estructuras de producción legalmente establecidas.
4. Si los experimentos planificados son científicamente válidos y si no son la repetición de experimentos ya publicados.
5. Si la manipulación se realiza en condiciones que garanticen el mínimo de sufrimiento tanto a nivel físico como psicológico del animal.

La resultante de la infección malárica es una rápida baja de temperatura, por lo tanto es necesario mantener constantes la temperatura y la humedad del bioterio. Los animales deben ser criados en un ambiente donde la temperatura óptima se encuentra dentro del rango que permita mantener la temperatura corporal con un mínimo de actividad metabólica (20-24 °C, humedad 60%). Los animales están expuestos a un ciclo artificial de luz desde las 8 de la mañana hasta las 20 de la tarde, un movimiento de 15 a 20 cambios de aire fresco (no recirculado) por hora y con un nivel de ruido no mayor a los 85 decibelios.

Además, los ratones son agrupados en lotes que no sobrepasan los 10 individuos por jaula, recibiendo agua y alimentos *ad libitum*.

El punto crítico de la reproductibilidad de los experimentos con *Plasmodium* de muridos es el estado de salud de los roedores.

Los animales deben estar exentos de organismos de los géneros *Eperythrozoon coccoides* y *Haemobartonella muris*. Estos miembros de la familia Anaplasmataceae se transmiten mediante vectores artrópodos o por la inoculación de sangre de un animal infectado a otro animal. También resisten a la congelación y pueden ser inyectados con la cepa de *Plasmodium* con la cual fueron congelados.

En los frotis de sangre (Figura 11) teñidos con colorante Giemsa, estos microorganismos aparecen como cuerpos a menudo confundidos con manchas de colorante, que miden 0,2-0,4  $\mu\text{m}$  de diámetro. Por lo tanto, para diagnosticar tal infección, los frotis deben ser leídos con mucha atención y el colorante debe ser previamente filtrado.

Estos microorganismos pueden observarse pegados a los eritrocitos (rodeando el glóbulo rojo) o también libres (sobre todo *Eperythrozoon coccoides*) en el plasma de los animales infectados.

Se presentan en pequeñas cadenas o agrupados de manera irregular.

La característica clínica de la infección causada por estos organismos es una anemia crónica que se superpone a aquella causada por *Plasmodium*, generando modificaciones en la fórmula sanguínea y provocando un incremento de la cantidad de reticulocitos.

Como *P. berghei* se desarrolla de manera preferencial en los glóbulos inmaduros, la presencia de *E. coccoides* o *H. muris* modifica el desarrollo del *Plasmodium* y puede causar variaciones en las respuestas a las drogas estudiadas.

Hoy en día, el único tratamiento disponible son las tetraciclinas. Lastimosamente este tratamiento actúa también contra *Plasmodium*.

Por lo tanto, es preferible descartar a todos los animales contaminados, limpiar y desinfectar el bioterio, luego empezar un nuevo protocolo con animales sanos y sangre infectada solamente por *Plasmodium*.

### Referencias

- Morton, D.B. (1997) La importancia ética del sufrimiento de los animales para los profesionales responsables de su atención. *Animales de experimentación*, 3, 2, 9-11.
- Livre blanc sur l'expérimentation animale* (1995). Editions de l'INSERM et du CNRS.



## Capítulo 1

### LOS *PLASMODIA* DE ROEDORES

#### FUNDAMENTO

Los *Plasmodia* de roedores son ampliamente utilizados para intentar de 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.

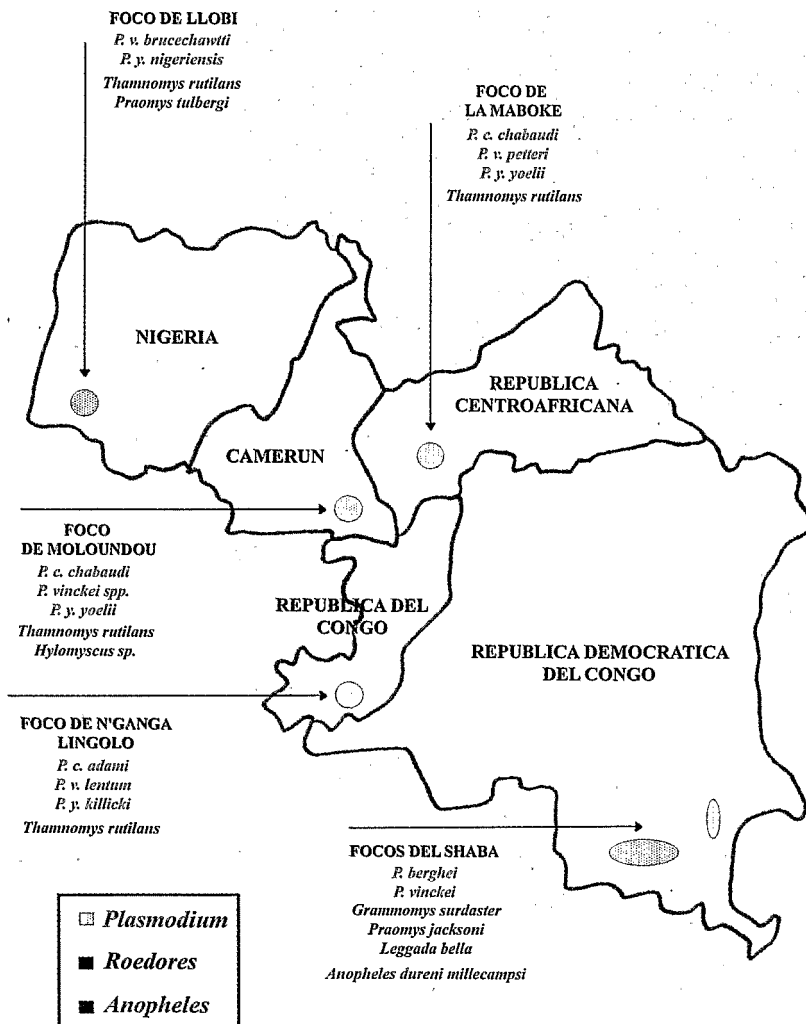
Hasta hace pocos años se pensaba que los *Plasmodia* de roedores eran muy similares y que tenían un ciclo esquizogónico sanguíneo de 24 horas. Esta noción de modelo universal de *Plasmodium* de roedores era errónea. En realidad, tienen características biológicas muy distintas, como sus orígenes. Hoy en día, es posible escoger la especie más adecuada para contestar a una pregunta científica dada.

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 20).

Estas especies presentan a su vez subespecies cuya nomenclatura actual está descrita en las páginas siguientes.

**Figura 20**

Mapa de las zonas de descubrimiento de los Plasmodia de roedores



### *Plasmodium vinckei*

Cuatro especies de *Plasmodium vinckei* han sido descritas:

- 1) *P. vinckei brucechwatti* (Killick-Kendrick, 1975, Nigeria);
- 2) *P. vinckei vinckei* (Rodhain, 1952, Katanga, vector *Anopheles durenii*);
- 3) *P. vinckei petteri* (Carter y Walliker, 1977; República Centroafricana);
- 4) *P. vinckei lentum* (Landau, Michel, Adam, Boulard, 1970, Congo).

Las dos últimas especies fueron aisladas en un hospedador vertebrado que vive en los árboles (*Thamnomys rutilans*).

*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.

### *Plasmodium chabaudi*

Han sido descubiertas dos subespecies de *Plasmodium chabaudi*:

- 1) *P. chabaudi chabaudi* (Landau, 1965, llanuras de la República Centroafricana);
- 2) *P. chabaudi adami* (Carter y Walliker, 1975, Congo).

*P. chabaudi* presenta un ciclo de 24 horas, un poco menos sincrónico que *P. vinckei*. 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.

### *Plasmodium berghei*

Han sido aisladas varias cepas de *Plasmodium berghei*, entre las cuales:

- 1) *P. berghei* ANKA (Vincke y Lips, 1948, ANKA para Anvers-Katanga, Katanga);
- 2) *P. berghei* NK 65 (Vincke y Lips, 1948, NK para New York-Kasapa).

Las dos subespecies han sido descubiertas en las alturas del Katanga (el Shaba, en el sur de la República Democrática del Congo), caracterizadas por grandes variaciones de temperatura entre el día y la noche. Sus



hospedadores vertebrados conocidos son *Grammomys surdaster*, *Leggada bella*, *Praomys jacksoni* y un vector llamado *Anopheles dureni millecampsii*. *P. berghei* tiene una gran afinidad por los reticulocitos y un ciclo asincrónico de 21 horas.

### *Plasmodium yoelii*

Tres especies de *Plasmodium yoelii* fueron descubiertas en *Thamnomys rutilans*, un roedor salvaje que vive en los árboles, a 2 metros del suelo:

- 1) *P. yoelii killicki* (Landau, Michel and Adam, 1968, Congo);
- 2) *P. yoelii nigeriensis* (Killick-Kendrick, 1973, Nigeria);
- 3) *P. yoelii yoelii* (Landau and Killick-Kendrick, 1966, República Centrafricana).

*P. yoelii killicki* ha sido encontrado en el valle de la selva congoleña a una temperatura de 25 °C. El vector es desconocido (*Anopheles dureni* no se encuentra en baja altitud).

*P. yoelii* presenta un ciclo eritrocitario muy asincrónico, de 18 horas, y prefiere los eritrocitos inmaduros.

Los *Plasmodia* de roedores fueron clasificados según sus sensibilidades a la cloroquina. Para tal propósito fue empleado el "Test de prepatencia". Este test (detallado más adelante, en el Capítulo 4 de la Segunda Parte: "Determinación del estadio sensible") permite evaluar el "período prepatente", definido como el tiempo (en días) necesario para que la parasitemia llegue al 2% después de la inoculación de sangre infectada congelada.

Para obtener una diferencia significativa entre la prepatencia del grupo testigo que ha recibido el solvente y el grupo tratado con cloroquina, se necesita una dosis de:

- 2,5 mg/kg para *P. chabaudi adami* y *P. vinckei petteri*;
- 5 mg/kg para *P. vinckei lentum*, *P. vinckei vinckei*, *P. chabaudi chabaudi* y *P. berghei ANKA*;
- 10 mg/kg para *P. berghei NK65*;
- 20 mg/kg para *P. yoelii killicki* y *P. yoelii yoelii*;
- 50 mg/kg para *P. yoelii nigeriensis*.

Por lo tanto, *Plasmodium vinckei petteri* es veinte veces más sensible a la cloroquina que *Plasmodium yoelii nigeriensis*.

## Referencias

Beauté-Lafitte, A., Altemayer-Caillard, V., Gonnet-Gonzalez, F., Ramiamanana, L., Chabaud, A.G. and Landau, I. (1994) The chemosensitivity of the rodent malarías - Relationships with the biology of merozoites. *International Journal for Parasitology*, 24, 7, 981-86.

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.

Deharo, E., Gautret, Ph., Ginsburg, H., Chabaud, A.G. and Landau, I. (1994) Synchronization of *Plasmodium yoelii nigeriensis* and *Plasmodium yoelii killicki* infection in the mouse by means of Percoll®-glucose gradient stage fractionation: determination of the duration of the schizogonic cycle. *Parasitology Research*, 80, 159-164.

Gautret, Ph., Deharo, E., Chabaud, A.G., Ginsburg H. and Landau, I. (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., Deharo, E., Tahar, R., Chabaud, A.G. and Landau, I. (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.

Landau, I., Boulard, Y., Cox, F.E.G., Killick-Kendrick, R. and Peters, W. (1978) *Rodent malaria*. Academic Press, London.

Landau, I. and Chabaud, A.G. (1994) *Plasmodium* species infecting *Thamnomys rutilans*: a zoological study. *Advances in Parasitology*, 33, 49-90.

Landau, I. and Gautret, Ph. (1998) Chapter 28, "Animals Models: Rodents", in Sherman, W.I. editor (1999) *Malaria: Parasite Biology, Pathogenesis and Protection*. American Society for Microbiology, Washington, D.C., 401-417.



## Capítulo 2

### MANTENIMIENTO DE LAS CEPAS

#### FUNDAMENTO

Los estadios intraeritrocitarios de *Plasmodium* de roedores se conservan fácilmente a  $-80^{\circ}\text{C}$ . 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, sanos, tipo Swiss. Se evalúa el desarrollo de la parasitemia mediante frotis cotidianos. Una vez obtenida la parasitemia deseada, se pueden infectar otros ratones sanos.

#### MATERIAL

##### Material biológico

- ◇ Ratones machos, sanos, tipo Swiss (peso: 18-22 g).
- ◇ Sangre de ratón infectada con una de las cepas citadas.

##### Material de plástico, vidrio y otros

- ◇ Guantes.
- ◇ Jeringas de 1 ml.
- ◇ Pipetas Gilson de 200  $\mu\text{l}$ .
- ◇ Pipetas Pasteur.
- ◇ Porta-objetos.
- ◇ Tijeras.
- ◇ Tubos para congelación.
- ◇ Tubos de plástico de 15 ml.

### Reactivos químicos

- ◇ Cloroformo.
- ◇ Colorante Giemsa.
- ◇ Glicerol.
- ◇ Heparina sódica de 5000 UI/ml.
- ◇ Suero fisiológico.

### Equipo

- ◇ Bioterio.
- ◇ Microscopio.

## METODO

### Congelación de las cepas a partir de ratón infectado

- 1) Se evalúa la parasitemia de 5 ratones infectados, siendo necesario un pequeño corte en la extremidad de la cola (con tijeras), recuperando una gota de sangre para hacer un frotis (Figura 11).
- 2) Luego se procede a la tinción (ver el párrafo "Método visual", Capítulo 2, Primera Parte) y se lee con el objetivo x 100 a inmersión.
- 3) Cuando la parasitemia llega al 20% se toma de la región retro-orbitaria aproximadamente 1 ml de sangre con una pipeta Pasteur (previamente humedecida con una gota de heparina).
- 4) También se puede obtener la sangre por punción cardiaca con una jeringa heparinizada, previo adormecimiento de los ratones con cloroformo.
- 5) Se coloca la sangre en un tubo de 15 ml y se añade una solución de glicerol al 10% (1 ml de glicerol + 9 ml de NaCl a 0,9%) volumen por volumen.
- 6) Se distribuye la mezcla en tubos para congelación (0,7 ml por tubo) y se los colocan a - 70 °C o en nitrógeno líquido a - 196 °C.
- 7) Se anotan, en el tubo y en el cuaderno de congelación, la fecha, la cepa de *Plasmodium* y el número de cuaderno de congelación.
- 8) Este proceso posibilita realizar varios experimentos a partir del mismo lote de sangre congelada.

### Descongelación de las cepas a partir de sangre infectada congelada

- 1) Sacar los tubos del nitrógeno líquido, anotar en el cuaderno de congelación y colocar los tubos en baño-maría a 37 °C o descongelar en la palma de la mano.
- 2) Anotar en el cuaderno de congelación.
- 3) Inyectar inmediatamente a los ratones (0,1 ml por ratón por vía intraperitoneal).

### Mantenimiento de la cepa (pase de un ratón a otro)

- 1) Tomar una gota de la vena de la cola de los ratones infectados y realizar un frotis (Figura 11).
- 2) Proceder a la tinción (como descrito en el párrafo “Método visual” del Capítulo 2 de la Primera Parte: “Evaluación de la actividad antimalárica *in vitro* de productos naturales o de síntesis”).
- 3) Observar al microscopio con el objetivo de inmersión (x 100) y elegir al ratón con una parasitemia elevada.
- 4) Colocar algunas gotas de sangre infectada (parasitemia al 20%) directamente de la cola hacia un tubo de hemólisis con 1 ml de suero fisiológico.
- 5) Inyectar a 5 ratones sanos 0,1 ml de suspensión globular por vía intraperitoneal.
- 6) Poner los ratones infectados en cubetas previamente identificadas con el nombre de la cepa y el día de la inoculación.
- 7) Anotar todo en el cuaderno del laboratorio.

Este pase de ratón infectado hacia ratón sano se realiza cada 5 días.

### Conteo de glóbulos rojos parasitados

- 1) El mismo día de realizar el conteo se prepara el colorante Giemsa (ver las Tablas 5 y 6).
- 2) Cortar la cola del ratón con una tijera a más o menos 3 mm del extremo, obtener una gota de sangre sobre el porta-objetos y realizar el frotis respectivo.
- 3) Proceder a la tinción (como descrito en el párrafo “Método visual” del Capítulo 2 de la Primera Parte: “Evaluación de la actividad antimalárica *in vitro* de productos naturales o de síntesis”).
- 4) Leer al microscopio con lente de inmersión x 100.

El conteo se realiza sobre 1000 glóbulos rojos (10 campos). El resultado se expresa en porcentaje de glóbulos rojos parasitados (Tabla 14).

**Tabla 14**  
*Cálculo del porcentaje de parasitemia*

$$\frac{\text{GR infectados}}{\text{GR sanos} + \text{GR infectados}} \times 100 = \% \text{ de parasitemia}$$



### Capítulo 3

## EVALUACION DE LA ACTIVIDAD ANTIMALARICA *IN VIVO* DE PRODUCTOS NATURALES O DE SINTESIS

### “TEST SUPRESIVO DE 4 DÍAS” (O “TEST DE PETERS”)

#### FUNDAMENTO

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.

Los grupos que presentan parasitemia inferior a la del grupo control (que recibe el solvente de la droga) son seguidos por un cierto tiempo (varios días o también semanas) hasta que la parasitemia llegue a ser la misma del grupo control.

#### MATERIAL

##### Material biológico

- ◇ Ratones machos, sanos, tipo Swiss (peso: 18-22 g).
- ◇ Sangre de ratón infectada por una de las cepas citadas (generalmente se trabaja con *Plasmodium berghei*).



### Material de plástico, vidrio y otros

- ◇ Cámara de Malassez, Neubauer o Thoma.
- ◇ Guantes.
- ◇ Jeringas de 1 ml.
- ◇ Pipeta a numeración.
- ◇ Pipetas Gilson de 200  $\mu$ l y de 1000  $\mu$ l.
- ◇ Porta-objetos.
- ◇ Tijeras.
- ◇ Tubos de hemólisis.
- ◇ Tubos de plástico de 15 ml.

### Reactivos químicos

- ◇ Agua destilada desionizada.
- ◇ Cloroformo.
- ◇ Colorante Giemsa.
- ◇ Dimetilsulfóxido.
- ◇ Etanol.
- ◇ Glicerol.
- ◇ Heparina sódica de 5000 UI/ml.
- ◇ Metanol.
- ◇ Productos a evaluar.
- ◇ Tween.

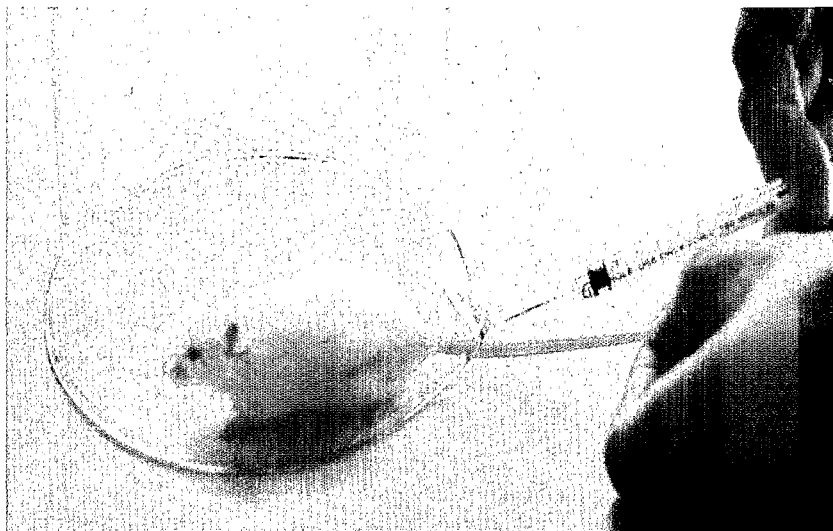
### Equipo

- ◇ Bioterio.
- ◇ Microscopio.
- ◇ Sonicador.
- ◇ Vortex.

### METODO

A partir de ratones parasitados por una de las cepas citadas, los ratones sanos son infectados por vía intraperitoneal con 100  $\mu$ l de sangre cuya concentración de parásitos es de  $1 \times 10^7$  parásitos/ml. Para una mejor reproductibilidad, puede ser recomendable proceder a la inyección de los parásitos por vía intravenosa (Foto 8).

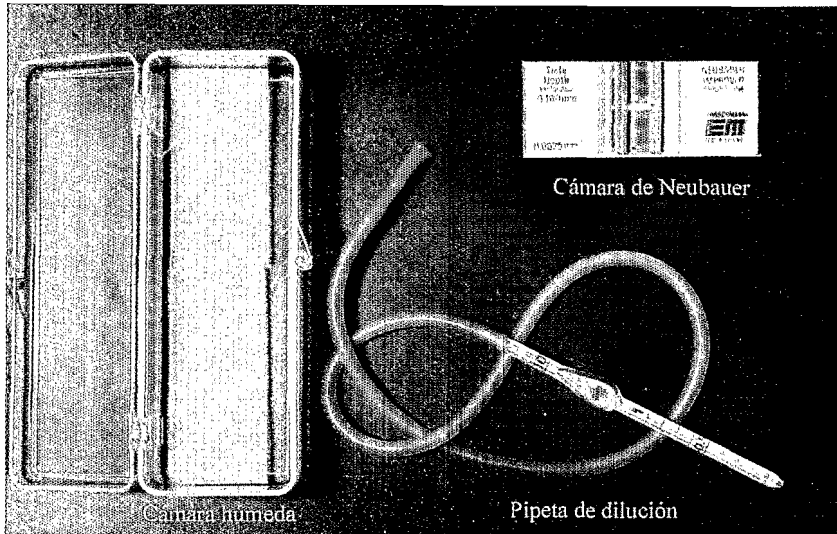
**Foto 8**  
*Inyección intravenosa*



**Obtención de la cantidad requerida de glóbulos rojos parasitados/ml**

- 1) Se realiza un frotis (Figura 11) a partir de una gota de sangre del extremo de la cola del ratón que contiene la cepa.
- 2) Durante la coloración (45 min), se carga una pipeta numerada (Foto 9) con sangre hasta alcanzar la graduación 2, y con suero fisiológico hasta la graduación 10 de manera que se obtenga una dilución de 1/200.
- 3) Homogeneizar y dejar en reposo durante 10 minutos en cámara húmeda (Foto 9).
- 4) Homogeneizar el contenido de la pipeta a numeración haciéndola girar horizontalmente y suavemente por 30 segundos.
- 5) Eliminar 5 gotas que correspondan al líquido de dilución que se quedó en la parte capilar.
- 6) Poner la extremidad de la pipeta inclinada a nivel del espacio situado entre la plataforma de la cámara y el porta-objetos. La cámara se llena de inmediato por capilaridad sin burbujas de aire.
- 7) Dejar la cámara sobre un plano de trabajo horizontal durante 10 minutos para que sedimenten los glóbulos rojos.

**Foto 9**  
*Material de numeración*



**Conteo de glóbulos rojos**

*Lectura con la cámara de Thoma*

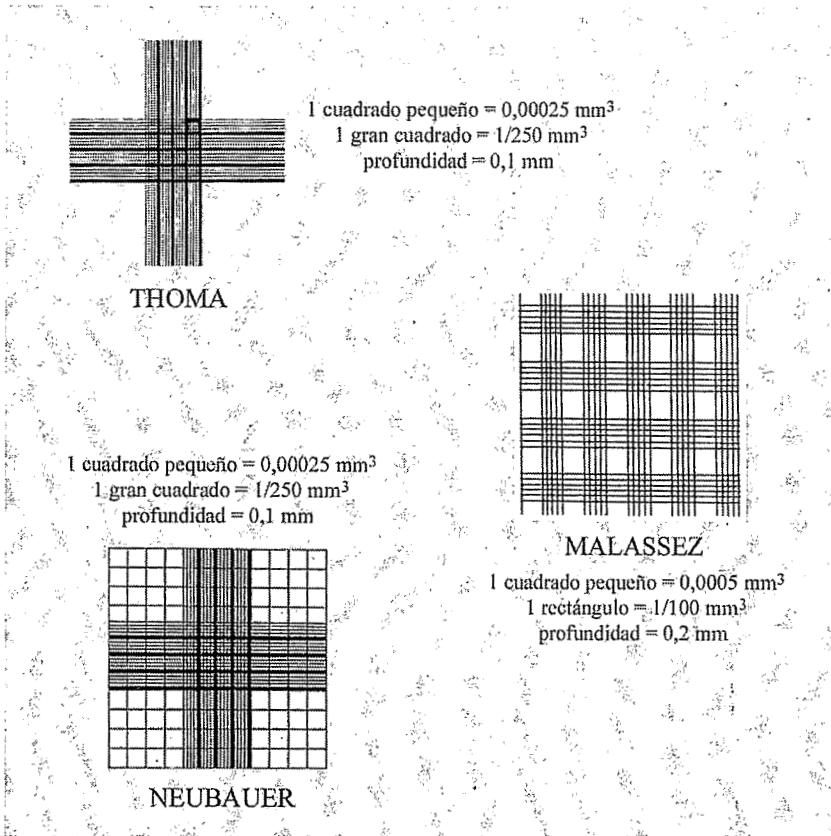
- 1) Con el objetivo x 40, efectuar el conteo de los glóbulos rojos en cuatro grandes cuadrados (Figura 21).
- 2) Calcular el promedio ( $m$ ).
- 3) Cada cuadrado tiene un volumen de  $1/250 \text{ mm}^3$  ( $v$ ).

**Tabla 15**

*Ejemplo de conteo con cámara de Thoma*

Si  $m = 100$  y si la dilución es de 200 ( $d$ )  
el número de glóbulos rojos por  $\text{mm}^3$  ( $\mu\text{l}$ ) es de  $100 \times 250 \times 200 = 5.000.000$

**Figura 21**  
Cámaras de conteo



*Lectura con la cámara de Neubauer*

- 1) Con el objetivo x 40, contar los glóbulos rojos en cuatro cuadrados (Figura 21).
- 2) Calcular el promedio ( $m$ ).
- 3) Cada cuadrado tiene un volumen de  $1/250 \text{ mm}^3$  ( $v$ ).

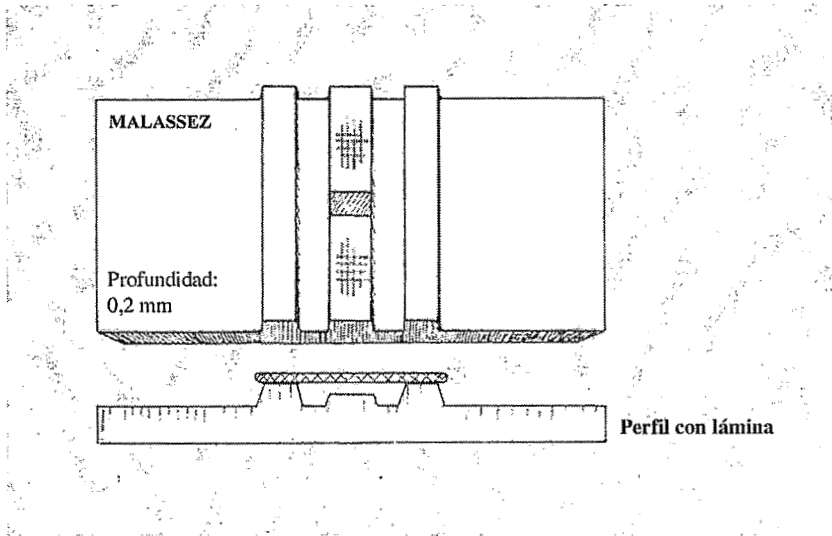
**Tabla 16**  
*Ejemplo de conteo con cámara de Neubauer*

Si  $m = 100$  y si la dilución es de  $200$  ( $d$ )  
el número de glóbulos rojos por  $\text{mm}^3$  es de  $100 \times 250 \times 200 = 5.000.000$

*Lectura con la cámara de Malassez*

- 1) Con el objetivo x 40, efectuar el conteo de los glóbulos rojos en cuatro grandes rectángulos (Figuras 21 y 22).
- 2) Calcular el promedio ( $m$ ).
- 3) Cada rectángulo tiene un volumen de  $1/100 \text{ mm}^3$  ( $v$ ).

**Figura 22**  
*Cámara de Malassez*



**Tabla 17**  
*Ejemplo de conteo con cámara de Malassez*

Si  $m = 250$  y si la dilución es de 200 ( $d$ )  
el número de glóbulos rojos por  $\text{mm}^3$  es de  $250 \times 100 \times 200 = 5.000.000$

*Cálculos para preparar la suspensión de glóbulos parasitados para infectar los ratones (lectura con cámara de Thoma)*

Para infectar el conjunto de ratones que recibirán los tratamientos con los productos a evaluar o con los solventes (grupos controles), se debe:

- 1) definir el número de parásitos requeridos para iniciar la infección;
- 2) contar el número de parásitos existentes en la sangre del ratón donador;
- 3) determinar la cantidad de sangre a tomar;
- 4) ajustar el volumen de sangre parasitada para la infección de los ratones tratados.

Con este propósito, se deben seguir los pasos descritos en las Tablas 18, 19, 20 y 21. Se recomienda de calcular siempre las cantidades para un grupo suplementario virtual para reparar las pérdidas producidas a lo largo de la manipulación.

**Tabla 18**

*Número de parásitos requeridos*

$10^7$  parásitos x número de ratones por grupo x número de grupos = A

*Ejemplo:*  $10^7$  parásitos x 5 ratones por grupo x 5 grupos =  $25 \times 10^7$

**Tabla 19**

*Número de parásitos/ml de sangre de ratón donador*

% de parasitemia (evaluado con frotis) x promedio de los GR (contados en 4 cuadrados) x 250  
(volumen de 1 cuadrado) x 200 (factor de dilución de la sangre)  
x 1000 (para llegar a 1 ml) = B

*Ejemplo:*  $0,32 \times 84 \times 250 \times 200 \times 1000 = 134,40 \times 10^7$

**Tabla 20**

*Volumen de sangre infectada a tomar*

B..... 1 ml

A..... C ml

*Ejemplo:*  $C = A/B = 25/134,4 = 0,186 \text{ ml} = 186 \mu\text{l}$

**Tabla 21**

*Dilución de sangre obtenida*

Volumen de la dilución de sangre administrada por ratón  
x número de ratones por grupo x número de grupos = D

*Ejemplo:*  $100 \mu\text{l} \times 5 \times 5 = 2500 \mu\text{l} = 2,5 \text{ ml}$

Volumen de suero fisiológico para la dilución = D — C

*Ejemplo:*  $2,5 - 0,186 = 2,314 \text{ ml}$

*Cálculos para preparar las drogas  
para el tratamiento de los ratones infectados*

Para preparar las suspensiones de drogas que serán administradas a los ratones cada día, durante un período de cuatro días, se debe:

- 1) determinar el volumen total de solvente que será administrado por cada producto;
- 2) calcular la cantidad de producto a administrar según la dosis que se pretenda evaluar;
- 3) definir la vía de administración.

Para alcanzar este propósito, se deben seguir los pasos descritos en las Tablas 22 y 23 (diluir las drogas en DMSO, etanol o suero fisiológico de acuerdo a la solubilidad del producto). Calcular siempre las cantidades para un día suplementario virtual para reparar las pérdidas de productos producidas a lo largo de la manipulación (4 días + 1).

**Tabla 22**

*Volumen de solvente para la preparación de las drogas*

$$V = \text{volumen de solvente administrado a cada ratón} \\ \times \text{número de ratones} \times \text{número de días}$$

*Ejemplo:  $100 \mu\text{l} \times 5 \times 5 = 2500 \mu\text{l} = 2,5 \text{ ml}$*

**Tabla 23**

*Preparación de la suspensión de droga*

**Regla de 3**

$$D \dots\dots\dots 1000 \text{ g}$$

$$d \dots\dots\dots P$$

$$d = \frac{D \times P}{1000}$$

**Cantidad de producto que se debe pesar**

*d x número de ratones x número de días de tratamiento (+1), a disolver en V*

*Ejemplo: dosis requerida 250 mg/kg*

$$0,25 \text{ g} \dots\dots\dots 1000 \text{ g}$$

$$d \dots\dots\dots 18,36 \text{ g}$$

$$4,59 \times 5 \times 5 = 0,1148 \text{ g} = 114,8 \text{ mg, a disolver en } 2,5 \text{ ml}$$

- D = dosis en g requerida por kg;  
d = dosis calculada por ratón;  
P = promedio del peso de los ratones.

## Administración de las drogas

- 1) Dos horas después de la infección, se procede al tratamiento de los ratones con los productos en estudio.
- 2) La administración se realiza por vía intravenosa (en la vena caudal, previamente calentada con agua caliente o con un foco de 100 W para obtener una vasodilatación), intraperitoneal, subcutánea o también por vía oral dependiendo del protocolo de experimentación, durante 4 días consecutivos y siempre a la misma hora.
- 3) El quinto día se procede a la realización de los frotis (Figura 11) de cada uno de los ratones para su posterior conteo óptico y obtención del porcentaje de inhibición, con la fórmula indicada en la Tabla 24.

**Tabla 24**  
*Porcentaje de inhibición*

$$\frac{\text{Parasitemia del GT} - \text{Parasitemia del GTr}}{\text{Parasitemia del GT}} \times 100 = \% \text{ de inhibición}$$

GT = Grupo testigo;  
GTr = Grupo tratado.

La determinación de la  $CI_{50}$  se realiza con los métodos descritos en el párrafo "Determinación de la  $CI_{50}$ " en el Capítulo 2 ("Evaluación de la actividad antimalárica *in vitro* de productos naturales o de síntesis"), Primera Parte. Las dosis eficaces 90 reportadas contra *Plasmodium berghei* para algunas moléculas antimaláricas clásicas (en mg/kg x 4 días) son las siguientes: cloroquina = 3, mefloquina = 4,6, primaquina = 4,8, quinina = 120.

## Referencias

- Peters, W. (1970) *Chemotherapy and drug resistance in malaria*. Academic Press, New York.
- 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.



## "TESTRANE"

### FUNDAMENTO

El "Test Rane" es el test más sencillo para la determinación de la actividad esquizotónica *in vivo* de una droga. Se comparan la mortalidad de los grupos de ratones tratados por las drogas y la mortalidad de los grupos que reciben los solventes.

### MATERIAL

#### Material biológico

- ◇ Ratones machos, sanos, tipo Swiss (peso: 18-22 g).
- ◇ Sangre de ratón infectada por una de las cepas citadas.

#### Material de plástico, vidrio y otros

- ◇ Cámara de Malassez, Neubauer o Thoma.
- ◇ Guantes.
- ◇ Jeringas de 1 ml.
- ◇ Pipeta a numeración.
- ◇ Pipetas Gilson de 200  $\mu$ l y de 1000  $\mu$ l.
- ◇ Porta-objetos.
- ◇ Tijeras.
- ◇ Tubos de hemólisis.
- ◇ Tubos de plástico de 15 ml.

#### Reactivos químicos

- ◇ Agua destilada desionizada.
- ◇ Cloroformo.
- ◇ Colorante Giemsa.
- ◇ Dimetilsulfóxido.
- ◇ Glicerol.
- ◇ Heparina sódica de 5000 UI/ml.
- ◇ Metanol.
- ◇ Productos a evaluar.
- ◇ Tween.

#### Equipo

- ◇ Bioterio.
- ◇ Microscopio.
- ◇ Sonicador.
- ◇ Vortex.

## METODO

Este test consiste en inocular los ratones por vía intraperitoneal con  $10^6$  parásitos el primer día D0 (ver el parágrafo "Obtención de la cantidad requerida de glóbulos rojos parasitados/ml" en el "Test supresivo de 4 días" en este mismo capítulo).

Las drogas a evaluar (ver el parágrafo "Cálculos para preparar las drogas para el tratamiento de los ratones infectados" en el "Test supresivo de 4 días" en este mismo capítulo) son administradas una sola vez a D3 (en el test original se utilizaban 4 dosis: 80 mg/kg, 160 mg/kg, 320 mg/kg y 640 mg/kg).

Los animales son observados cada día y se evalúa la mortalidad.

Una droga es considerada activa cuando el tiempo de supervivencia del grupo tratado es el doble de lo del grupo control (tratado con el solvente de la droga).

Se puede determinar la dosis mínima eficaz bajando la concentración hasta que desaparezca la diferencia con el grupo control. Los animales que sobreviven más de 60 días, son considerados curados.

Este test puede ser utilizado como un test de preselección de las drogas, antes de usar el "Test supresivo de 4 días".

## Referencias

- Ager, J.R., Peters, W. and Richards, W.H.G. (1984) "Rodent malaria models" in *Antimalarial drugs I. Biological background, experimental methods, and drug resistance*. Handbook of Experimental Pharmacology, vol. 68, Springer-Verlag, Berlin, 1, 225-264.
- Makinde, J.M., Awe, S.O. and Salako, L.A. (1994) Seasonal variation in the antimalarial activity of *Morinda lucida* on *Plasmodium berghei berghei* in mice. *Fitoterapia*, 65, 2, 124-130.
- Makinde, J.M., Amusan, O.O.G. and Adesogan, E.K. (1990) The antimalarial activity of chromatographic fractions of *Spathodea campanulata* stem bark extracts against *Plasmodium berghei berghei* in mice. *Phytotherapy Research*, 4, 2, 53-56.
- Peters, W. and Robinson, B.L. (1999) *Malaria in handbook of animal models of infection*, Academic Press, London.

## ESTUDIO DE LA INTERACCION DE DROGAS *IN VIVO*

### FUNDAMENTO

Las bases teóricas del estudio sobre la interacción de drogas *in vivo* son las mismas descritas en el parágrafo “Estudio de la interacción de drogas *in vitro*”, Capítulo 2, Primera Parte.

### MATERIAL

#### Material biológico

- ◇ Ratones machos, sanos, tipo Swiss (peso: 18-22 g).
- ◇ Sangre de ratón infectada por una de las cepas citadas (generalmente se trabaja con *Plasmodium berghei*).

#### Material de plástico, vidrio y otros

- ◇ Cámara de Malassez, Neubauer o Thoma.
- ◇ Guantes.
- ◇ Jeringas de 1 ml.
- ◇ Pipeta a numeración.
- ◇ Pipetas Gilson de 200  $\mu$ l y de 1000  $\mu$ l.
- ◇ Porta-objetos.
- ◇ Tijeras.
- ◇ Tubos de hemólisis.
- ◇ Tubos de plástico de 15 ml.

#### Reactivos químicos

- ◇ Agua destilada desionizada.
- ◇ Cloroformo.
- ◇ Colorante Giemsa.
- ◇ Dimetilsulfóxido.
- ◇ Etanol.
- ◇ Glicerol.
- ◇ Heparina sódica de 5000 UI/ml.
- ◇ Metanol.
- ◇ Productos a evaluar.
- ◇ Tween.

#### Equipo

- ◇ Bioterio.
- ◇ Microscopio.
- ◇ Sonicator.
- ◇ Vortex.

## METODO

El método sigue los mismos pasos descritos en el párrafo “Métodos particulares”, Capítulo 2 (“Evaluación de la actividad antimalárica *in vitro* de productos naturales o de síntesis”), Primera Parte.

- 1) Se prepara un cuadro con las concentraciones de los productos a evaluar.
- 2) Los ratones son infectados según el protocolo descrito en el Capítulo 3 de la Segunda Parte (“Evaluación de la actividad antimalárica *in vivo* de productos naturales o de síntesis”) y son tratados con la combinación de drogas.
- 3) Se determinan las  $CI_{50}$  respectivas y se las comparan dibujando los isobogramas; como descrito en el párrafo “Método de los isobogramas”, sección “Métodos particulares”, Capítulo 2 (“Evaluación de la actividad antimalárica *in vitro* de productos naturales o de síntesis”) de la Primera Parte. Otro método consiste en administrar los dos productos (conjuntamente, en lugares diferentes del animal) con dosis inferiores a sus  $ED_{50}$  o  $ED_{90}$  respectivas. Los resultados son reportados en isobogramas donde las dosis individuales de cada combinación son divididas por las  $ED_{50}$  o  $ED_{90}$  respectivas de las drogas solas correspondientes.
- 4) Si uno de los 2 productos no tiene actividad propia, se dibuja un gráfico según el Índice de Incremento de Actividad (ver el párrafo “Método del cálculo del IIA”, en “Métodos particulares”, Capítulo 2, Primera Parte).

## ANALISIS DE LOS RESULTADOS

- ◊ Idéntica al análisis descrita en el párrafo “Método de los isobogramas”, sección “Métodos particulares”, Capítulo 2, Primera Parte.

## Referencias

- Chawira, A.N., Warhurst, D.C., Robinson, B.L. and Peters, W. (1987) The effect of combinations of qinghaosu (artemisinin) with standard antimalarial drugs in the suppressive treatment of malaria in mice. *Transaction of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 81, 554-58.
- Peters, W., Ekong, R., Robinson, B.L., Warhurst, D.C. and Xing-Qing, P. (1990) The chemotherapy of rodent malaria. XLV. Reversal of chloroquine resistance in rodent and human *Plasmodium* by antihistaminic agents. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, 86, 5, 455-65.
- Peters, W. and Robinson, B.L. (1991) The chemotherapy of rodent malaria. XLVI. Reversal of mefloquine resistance in rodent *Plasmodium*. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, 85, 1, 5-10.
- Peters, W. Robinson, B.L. and Milhous, W.K. (1993) The chemotherapy of rodent malaria. LI. Studies on a new 8-aminoquinoline, WR 238,605. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, 87, 6, 547-552.
- Peters, W. and Robinson, B.L. (1997) The chemotherapy of rodent malaria. LV. Interactions between pyronaridine and artemisinin. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, 91, 2, 141-45.
- Peters, W. and Robinson, B.L. (1999) *Malaria in handbook of animal models of infection*, Academic Press, London.



## Capítulo 4

### DETERMINACION DEL ESTADIO SENSIBLE

#### FUNDAMENTO

La respuesta de las diferentes especies plasmodiales a las drogas varía según la duración de sus ciclos eritrocitarios. Cada compuesto activo afecta un estadio particular del ciclo de vida del parásito. En consecuencia, la sensibilidad de una especie a una droga dependerá del estadio presente al momento del tratamiento. Por lo tanto, las especies que tienen un desarrollo sincrónico en la sangre son más sensibles que las especies asincrónicas.

Las nociones de crónobiología permiten de determinar cual es, o cuales son, los estadios intraeritrocitarios sensibles a una droga.

En la práctica, se analiza el impacto sobre el desarrollo parasitario de un producto administrado cuando un estadio es predominante. Tal determinación permite la optimización del tratamiento, administrando el principio activo en un horario determinado. Es la base de la cronoterapia.

Para tal propósito, se debe conocer la morfología de los estadios y definir un índice de sincronización.

Luego, dos métodos son utilizados para sincronizar artificialmente los estadios intraeritrocitarios: la "Técnica del Percoll®-glucosa" y la "Técnica de la sangre congelada".

Finalmente, para medir el impacto de la droga, dos otros métodos son propuestos: la "Evaluación del período prepatente" y el "Seguimiento de la fórmula parasitaria".

## DEFINICION DE LOS ESTADIOS ERITROCITARIOS

### *Anillo*

El anillo (A) es la resultante de la transformación del merozoito al interno del glóbulo rojo del huésped. Generalmente se sitúa en posición central o sobre el borde interno del eritrocito. De todos los estadios intraeritrocitarios, es el más pequeño y a menudo se halla situado en la periferia interna del glóbulo rojo. Presenta una delgada banda de citoplasma (color azul con Giemsa) que envuelve la vacúola alimenticia.

### *Trofozoito joven.*

Más grande que el estadio anterior, el trofozoito joven (TJ) presenta una banda citoplásmica más larga, una vacúola más importante pero siempre un sólo núcleo. No presenta pigmento y si lo tiene, este es muy delgado.

### *Trofozoito maduro*

Más voluminoso aún, el estadio trofozoito maduro (TM) ocupa aproximadamente la mitad del glóbulo rojo. Núcleo (rojo, con Giemsa) y citoplasma aumentan de tamaño. El pigmento es abundantemente, denso, mientras que se observa una regresión de la vacúola .

### *Trofozoito viejo*

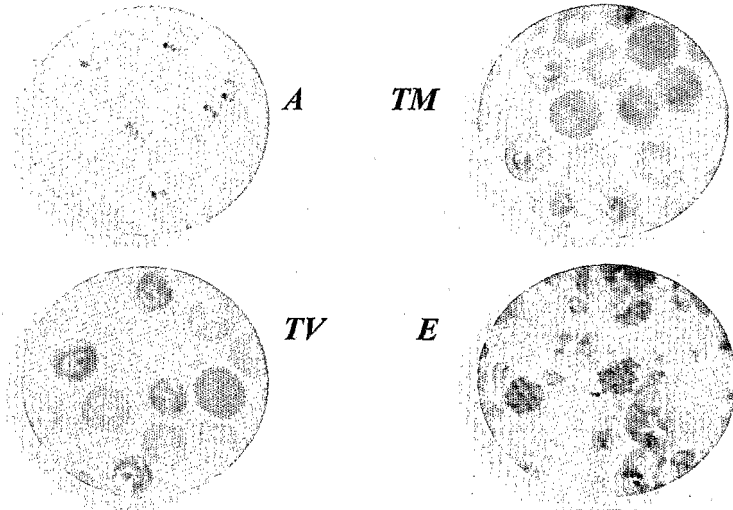
El trofozoito viejo (TV) rebasa la mitad del glóbulo rojo. La pigmentación es muy importante así como la densidad de su citoplasma. La vacúola es muy reducida y está siempre presente.

### *Esquizonte*

El esquizonte (E) es la forma plurinucleada que concluye un ciclo eritrocitario. El número de nuevos merozoitos formados varía según la especie. Los glóbulos rojos infectados por esquizontes o trofozoitos viejos son a menudo secuestrados en los capilares profundos.

**Foto 10**

*Estadios eritrocitarios de Plasmodium vinckei petteri*



**INDICE DE SINCRONIZACION**

El índice de sincronización (*IS*) es la relación de la desviación estándar del porcentaje de cada estadio, en un tiempo dado, sobre la desviación estándar del porcentaje (%) de cada estadio de una infección sincrónica a 100%. Este índice varía entre 0 (*asincronismo*) y 1 (*sincronismo total*), y se calcula a partir de las fórmulas parasitarias y permite evaluar el grado de sincronización.

Con el fin de determinar los porcentajes de cada estadio, se procederá a contar 100 parásitos en cada frotis. El índice corresponde a la concentración de parásitos a un tiempo dado utilizando la fórmula indicada en la Figura 23 (ver también las Tablas 25 y 26).



**Figura 23**  
Fórmula del índice de sincronización

$$IS = \frac{\sqrt{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}}{50}$$

n: número de estadios eritrocitarios (A, Tj, Tm, Tv + E) = 4  
50: desviación estándar de una infección sincrónica a 100% considerando 4 estadios  
x<sub>i</sub>: % del estadio;  
x: promedio del porcentaje de cada estadio.

## MÉTODOS DE SINCRONIZACIÓN

### *Sincronización con la técnica del Percoll®-glucosa*

#### FUNDAMENTO

En un medio hipertónico el glóbulo rojo no infectado se contrae, su densidad se incrementa y, si está sometido a la acción de una centrífuga, su velocidad de sedimentación aumenta. El fenómeno es idéntico en el eritrocito infectado; pero, en este caso, debido a la permeabilización membranaria, el glóbulo vuelve a su forma inicial y sedimenta según el estadio parasitario y las moléculas presentes en el medio.

En el caso de glóbulos rojos infectados por *P. falciparum* depositados en un medio enriquecido en sorbitol, la entrada de sorbitol restablece la tonicidad de los glóbulos más velozmente si el parásito es viejo. Por lo tanto, los eritrocitos infectados por estadios jóvenes que no permeabilizaron intensamente la membrana globular se encuentran en el fondo del tubo con los glóbulos no infectados, mientras los glóbulos que contienen formas viejas se estabilizan en la superficie del medio.

De hecho, es importante escoger una suspensión de productos que no penetren, o que penetren muy poco al interior de los eritrocitos sanos.

La D-glucosa está más adaptada a la separación de los *Plasmodia* de muridos porque los eritrocitos de roedores son mucho menos permeables a las aldohexosas que a los polihidroxialcoles.

El Percoll® es una suspensión de polivinilpirolidona que presenta la ventaja de ser osmóticamente neutra, no causa daños a las células y no modifica la infectividad de los parásitos. Por lo tanto, es un medio de elección para preparar suspensiones de densidad determinada para la separación de glóbulos infectados por acción de una centrifuga, según el estadio de desarrollo del parásito.

## MATERIAL

### Material biológico

- ◇ Ratones machos tipo Swiss, infectados por *Plasmodium yoelii* preferiblemente.

### Material de plástico, vidrio y otros

- ◇ Frascos de cultivo 25 cm<sup>2</sup> (50 ml).
- ◇ Frascos de cultivo 75 cm<sup>2</sup> (150 ml).
- ◇ Jeringas tipo tuberculina de 1 ml.
- ◇ Matraz Erlenmeyer 1000 ml.
- ◇ Micropipetas de 200-1000  $\mu$ l.
- ◇ Pipetas de 10 ml.
- ◇ Pipetas Pasteur.
- ◇ Porta-objetos.
- ◇ Puntas azules 200-1000  $\mu$ l.
- ◇ Tubos de plástico de 10 ml.
- ◇ Tubos tipo Eppendorf® de 1,5 ml.
- ◇ Tubos tipo Nalgène® blandos de 10 ml.

### Reactivos químicos

- ◇ Agua bidestilada desionizada.
- ◇ Cloroformo.
- ◇ Colorante Giemsa.
- ◇ D-glucosa.
- ◇ Heparina sódica de 5000 UI/ml.
- ◇ Percoll®.
- ◇ Suero fisiológico (NaCl 9 ‰).
- ◇ Tampón fosfato (PBS).

## Equipo

- ◇ Agitador magnético.
- ◇ Baño-maría.
- ◇ Bioterio.
- ◇ Centrifuga.
- ◇ Microscopio.

## METODO

### Preparación del PBS 10X (*Phosphate Buffer Saline 10-veces concentrado*)

1 g de KCl  
1 g de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$   
40 g de NaCl  
14,3 g de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$   
0,5 g de  $\text{MgCl}_2 \cdot (6 \text{ H}_2\text{O})$ , o 0,250 g de  $\text{MgCl}_2$  anhidro  
500 ml de agua bidestilada.

- 1) En un recipiente de 1000 ml pesar todos los componentes, luego añadir 500 ml de agua destilada.
- 2) Disolver con un agitador magnético.
- 3) Distribuir en frascos de 150 ml (conservar a 4 °C o congelar).

Para obtener un *PBS normal*, diluir el PBS 10X al décimo, por ejemplo diluir 5 ml de PBS 10X en 45 ml de agua bidestilada.

### Preparación del PBS-G 10X (*PBS-glucosa 10 veces concentrado*)

- 1) Añadir tres moles de D-glucosa para cada litro de PBS 10X (540 g en un litro).
- 2) En un recipiente de 100 ml pesar 27 g de D-glucosa.
- 3) Añadir 50 ml de PBS 10X, luego disolver con la ayuda de un agitador magnético.
- 4) Distribuir en frascos de 50 ml.

Para obtener un *PBS-G normal*, diluir el PBS-G 10X al décimo, por ejemplo diluir 5 ml de PBS-G 10X en 45 ml de agua bidestilada.

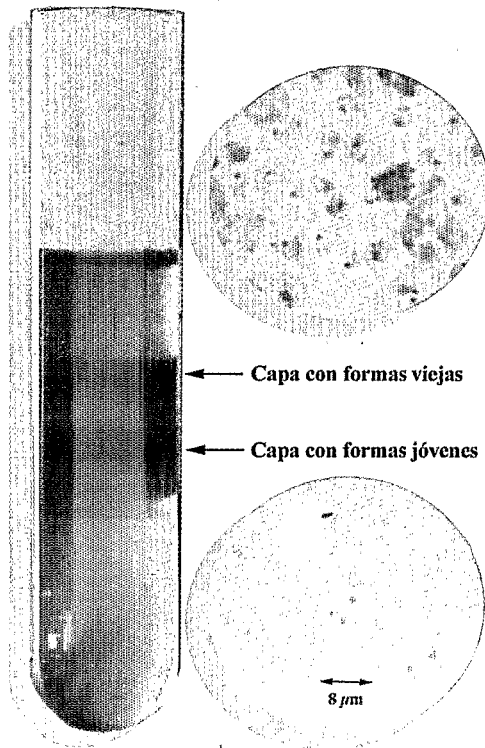
### Preparación de las muestras de sangre parasitada

- 1) Cuando la parasitemia de los ratones (infectados con sangre congelada o por pase de ratón a ratón) llega a 30%, se saca en un tubo de plástico de 10 ml previamente heparinizado (1 gota de heparina) la sangre de todos los ratones por punción retro-orbitaria con una pipeta Pasteur que contenga una gota de heparina.
- 2) También se puede obtener la sangre por punción cardíaca con una jeringa de 1 ml heparinizada, previo adormecimiento de los ratones con cloroformo.
- 3) Se centrifuga el *pool* de sangre por 5 minutos a 1200 g, y se lo lava con tampón PBS normal para desechar el plasma, las plaquetas y los leucocitos.
- 4) Se recupera el sedimento y se lo diluye en 3 veces su volumen de PBS-G.

## Preparación del Percoll®-glucosa

- 1) Obtener una suspensión al 70% mezclando 7 volúmenes de Percoll® con 1 volumen de PBS 10X enriquecido con glucosa.
- 2) Completar la suspensión hasta 10 volúmenes con agua bidestilada.
- 3) Depositar 5 ml de solución al 70% en un tubo de plástico blando tipo Nalgène® de 10 ml (Foto 11).
- 4) Colocar encima la suspensión de glóbulos rojos infectados.
- 5) Centrifugar los tubos a 30.000 g durante 7 minutos a 28 °C (o a temperatura ambiente), en un rotor de ángulo fijo.
- 6) Los parásitos se separan en dos bandas distintas: la capa superior contiene los trofozoitos maduros, viejos y los esquizontes, mientras la capa inferior contiene los anillos, los trofozoitos jóvenes y los glóbulos no infectados.

**Foto 11**  
*Separación por Percoll®*



### Extracción de las fracciones

La fracción que contiene las formas requeridas se aspira directamente a través la pared del tubo blando con la ayuda de una jeringa. Luego se la lava 2 veces con PBS y se la centrifuga por 5 minutos a 1200 g. Se realiza un frotis (Figura 11) con el sedimento para tinción al colorante Giemsa (ver el parágrafo "Método visual", Capítulo 2, Primera Parte).

### Infección y seguimiento de la fórmula parasitaria

El sedimento se resuspende en 1 volumen de suero fisiológico y se lo inyecta por la vena caudal del ratón (hasta 0,5 ml por ratón). Se evalúa la parasitemia 1 hora más tarde y posteriormente cada 3 horas. Se puede seguir la fórmula parasitaria, tal como descrito en la Tabla 25.

**Tabla 25**  
*Seguimiento del desarrollo de la fórmula parasitaria  
en un ratón infectado por P. yoelii nigeriensis sincronizado*

<b>Hora</b> .....	13.....	16.....	19.....	22.....	1.....	4.....	7.....	10.....
<b>Parasitemia</b> .....	0,6.....	0,6.....	0,6.....	0,6.....	0,7.....	0,8.....	1,9.....	2,7.....
<b>A (%)</b> .....	37.....	22.....	10.....	0.....	0.....	6.....	75.....	32.....
<b>TJ (%)</b> .....	63.....	68.....	52.....	6.....	0.....	6.....	11.....	56.....
<b>TM (%)</b> .....	0.....	10.....	38.....	75.....	33.....	4.....	1.....	8.....
<b>TV+E (%)</b> .....	0.....	0.....	0.....	19.....	67.....	84.....	13.....	4.....
<b>IS</b> .....	0,62.....	0,60.....	0,48.....	0,69.....	0,64.....	0,79.....	0,67.....	0,48.....

### Referencias

- Deharo, E., Gautret, Ph., Ginsburg, H., Chabaud, A.G. and Landau, I. (1994) Synchronization of *Plasmodium yoelii nigeriensis* and *P. yoelii killicki* infection in the mouse by means of Percoll®-glucose gradient stage fractionation: determination of the duration of the schizogonic cycle. *Parasitology Research*, 80, 159-164.
- Ginsburg, H. (1990) Alterations caused by the intra-erythrocytic malaria parasite in the permeability of its host cell membrane. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 95, 31-39.
- Ginsburg, H., Landau, I., Baccam, D. and Mazier, D. (1987) Fractionation of malarious blood according to parasite developmental stage, using a Percoll®-sorbitol gradient. *Annales de Parasitologie Humaine Comparée*, 62, 418-425.
- Kramer, K.J., Kan, S.C. and Siddiqui, W.A. (1982) Concentration of *Plasmodium falciparum* infected erythrocytes by density gradient centrifugation in Percoll®. *The Journal of Parasitology*, 68, 336-337.
- Kutner, S., Baruch, D., Ginsburg, H. and Cabantchik, Z.I. (1982) Alterations in membrane permeability of malaria-infected human erythrocytes are related to the growth stage of the parasite. *Biochimica et Biophysica Acta*, 687, 113-117.
- Kutner, S., Breuer, W.V. and Ginsburg, H. (1985) Characterization of permeation pathways in the plasma membrane of human erythrocytes infected with early stages of *Plasmodium falciparum*: association with parasite development. *Journal of Cellular Physiology*, 125, 521-527.

## *Sincronización con la técnica de la sangre congelada*

### FUNDAMENTO

Se realiza con la cepa *P. vinckei petteri* cuyo sincronismo puede ser incrementado congelando la sangre infectada, cuando las formas viejas son predominantes, y luego descongelando rápidamente la sangre e inyectándola inmediatamente. Así sólo los merozoitos sobreviven, y penetran velozmente en los glóbulos rojos del ratón inoculado.

### MATERIAL

#### Material biológico

- ◇ Ratones machos, sanos, tipo Swiss (peso: 18-22 g).
- ◇ Sangre de ratón infectada por una de las cepas citadas.

#### Material de plástico, vidrio y otros

- ◇ Cámara de Malassez, Neubauer o Thoma.
- ◇ Guantes.
- ◇ Jeringas de 1 ml.
- ◇ Pipeta a numeración.
- ◇ Pipetas Gilson de 200  $\mu$ l y de 1000  $\mu$ l.
- ◇ Porta-objetos.
- ◇ Tijeras.
- ◇ Tubos de hemólisis.
- ◇ Tubos de plástico de 15 ml.

#### Reactivos químicos

- ◇ Agua destilada desionizada.
- ◇ Cloroformo.
- ◇ Colorante Giemsa.
- ◇ Dimetilsulfóxido.
- ◇ Glicerol.
- ◇ Heparina sódica de 5000 UI/ml.
- ◇ Metanol.
- ◇ Productos a evaluar.
- ◇ Tween.

#### Equipo

- ◇ Bioterio.
- ◇ Microscopio.
- ◇ Sonicador.
- ◇ Vortex.

## METODO

Cuando la inoculación de la sangre descongelada se hace a mediodía, la esquizogonia tiene lugar al día siguiente a la misma hora (12), el pico de estadio anillo se nota a las 15, el de los trofozoitos jóvenes a las 18, el de los trofozoitos maduros a medianoche y el pico de los trofozoitos viejos a las 6 de la mañana.

## METODOS DE EVALUACION DEL IMPACTO DE UNA DROGA

### *Evaluación del período prepatente*

#### FUNDAMENTO

El "período prepatente" es el número de días entre el momento de la inoculación de los parásitos en el ratón y el momento en que la parasitemia llegue al 1-2%. Se realiza con la cepa *P. vinckei petteri* congelada-descongelada. Se administra una dosis única de la droga a diferentes lotes de ratones a 0 h, + 3 h, + 6 h, + 12 h, + 18 h.

#### MATERIAL

- ◊ Idéntico a lo descrito en el parágrafo "Sincronización con la técnica de la sangre congelada" de este mismo capítulo,

#### METODO

- 1) Un grupo *M* (merozoitos) recibe la droga inmediatamente después de la infección.
- 2) Un otro grupo *M<sub>0</sub>* que corresponde al grupo control, no recibe el solvente.
- 3) Un grupo *A* (anillo) recibe la droga 3 horas después de la infección.
- 4) Un grupo *TJ* (trofozoitos jóvenes) recibe la droga 6 horas después de la infección.
- 5) Un grupo *TM* (trofozoitos maduros) recibe la droga 12 horas después de la infección.
- 6) Un grupo *TV* (trofozoitos viejos) recibe la droga 18 horas después de la infección.

El tratamiento se puede hacer por vía oral o parenteral (intraperitoneal o intravenosa). El seguimiento de la evolución de la parasitemia se hace cada día mediante la comparación con el grupo testigo no tratado.

Las dosis administradas son determinadas a partir de la  $CI_{50}$  del "Test de Peters". Se pueden utilizar 3 dosis: la primera corresponde a la  $CI_{50}$ , la segunda al doble de la  $CI_{50}$  y la tercera al cuádruple de la  $CI_{50}$ .

### ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS

Se realiza una análisis estadística (tipo "Test H" de Kruskal-Wallis o el "Test U" de Mann-Whitney) comparando el período prepatente del grupo testigo y el período prepatente del grupo tratado. Más grande es la diferencia entre los períodos prepatentes y más sensible es el estadio.

### *Seguimiento de la fórmula parasitaria*

#### FUNDAMENTO

Se pueden utilizar ratones infectados con sangre descongelada, infectada por *P. vinckei petteri* (parásito con desarrollo sincrónico) o con *P. yoelii* sincronizado por la técnica del Percoll®-glucosa.

#### MATERIAL

- ◊ Idéntico a lo descrito en el parágrafo "Sincronización con la técnica de la sangre congelada" de este mismo Capítulo, si se utiliza sangre congelada. Idéntico a lo descrito en el parágrafo "Sincronización con la técnica del Percoll®-glucosa", si se utiliza sangre fresca.

#### METODO

El inicio del test empieza cuando la parasitemia está incluida entre 1 y 10% para poder evaluar la proporción de cada estadio. Por lo tanto es imperativo que se realice el test antes de llegar al fenómeno de crisis caracterizado por una baja de la parasitemia y un asincronismo marcado.

Se administra la droga con una dosis única a varios lotes de ratones y en diferentes momentos del ciclo, como se describió en la evaluación del período prepatente.

Después del tratamiento, la parasitemia y las fórmulas parasitarias se determinan cada 6 horas durante 36-48 horas en los diferentes frotis (Figura 11) y son comparadas a las de los grupos testigos no tratados.



## ANALISIS DE LOS RESULTADOS

Los resultados se expresan en valores absolutos obtenidos multiplicando el porcentaje de parasitemia por el porcentaje de cada estadio. El análisis de la evolución de estos parámetros permite determinar, con una infección patente (mas de 2% de parasitemia), el o los estadios más sensibles y evaluar la duración de acción de la droga administrada en dosis única (en el ejemplo de la Tabla 26, el arteether fue administrado a 2,2 mg/kg por vía subcutánea).

**Tabla 26**  
*Seguimiento del desarrollo de la fórmula parasitaria en un ratón infectado por P. vinckei petteri tratado con arteether*

Hora.....	18.....	1.....	6.....	12.....	18.....
Parasitemia.....	3.....	3.....	1,7.....	1,6.....	1,1.....
A (%).....	3.....	20.....	66.....	77.....	85.....
TJ (%).....	63.....	38.....	28.....	21.....	12.....
TM (%).....	32.....	42.....	6.....	0.....	1.....
TV + E (%).....	2.....	0.....	0.....	2.....	2.....
IS.....	0,58.....	0,38.....	0,60.....	0,72.....	0,81.....

Se puede seguir la evolución de cada estadio de la izquierda hacia la derecha y bajando un peldaño en cada columna. La cantidad de TJ (en negro) que se transforma en TM es baja. La cantidad de TM (en negro) que se transforma en TV llega a 0, y la parasitemia baja (de 3 a 1,7). En la primera columna figura la fórmula parasitaria al inicio del experimento. Los TJ en la primera columna se transforman en TM 6 horas después (quinta línea de la segunda columna). Los TM dan TV 3 horas después (sexta línea de la tercera columna). Por lo tanto, el efecto de un tratamiento sobre un estadio se observa siguiendo los valores de los estadios de izquierda hacia la derecha cambiando de línea en cada columna. Los resultados de los ratones tratados y testigos se comparan utilizando 2 tests estadísticos no paramétricos: el "Test H" de Kruskal-Wallis y el "Test U" de Mann-Whitney.

### Referencias

- Beauté-Lafitte, A., Altemayer-Caillard, V., Chabaud, A.G. and Landau, I. (1994) *Plasmodium yoelii nigeriensis*: biological mechanism of resistance to chloroquine. Parasite, 1, 227-33.
- Caillard, V., Beauté-Lafitte, A., Chabaud, A.G. and Landau, I. (1992) *Plasmodium vinckei petteri* identification of the stages sensitive to arteether. Experimental Parasitology, 75, 449-56.
- Landau, I. and Chabaud, A.G. (1994) Latency of *Plasmodium* merozoites and drug-resistance. A review. Parasite, 1, 105-14.
- Warhurst, D.C. and Folwell, R.O. (1968) Measurement of the growth rate of erythrocytic stages of *Plasmodium berghei* and comparisons of the potency of inocula after various treatments. Annals of Tropical Medicine and Parasitology, 62, 349-360.

## Capítulo 5

# EVALUACION DE LA CINETICA DE ACTIVIDAD DE UNA DROGA

### FUNDAMENTO

Este test permite el acceso a datos de cinética sin dosificación costosa de la droga. Se evalúa el crecimiento de los parásitos inoculados a diferentes horas (o días) después de la administración del tratamiento. Así se determina la duración del efecto de una droga y también se determina de manera indirecta la cinética de la droga administrada.

### MATERIAL

#### Material biológico

- ◇ Ratones machos, sanos, tipo Swiss (peso: 18-22 g).
- ◇ Sangre de ratón infectada por una de las cepas citadas.

#### Material de plástico, vidrio y otros

- ◇ Cámara de Malassez, Neubauer o Thoma.
- ◇ Guantes.
- ◇ Jeringas de 1 ml.
- ◇ Pipeta a numeración.
- ◇ Pipetas Gilson de 200  $\mu$ l y de 1000  $\mu$ l.
- ◇ Porta-objetos.
- ◇ Tijeras.
- ◇ Tubos de hemólisis.
- ◇ Tubos de plástico de 15 ml.

### Reactivos químicos

- ◇ Agua destilada desionizada.
- ◇ Cloroformo.
- ◇ Colorante Giemsa.
- ◇ Dimetilsulfóxido.
- ◇ Etanol.
- ◇ Glicerol.
- ◇ Heparina sódica de 5000 UI/ml.
- ◇ Metanol.
- ◇ Productos a evaluar.
- ◇ Tween.

### Equipo

- ◇ Bioterio.
- ◇ Microscopio.
- ◇ Sonicador.
- ◇ Vortex.

### MÉTODO

Los parásitos son inoculados a tiempos variables inmediatamente o *después* del tratamiento (2 h, + 6 h, + 12 h, + 24 h etc.) con una dosis que inhibe el 50% o el 90% del crecimiento. Se puede utilizar un *pool* de sangre congelada con una parasitemia del 50% (100  $\mu$ l/ratones) o sangre fresca inyectando en este caso 100  $\mu$ l de una suspensión de  $10^6$  parásitos.

Se hacen frotis cada día hasta que la parasitemia llegue al 2% (*período prepatente*).

La diferencia entre el número de días necesarios para llegar al 2% de parasitemia con la inoculación inmediata y con la inoculación diferida de los parásitos, permite determinar la duración de actividad de la droga administrada.

Si no hay diferencias entre la inoculación diferida (+ 24 h) y la inoculación inmediata, se puede volver a infectar otros grupos de ratones a D1, D2, D3 etc.

### Referencias

*Método adaptado de:*

Peters, W. and Robinson, B.L. (1999) *Malaria in handbook of animal models of infection*, Academic Press, London.

## Capítulo 6

### INDUCCION DE LA RESISTENCIA

#### FUNDAMENTO

En la naturaleza los animales no vienen tratados, en consecuencia no existen cepas resistentes contra un tipo particular de droga. Sin embargo, las cepas tienen un grado de resistencia intrínseco característico de cada especie. Para poder evaluar el nivel de actividad de las moléculas estudiadas contra cepas resistentes a una droga definida es necesario inducir la resistencia de manera artificial.

#### MATERIAL

##### Material biológico

- ◇ R ratones machos tipo Swiss infectados por *Plasmodium yoelii* preferiblemente.

##### Material de plástico, vidrio y otros

- ◇ Frascos de cultivo de 25 cm<sup>2</sup> (50 ml).
- ◇ Frascos de cultivo de 75 cm<sup>2</sup> (150 ml).
- ◇ Jeringas tipo tuberculina (1 ml).
- ◇ Matraz Erlenmeyer de 1000 ml.
- ◇ Micropipetas de 200-1000  $\mu$ l.
- ◇ Pipetas de 10 ml.
- ◇ Pipetas Pasteur.
- ◇ Porta-objetos.
- ◇ Puntas azules de 200-1000  $\mu$ l.
- ◇ Tubos de plástico de 10 ml.
- ◇ Tubos tipo Eppendorf® de 1,5 ml.
- ◇ Tubos tipo Nalgène® blandos de 10 ml.

## Reactivos químicos

- ◇ Agua bidestilada desionizada.
- ◇ Cloroformo.
- ◇ Colorante Giemsa.
- ◇ D-glucosa.
- ◇ Drogas para inducir la resistencia.
- ◇ Heparina sódica de 5000 UI/ml.
- ◇ Percoll®.
- ◇ Suero fisiológico (NaCl 9 %).
- ◇ Tampón fosfato (PBS).

## Equipo

- ◇ Agitador magnético.
- ◇ Baño-maría.
- ◇ Bioterio.
- ◇ Centrífuga.

## METODO

Se administra a un grupo de 5 ratones una sola dosis del compuesto al cual se quiere inducir la resistencia. Al mismo tiempo se infectan los ratones que reciben la droga y los que reciben el solvente (grupo control). La dosis de droga administrada debe ser capaz de impedir que suba la parasitemia hasta el 2% por lo menos 7 a 10 días. Se controla la parasitemia cada día con frotis (Figura 11) teñidos con colorante Giemsa (ver el parágrafo "Método visual", Capítulo 2, Primera Parte).

La comparación del tiempo necesario para llegar al 2% de parasitemia en el grupo tratado y en el grupo control da lo que llamamos un "tiempo de retraso" del 2% (TR2). El valor del TR2 se expresa en porcentaje del tiempo de "retraso" de la cepa pariente del primer pase que puede ser graficado para seguir el desarrollo de la resistencia.

Cuando la parasitemia llega al 2%, se hace un pase a otros ratones: un grupo control que recibe el solvente y un grupo tratado que recibe siempre la misma dosis de droga del inicio del experimento. Se realizan los pases hasta que se establezca la resistencia visualizada por el TR2. En este momento se congela la cepa.

Se puede también estudiar la reversión de la resistencia haciendo pases sin drogas y evaluando el tiempo necesario para que el TR2 vuelva a ser idéntico a el TR2 inicial. Luego la cepa resistente se puede utilizar en el "Test supresivo de 4 días".

## Referencias

Peters, W. and Robinson, B.L. (1999) *Malaria in handbook of animal models of infection*, Academic Press, London.

Peters, W., Portus, J. and Robinson, B.L. (1977) The chemotherapy of rodent malaria. XXVIII. The development of resistance to mefloquine (WR 142,490). *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, 71, 4, 419-27.

Peters, W., Robinson, B.L., Rossiter, J.C., Misra, D. and Jefford, C.W. (1993) The chemotherapy of rodent malaria. XLIX. The activities of some synthetic 1,2,4-trioxanes against chloroquine-sensitive and chloroquine-resistant parasites. Part 2: structure-activity studies on *cis*-fused cyclopenteno-1,2,4-trioxanes (fenzans) against drug-sensitive and drug-resistant lines of *Plasmodium berghei* and *P. yoelii* ssp. NS *in vivo*. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, 87, 1, 9-16.



*Tercera Parte*

**CICLO SEXUAL Y ESTADIO HEPATICO  
DE *PLASMODIUM* DE ROEDORES**





## Capítulo 1

# LOS MOSQUITOS

### REPRODUCCION

#### FUNDAMENTO

Para evaluar drogas sobre la transmisión del paludismo en el modelo murido se utilizan mosquitos vectores de *Plasmodium* de roedores. Para ello se recomienda que los mosquitos sean del lugar donde se realizan los estudios experimentales. Este aspecto supone la adaptación de *Anopheles* salvajes en un insectario y la transmisión de *Plasmodium* de roedores compatibles (esta estandarización puede implicar meses de trabajo).

En América latina, entre los vectores conocidos de *Plasmodium* podemos mencionar: *Anopheles albimanus* Wied., *A. albitarsis* Linch Arrib., *A. aquasalis* Curry, *A. cruzii* D. & K., *A. darlingi* Root, *A. eiseni* Coq., *A. mediopunctatus* Theo, *A. nuñeztovari* Gabaldon, *A. oswaldoi* Peryassu, *A. pseudopunctipennis* Theo, *A. punctimacula* D. & K., *A. trinkae* Faran y *A. triannulatus* (Neiva & Pinto).

*Anopheles stephensi* List. es un vector de *Plasmodium* humano de origen asiático; en consecuencia, la utilización en Sudamérica no es recomendable por el riesgo que existe de introducir esta nueva especie.

Los protocolos descritos en este capítulo no mencionan el género *A. stephensi* más que a título de ejemplo, porque su adaptación a la cría intensiva en el insectario y a la transmisión de paludismo murido están perfectamente codificadas.

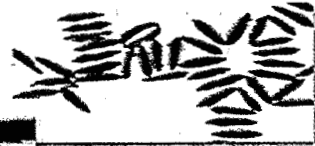
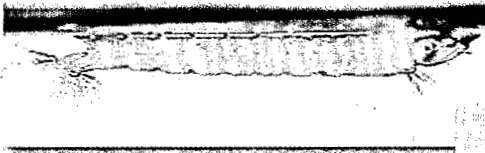
**Figura 24**  
*Ciclo evolutivo del mosquito*

**Hembra tomando sangre**



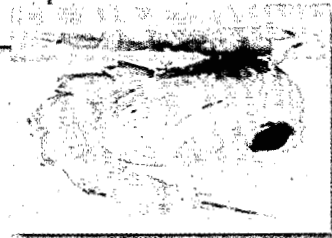
**Hembra descansando**

**Larva respirando  
debajo de la superficie del agua**



**Huevos con flotadores**

**Ninfa respirando  
debajo de la superficie del agua**

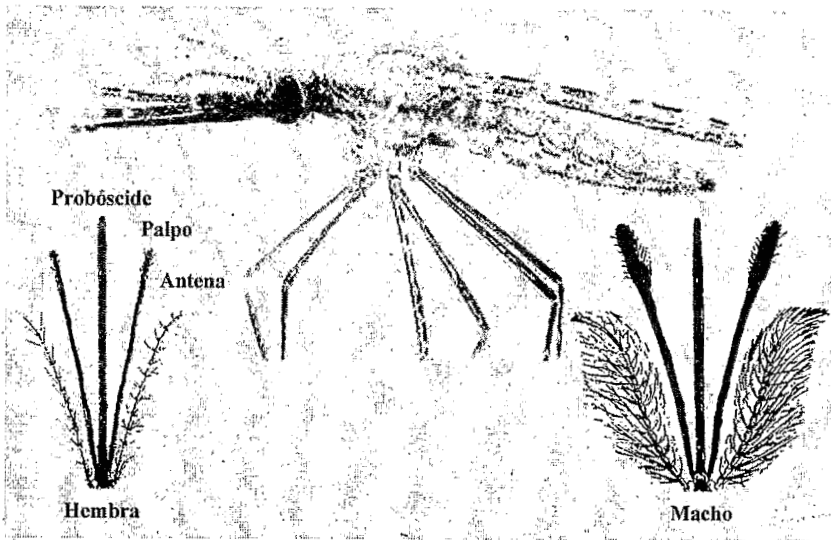


Los *mosquitos adultos* (Foto 12) se aparean desde su nacimiento.

Del punto de vista morfológico, los mosquitos hembras y machos se diferencian esencialmente por el aspecto de sus antenas (glabras en las hembras, plumosas en los machos).

Además, las hembras deben alimentarse con sangre; en cambio, los machos se alimentan con agua azucarada.

**Foto 12**  
*Mosquitos adultos*



Trés días después de la toma de sangre, la hembra pone en el agua de 150 a 300 huevos de 0,6-0,8 mm de largo con flotadores laterales.

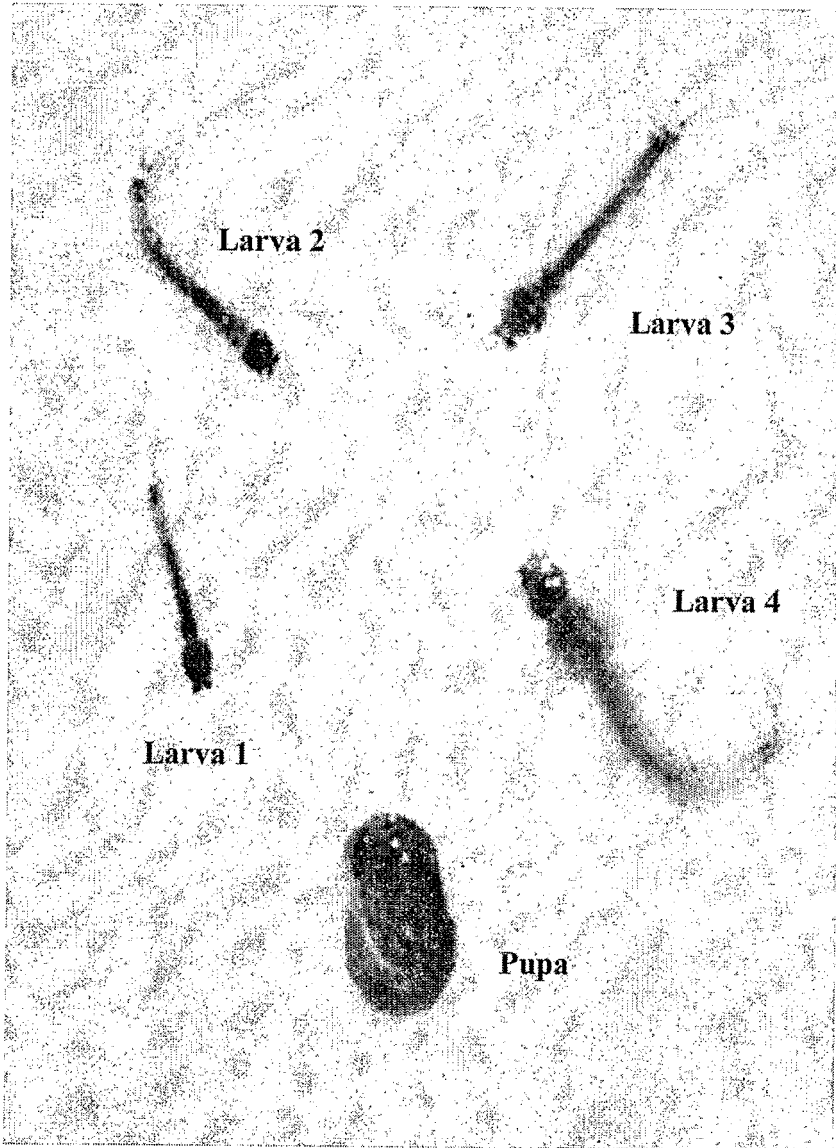
El brote ocurre 48 horas después y da lugar a *larvas acuáticas* (Foto 13) que evolucionarán en 4 estadios denominados L1, L2, L3 y L4.

Luego pasarán a *ninfas acuáticas* que originarán (en 48 horas) a los adultos aéreos (*imago*s). Tres días separan la salida de los adultos del agua y la toma de sangre.

Las larvas deben alimentarse con un complejo rico en prótidos, lípidos, glúcidos, vitaminas y minerales.

Las condiciones de temperatura (25-26 °C) y humedad (45-55%) son esenciales para asegurar el ciclo gonotrófico.

**Foto 13**  
*Larvas acuáticas*



## MATERIAL

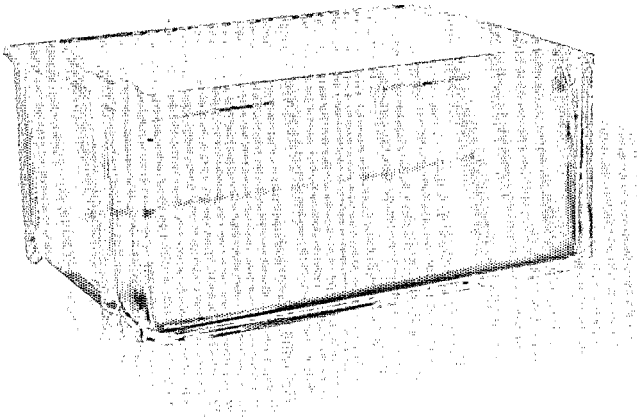
### Material biológico

- ◇ *Anopheles stephensi*.
- ◇ Conejos de 3,5 a 4 kg de peso.

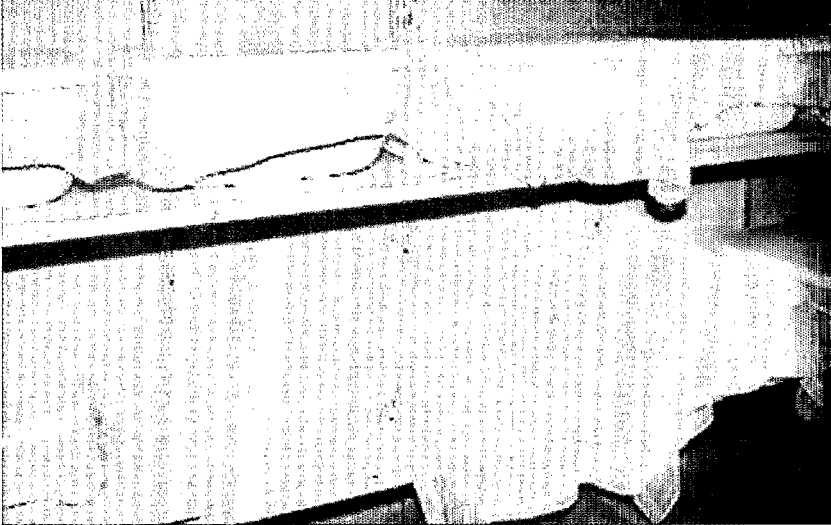
### Material de plástico, vidrio y otros

- ◇ Criaderos de plástico de uso único de 60 x 60 x 37 mm (Foto 14).
- ◇ Cubetas de plástico para 5 litros, con coberturas de tul (Foto 15).
- ◇ Jeringas de 1 ml con agujas de 23 G x 1 " (0,6 x 25 mm).
- ◇ Papel Whatman (tipo 3MM CHR 3030917).
- ◇ Afeitadora desechable.
- ◇ Recipientes de boca ancha para agua azucarada, de volúmenes de 60 ml, con diámetro de 35 mm y 70 cm de altura (Foto 16).

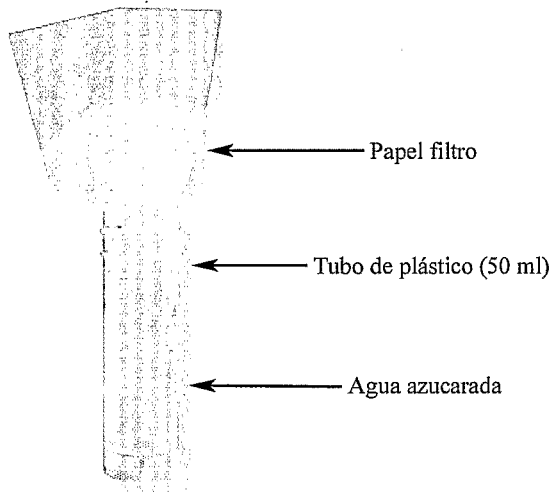
**Foto 14**  
*Criadero de plástico*



**Foto 15**  
*Cubetas de plástico*



**Foto 16**  
*Recipiente para agua azucarada*



## Reactivos químicos

- ◇ Agua limpia (decantada por tres días).
- ◇ D-glucosa anhidra.
- ◇ Galletas para perros:  
(Composición: cereales, carne, pescado y sustancias minerales.  
Concentraciones: 16% de proteínas totales; 3,5% de materia grasa total; 6% de cenizas totales; 2% de celulosa total; 12% de humedad; 1% de calcio; 0,45% de sodio; 0,8% de fósforo.)
- ◇ **Imalgène® (laboratorio Meral):** ketamina 5 g/100 ml + clorobutanol 0,5 g/100 ml.
- ◇ Superlevadura Gayelord Hauser  
(Composición: 1% de levadura de cerveza, malta.  
Concentraciones: 48% de proteínas; 35% de glúcidos; 3% de lípidos; 10 mg/100 g de vitaminas B<sub>1</sub>; 2,5 mg/100 g de vitamina B<sub>2</sub>; 33 mg/100 g de vitamina PP; 1500 µg/100 g de ácido fólico; 1300 mg/100 g de fósforo; 190 mg/100 g de magnesio; 7 mg/100 g de hierro; 3 mg/100 g de zinc.)
- ◇ Vetranquil® (laboratorio Sanofi): acepromazina (0,5 g/100 ml).

## Equipo

- ◇ Cajas con perfiles metálicos de 50 x 50 cm, con mosquitero (Foto 17).
- ◇ Calefacción.
- ◇ Capturador de mosquitos (Foto 18).
- ◇ Higrómetro.
- ◇ Termómetro.
- ◇ Un recipiente con 100 litros de agua, en el cual se colocará un calentador.
- ◇ Un sistema tubular que permita el aprovisionamiento de agua fría.

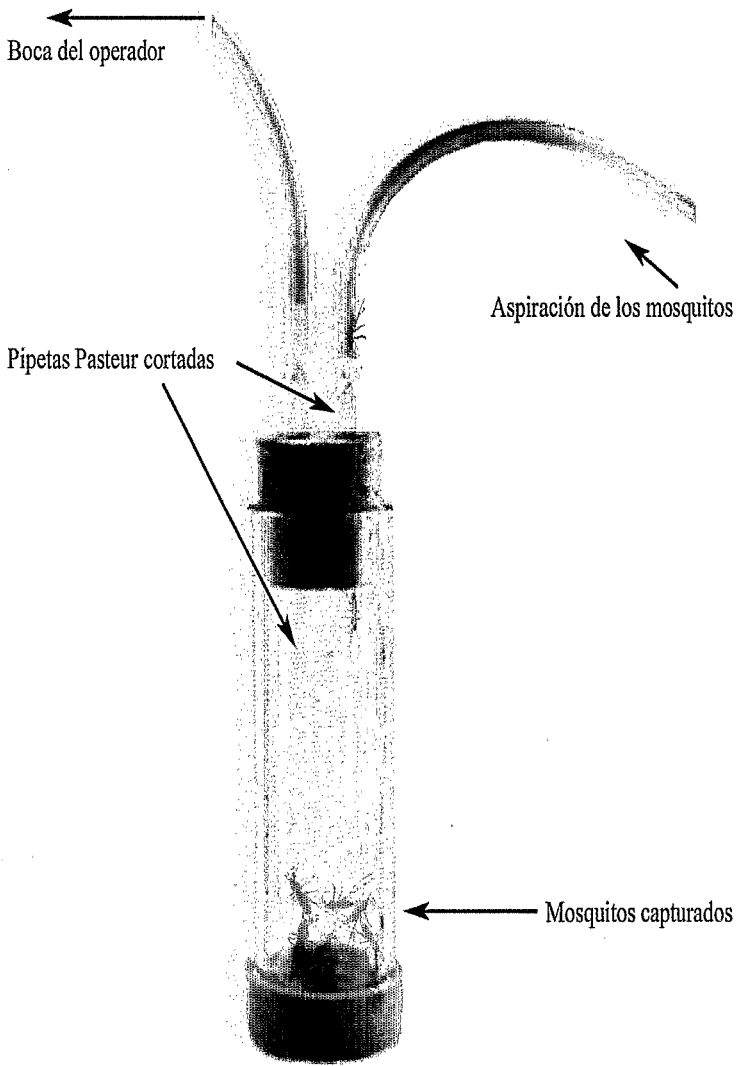
### Foto 17

Cajas para mosquitos





**Foto 18**  
*Capturador de mosquito*



El insectario debe estar constituido por dos ambientes: uno para los adultos y otro para las larvas y las ninfas. El ambiente de los adultos debe ser mantenido a una temperatura de 23 °C y a una humedad del 75%, con muy poca luz, mucha tranquilidad y calma. La temperatura y la humedad son provistas por un radiador eléctrico y una red tubular de agua fría para el control térmico. Con el fin de proporcionar humedad, igualmente se puede utilizar un recipiente grande con agua en cuyo interior se coloca un calentador.

### METODO

#### Adultos

Los adultos son mantenidos en cajas de 50 x 50 cm cuyo fondo está tapizado por un papel cualquiera pero muy limpio (Foto 19).

Foto 19

*Captura de mosquitos*



Los mosquitos deben ser alimentados con una solución de glucosa al 5% en un frasco de boca ancha (Foto 16), que contiene un pedazo de papel filtro tipo Whatman de 5 x 15 cm, esterilizado por calor (4 por cada caja). La solución de glucosa se debe cambiar cada 3 días.

Estas cajas también deben poseer 2 criaderos (Foto 15), con agua limpia (decantada por 3 días con la finalidad de eliminar el cloro y los restos calcáreos) donde los mosquitos colocarán los huevos. Asimismo el personal no debe utilizar repelentes.

Para el mantenimiento de los mosquitos es necesario alimentarlos también con sangre de conejos de 3,5 a 4 kg (Foto 20), anestesiados por vía intramuscular (20 ml de Imalgène® + 2 µl de Vetranquil®). Con esta finalidad, se debe rasurar un costado del conejo, luego ubicarlo encima de la jaula durante 2 horas cada 3 días. Para tal efecto, se deben utilizar 2 conejos de manera alterna con el fin de limitar los anestésicos.

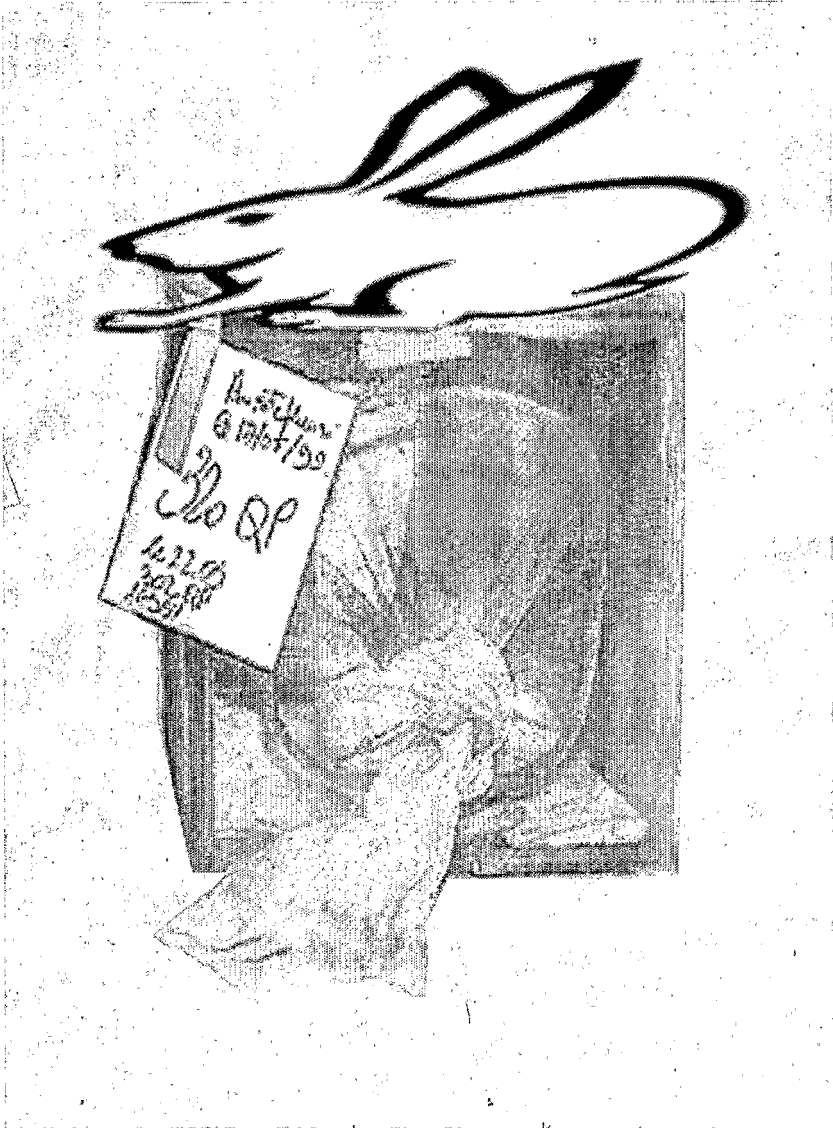
#### Huevos

Los huevos (obtenidos aproximadamente entre 72 y 74 horas después de la toma de sangre) son cuidadosamente transferidos a la pieza de larvas y ninfas, donde la iluminación permanente, la temperatura de 25-26 °C y la humedad del 45-55% garantizan buenas condiciones de crecimiento. Allí son depositados en las cubetas bien aseadas (sin trazas de detergente y cuidadosamente secadas después del lavado).

El agua de las cubetas, que debe alcanzar 10 cm de profundidad, no debe ser cambiada hasta la maduración completa de las ninfas. Las cubetas que contienen los huevos no deben ser movidas para asegurar el buen desarrollo de las larvas.

La eclosión tiene lugar a las 48 horas aproximadamente; el estadio L4 se desarrolla entre 14 y 15 días y el estadio ninfal 48 horas después. En este estadio las cubetas deben ser cubiertas con tul.

Foto 20  
Alimentación de los mosquitos



Las larvas deben ser alimentadas moderadamente durante sus estadios L1 y L2, más entre los estadios L2 y L4, y muy poco en el estadio ninfal.

En la práctica, la alimentación tiene que ser de 1 g por cubeta en los días cuarto y séptimo. Posteriormente, a partir del octavo día, las larvas tienen que recibir 2 g en la mañana y la misma cantidad en la noche por cada cubeta. Finalmente la alimentación se suprime casi por completo en el estadio ninfal.

Este tipo de alimentación se realiza utilizando galletas secas para perros, que deben ser molidas en pequeños molinos de café. A cada porción de 50 g de galletas molidas se le debe agregar una cucharilla al ras de levadura.

Una vez crecidos, los adultos habrán de ser transferidos con rapidez en sus respectivas jaulas, a la pieza de los adultos.

### Referencias

- Faran, M.E. and Linthicum, K.J. (1981) A handbook of the amazonian species of *Anopheles* (*Nyssorhynchus*) (*Diptera: Culicidae*). Mosquito Systematics, 13, 1, 1-81.
- Gerberg, E.J. (1970) Manual for mosquito rearing and experimental techniques. AMCA Bulletin, 5, 1-109.
- OMS (1975) *Manual of practical entomology in malaria*. WHO offset public n. 13, Genève, 2 vol.
- Rodhain, F. and Perez, C. (1985) *Précis d'entomologie médicale et vétérinaire. Notions d'épidémiologie des maladies à vecteurs*. Maloine, Paris.
- Shute, P.G. and Maryon, M. (1966) *Laboratory technics for the study of malaria*. J.A. Churchill, London.

## MANIPULACION

### FUNDAMENTO

Para apreciar el desarrollo de *Plasmodium* en los vectores es necesario cuantificar el número de ooquistes presentes en el estómago de los mosquitos. Esta operación se debe realizar 8 días después de la alimentación sanguínea infectante, en condiciones de temperatura e higrometría descritas anteriormente. Para realizar el test con las drogas probablemente activas sobre el estadio hepático, es necesario disponer de esporozoitos contenidos en las glándulas salivares del insecto. La disección en ese caso debe ser efectuada 12 días después de la alimentación sanguínea infectante.

### MATERIAL

#### Material biológico

- ◇ *Anopheles stephensi*.

#### Material de plástico, vidrio y otros

- ◇ Cubre-objetos de 22 x 22 mm.
- ◇ Jeringas de 1 ml (con agujas de 0,5 x 16 mm, 25 G x 5/8 ").
- ◇ Mortero de vidrio.
- ◇ Porta-objetos para microscopio de 76 x 26 mm desengrasados.

#### Reactivos químicos

- ◇ Suero fisiológico.

#### Equipo

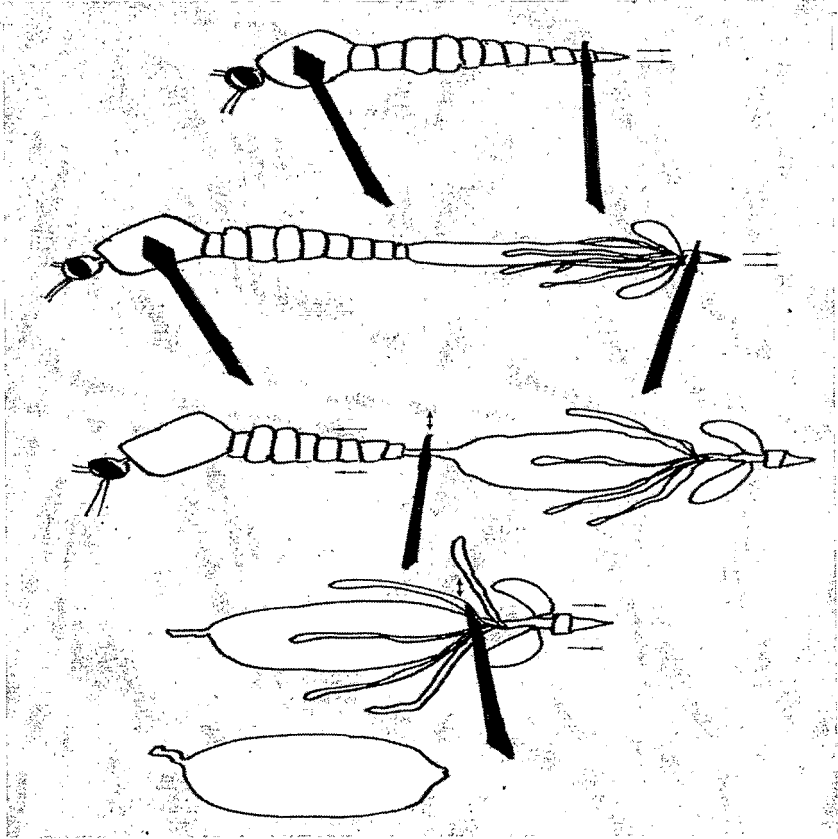
- ◇ Lupa binocular.
- ◇ Microscopio.

### METODO

#### Disección del estómago

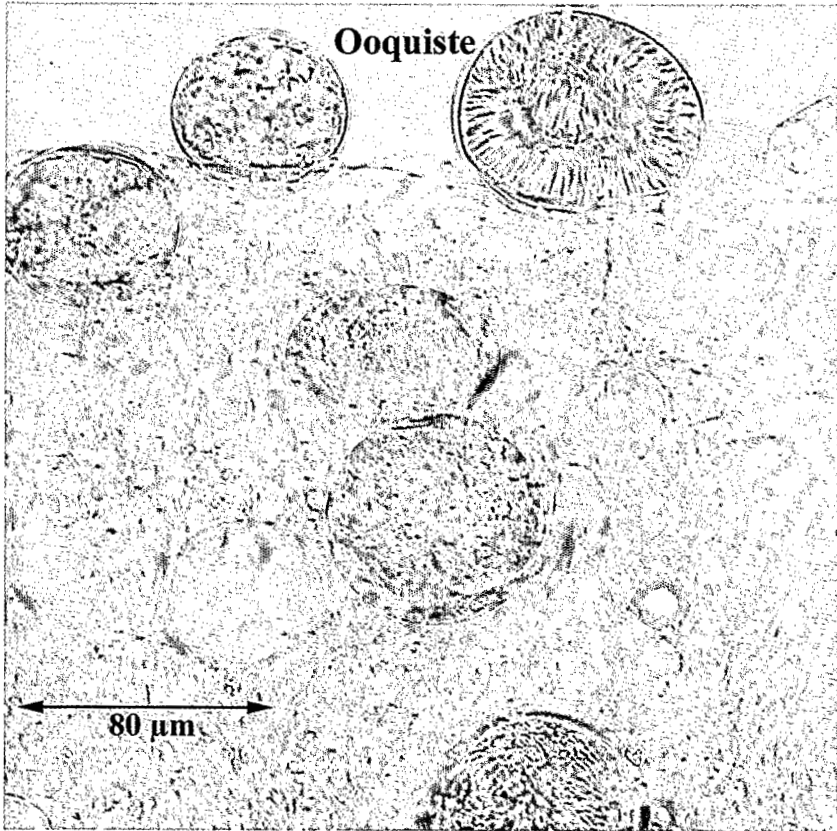
La disección del estómago del mosquito se efectúa como indicado en la Figura 25.

**Figura 25**  
*Disección del estómago del mosquito*



El mosquito es colocado en una lámina de vidrio, la cara ventral frente al experimentador. Se trabaja con lupa binocular. Con el plano de la aguja, se mantiene el mosquito a nivel del tórax. Con el bisel de la otra aguja, se tira a nivel de los últimos segmentos del abdomen hasta la extracción completa del estómago, que debe ser depositado sobre una lámina con una gota de suero fisiológico. Luego se observa al microscopio. Los ooquistes son contados por una cara del estómago (Foto 21).

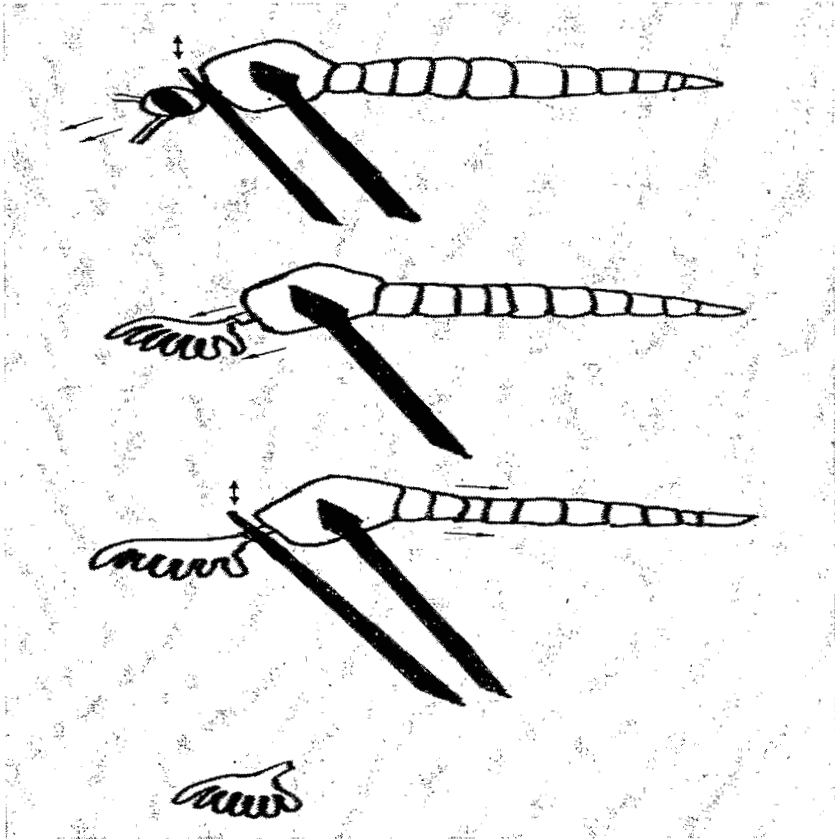
Foto 21  
*Estómago infectado*



En caso de dificultades para extraer el estómago, se puede realizar un corte en la unión entre el tórax y el abdomen con el bisel de la aguja, después tirar el estómago como ya se indicó, manteniendo el abdomen a nivel de la disección.



Figura 26  
Extracción de las glándulas salivares del mosquito



Extracción de las glándulas salivares

La extracción de las glándulas salivares (Figura 26) se efectúa bajo lupa binocular. El mosquito debe ser colocado de lado en una lámina de vidrio. Se realiza una sección del cuello, entre la cabeza y el tórax, con el bisel de la aguja. Luego se presiona el tórax con el bisel de la aguja, lo que tiene por efecto hacer salir las 7 glándulas salivares. A continuación se secciona la base de las glándulas, deslizándolas en una gota de suero fisiológico depositado previamente sobre la lámina. Se las recubren con

un cubre-objetos. Se aplastan las glándulas entre la platina y el objetivo, luego se controla la presencia de esporozoitos (Foto 22).

Posteriormente, se transfiere cuidadosamente la muestra en un mortero de vidrio con suero fisiológico.

Cinco mosquitos positivos son habitualmente suficientes para garantizar el buen éxito de la operación.

**Foto 22**  
*Esporozoitos*



Después de la homogeneización se contarán los esporozoitos en la cámara de Malassez (para el uso de la cámara de Malassez, ver el parágrafo “Lectura con la cámara de Malassez” en el Capítulo 3 de la Segunda Parte – “Evaluación de la actividad antimalárica *in vivo* de productos naturales o de síntesis” – así como en la Tabla 17).

### **Referencias**

Shute, P.G. and Maryon, M. (1966) *Laboratory technics for the study of malaria*. J.A. Churchill, London.



## Capítulo 2

### TEST

### PARA LA EVALUACION DE LAS DROGAS GAMETOCIDAS

#### FUNDAMENTO

La reproducción sexual de *Plásmodium* se efectúa en el interior del estómago de los mosquitos. A partir de estadios sanguíneos (trofozoitos) del hospedador vertebrado, se van a diferenciar estadios sexuales, llamados *gametocitos machos y hembras*. Para fecundarse, estos últimos deben ser ingeridos por el mosquito: en el estómago del mismo evolucionaran a ooquistes. Sin embargo, la transición de gametocito a ooquiste llega a realizarse si las condiciones ambientales cambian profundamente, por ejemplo si se verifica un repentino cambio de temperatura, de pH y una ruptura mecánica o enzimática de la membrana eritrocitaria – eventos que ocurren en el pasaje mamífero-insecto.

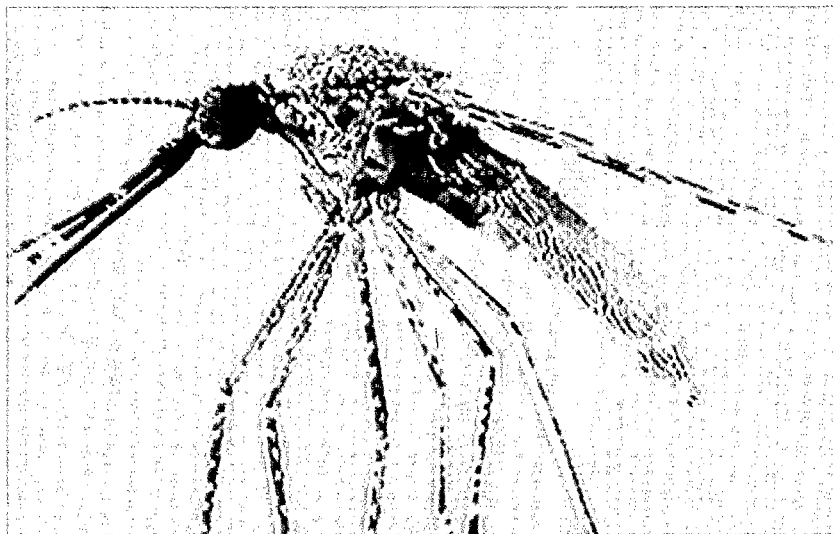
Por lo tanto, el estudio de una droga gametocida debe responder al siguiente principio: si una droga es activa, su administración a un roedor debe impedir la formación de ooquistes en los mosquitos infectados a partir de ese roedor. La droga de referencia en este tipo de análisis es la primaquina.

#### MATERIAL

Material biológico
--------------------

- ◇ *Anopheles stephensi*: hembras adultas de 6 días de emerger (Foto 23).
- ◇ Hematíes infectados por *P. yoelii nigeriensis*.
- ◇ Ratones machos, sanos, tipo Swiss (peso: 18-22 g).

Foto 23  
*Anopheles hembra*



Material de plástico, vidrio y otros

- ◇ Jeringas de uso subcutáneo (con agujas de 0,5 x 16 mm, 25 G x 5/8 ").
- ◇ Beker de 250 o 500 ml.
- ◇ Jeringas tipo tuberculina de 1 ml (con agujas de 0,4 x 12 mm, 25 G x 1/2 ").
- ◇ Pipetas Pasteur de puntas abiertas sin algodón.

Reactivos químicos

- ◇ Productos a evaluar.
- ◇ Heparina sódica de 5000 UI/ml.
- ◇ Primaquina.
- ◇ Suero fisiológico.

Equipo

- ◇ Agua templada o lampara de 100 W.
- ◇ Alambre flexible de 10 x 10 mm.
- ◇ Bioterio.
- ◇ Cajas para mosquitos de 20 x 20 cm.
- ◇ Ganchos metálicos.
- ◇ Insectario.
- ◇ Micropipetas.
- ◇ Papel log probit.

## METODO

### Infección y tratamiento de los ratones

- ◇ Inocular los ratones por vía intravenosa, con  $10^7$  glóbulos rojos infectados por *P. yoelii nigeriensis*. La sangre fresca del roedor infectado es obtenida por punción de los senos retro-orbitales, en una pipeta Pasteur humedecida con heparina. El cálculo está basado sobre la parasitemia y una cantidad teórica de 5 millones de glóbulos rojos/ $\mu$ l de sangre en los ratones (ver también Figuras 18, 19, 20 y 21).
- ◇ Poner la cola del animal en agua tibia o bajo una lampara de 100 W para obtener una vasodilatación.
- ◇ Mantener el ratón debajo de un recipiente de vidrio (tipo Beker, con un pico que permita coger la cola; Foto 8).
- ◇ Inyectar 200  $\mu$ l de suero fisiológico conteniendo los hematíes infectados en la vena caudal a un 1/3 superior de la cola. No se debe sentir resistencia a la inyección, ni observar un blanquecimiento prolongado (de más de 1 minuto) alrededor de la zona de la inyección.

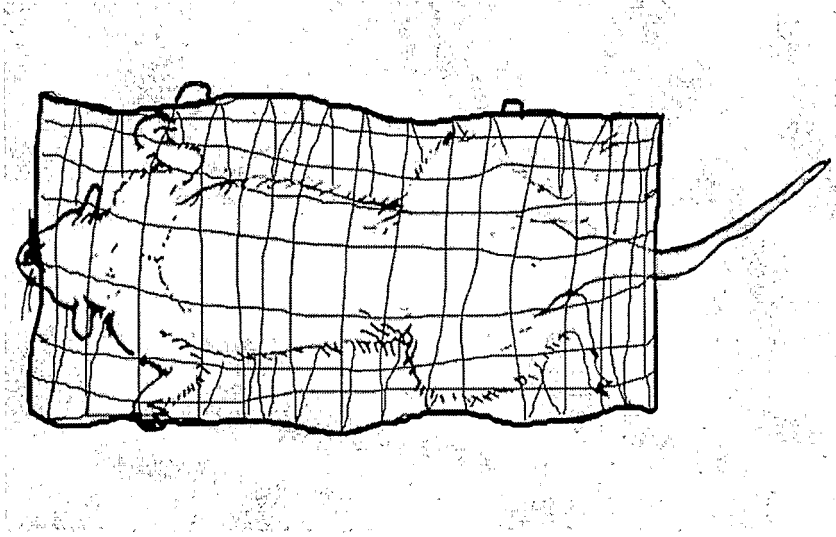
Se utilizan por lo menos 3 lotes de 8 ratones:

- 1) un lote de estudio de ratones tratados el tercer día por la droga a evaluar por vía subcutánea a diferentes dosis alrededor de 30 mg/kg en 200  $\mu$ l de solvente (tomando como referencia la primaquina, o bien la dosis tolerable máxima, descendiendo después a la dosis mínima eficaz);
- 2) un lote control negativo, inyectado sólo con solvente;
- 3) un lote control positivo, tratado con primaquina en una concentración de 33 mg/kg.

### Infección de los mosquitos

Los ratones son expuestos 3 horas después del tratamiento a las picaduras de lotes de 25 hembras de *Anopheles stephensi* (adultas de 6 días) durante 30 minutos. Los ratones son inmovilizados en un pedazo de alambre flexible en doble espacio de 6 x 10 cm (Foto 24), de manera suave y agarrados horizontalmente, en la parte superior de la jaula, por intermedio de ganchos o clips.

**Foto 24**  
*Inmovilización de los ratones*



Al término de 30 minutos los mosquitos no alimentados (Fotos 19 y 25) son eliminados con un capturador.

Los mosquitos alimentados son mantenidos en una jaula de 20 cm x 20 cm, con el fondo tapizado por una hoja de papel cualquiera. Es necesario disponer de agua limpia azucarada al 5% en un recipiente de boca ancha, conteniendo un pedazo de papel tipo Whatman y un criadero conteniendo también agua limpia.

Evaluación del número de ooquistes
------------------------------------

La evaluación del número de ooquistes (O) se realiza después de la disección del estómago el día 11 (es decir 8 días después) para calcular el porcentaje de inhibición del testigo.

Foto 25

Mosquitos en ayuno y mosquitos alimentados

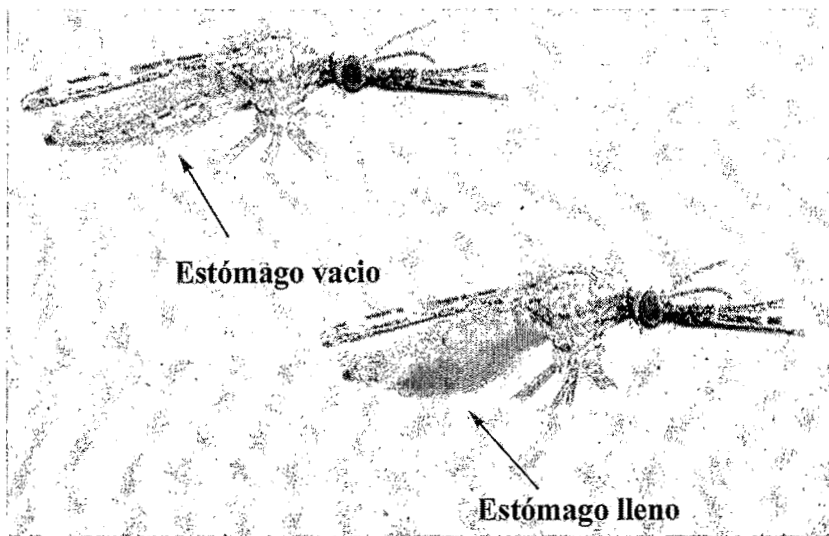


Tabla 27

Cálculo del porcentaje de inhibición del número de ooquistes

$$\% \text{ de inhibición} = \frac{\text{O testigo} - \text{O con la droga}}{\text{O testigo}}$$

Referencias

Ramkaran, A.E. and Peters, W. (1969) Infectivity of chloroquine resistant *Plasmodium berghei* to *Anopheles stephensi* enhanced by chloroquine. Nature, 223, 635-636.





### Capítulo 3

#### TEST

#### PARA LA EVALUACION DE LAS DROGAS ESPORONTICIDAS

#### FUNDAMENTO

En el estómago del mosquito los ookinetos, resultantes de la fecundación de los gametocitos machos y hembras, van a migrar a lo ancho de la base del epitelio intestinal para formar los ooquistes, cuya maduración tendrá por resultado la formación de numerosos esporozoitos.

Una droga puede ser activa en esta etapa de desarrollo del parásito si ella ha sido ingerida por los mosquitos, bloqueando la formación de ooquistes.

El principio de este estudio consiste en infectar los mosquitos a partir de roedores infectados con presencia de gametocitos en sangre circulante, después tratar los mosquitos con la droga a estudiar en el agua que van a beber.

El resultado será evaluado con el número de ooquistes.

Este test permite detectar una actividad sobre este estadio parasitario, pero es poco confiable debido al hecho de la imposibilidad de controlar la absorción de la droga y su dosis por los mosquitos.

#### MATERIAL

- ◊ Utilizar el mismo material indicado en el Capítulo 2 de la Tercera Parte ("Test para la evaluación de las drogas gametocidas"), menos la primaquina.
- ◊ Algodón hidrófilo (que se colocara en vez de los envases donde se pone el azúcar).
- ◊ Papel Whatman.

## METODO

### Infeción y tratamiento de los ratones

Los ratones son inoculados por vía intravenosa con  $10^7$  hematíes infectados con *Plasmodium yoelii nigeriensis* (como indicado en el Capítulo 2 de la Tercera Parte: "Test para la evaluación de las drogas gametocidas").

Tres días después los ratones son expuestos para ser picados por lotes de *Anopheles stephensi* hembras adultas de 6 días, durante 30 minutos.

### Infeción de los mosquitos

Se utilizan por lo menos 2 lotes de 25 mosquitos:

- 1) un lote de estudio, tratado con una solución al 0,05% de la droga a testar, colocada en un pedazo de algodón embebido en una solución de glucosa al 5%, cambiando cada 24 horas hasta el final del experimento;
- 2) un lote control negativo, alimentado sólo con solución glucosada, en las mismas condiciones.

### Evaluación del número de ooquistes

Evaluar el número de ooquistes (O) 10 días después (7 días después de su alimentación), para calcular el porcentaje de inhibición en relación al testigo de la manera mencionada en la Tabla 27.

## Referencias

Ramkaran, A.E. and Peters, W. (1969) The chemotherapy of rodent malaria, VIII. The action of some sulphonamides alone or with folic reductase inhibitors against malaria vectors and parasites. Part III. The action of sulphomethoxine and pyrimethamine on the sporogonic stages. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, 63, 449-454.

## Capítulo 4

# TEST PARA LA EVALUACION DE LAS DROGAS ACTIVAS SOBRE EL ESTADIO HEPATICO

### FUNDAMENTO

La gran cantidad de esporozoitos presentes en las glándulas salivares de los mosquitos hembras son inoculados a roedores a través de la alimentación sanguínea del insecto. Los esporozoitos van rápidamente hacia el hígado por vía sanguínea y linfática y se desarrollan en esquizontes tisulares en el hepatocito.

Una droga puede ser activa en esta fase cuando es administrada al hospedador vertebrado. En vez de controlar el desarrollo de los estadios hepáticos, resulta más fácil verificar el desarrollo de los estadios sanguíneos.

### MATERIAL

#### Material biológico

- ◇ *Anopheles stephensi*: hembras adultas de 6 días de emerger (Foto 23).
- ◇ Esporozoitos de *Plasmodium yoelii nigeriensis*.
- ◇ Ratones machos, sanos, tipo Swiss (peso: 18-22 g).

#### Material de plástico, vidrio y otros

- ◇ Agujas de uso subcutáneo (0,5 x 16 mm, 25 G x 5/8 ").
- ◇ Beker de 250 o 500 ml.
- ◇ Jeringas tipo tuberculina de 1 ml, con agujas de 0,4 x 12 mm, 25 G x 1/2 ".
- ◇ Pipetas Pasteur de puntas abiertas sin algodón.

### Reactivos químicos

- ◇ Productos a evaluar.
- ◇ Heparina sódica de 5000 UI/ml.
- ◇ Suero fisiológico.

### Equipo

- ◇ Agua templada o lampara de 100 W.
- ◇ Alambre flexible de 10 x 10 mm.
- ◇ Bioterio.
- ◇ Cajas para mosquitos de 20 x 20 cm.
- ◇ Cámara de Malassez.
- ◇ Ganchos metálicos.
- ◇ Insectario.
- ◇ Micropipetas.
- ◇ Papel log probit.

## METODO

### Infeción y tratamiento de los ratones

Los ratones son inoculados por vía intravenosa con  $10^7$  esporozoitos de *P. yoelii nigeriensis* (200  $\mu$ l de suero fisiológico) obtenidos por disección de las glándulas salivares de *Anopheles stephensi* alimentados 12 días antes de ratones infectados presentando gametocitos y una parasitemia del orden del 15%. Los esporozoitos son contados en la cámara de Malassez (para el uso de la cámara de Malassez, ver el Capítulo 3 de la Segunda Parte: "Evaluación de la actividad antimalárica *in vivo* de productos naturales o de síntesis"). Se utilizan por lo menos 2 lotes de 3 ratones:

- 1) un lote de estudio, tratado por vía subcutánea con la droga a testar a razón de 30 mg/kg y 100 mg/kg, 2 horas después de la inoculación de los esporozoitos;
- 2) un lote control negativo, inyectado con el solvente.

Evaluar la presencia de parásitos en la sangre de los ratones al séptimo y decimocuarto día para determinar la actividad de la droga (Tabla 28).

**Tabla 28**  
Grado de actividad antiesporozoitos

Grado 1: actividad fuerte.....	0/3 positivos
Grado 2: actividad media.....	1/3 positivos
Grado 3: actividad baja.....	2/3 positivos
Grado 4: sin actividad.....	3/3 positivos

### Referencias

- Boulard, Y., Landau, I., Miltgen, F., Ellis, D.S. and Peters, W. (1983) The chemotherapy of rodent malaria. XXXIV. Causal prophylaxis. Part III. Ultrastructural changes induced in exo-erythrocytic schizonts of *Plasmodium yoelii yoelii* by primaquine. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, 77, 6, 555-568.
- Howells, R.E., Gilles, H.M. and Bent, N.S. (1985) A comparison of the pyrimethamine and cycloguanil sensitivities of the pre-erythrocytic and erythrocytic stages of drug-sensitive and -resistant strains of *Plasmodium yoelii*. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, 79, 3, 247-251.
- Peters, W., Davies, E.E. and Robinson, B.L. (1975) The chemotherapy of rodent malaria. XXIII. Causal prophylaxis. Part II. Practical experience with *Plasmodium yoelii nigeriensis* in drug screening. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, 69, 3, 311-328.
- Peters, W., Robinson, B.L. and Milhous, W.K. (1993) The chemotherapy of rodent malaria. LI. Studies on a new 8-aminoquinoline, WR 238,605. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, 87, 6, 547-552.
- Schofield, P., Howells, R.E. and Peters, W. (1981) A technique for the selection of long-acting antimalarial compounds using a rodent malaria model. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, 75, 5, 521-531; 17 ref.
- Shao, B.R. and Ye, X.Y. (1991) Tissue schizontocidal effect of trifluoroacetyl primaquine in *Plasmodium yoelii* infected mice and *Plasmodium cynomolgi* infected monkeys. *Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health*, 22, 1, 81-83.
- Vanderberg, J.P. (1977) *Plasmodium berghei*: quantitation of sporozoites injected by mosquitoes feeding on a rodent host. *Experimental Parasitology*, 42, 1, 169-181.



*Cuarta Parte*

**PRODUCTOS NATURALES ANTIPALUDICOS  
DE AMERICA LATINA**





## Introducción

### SELECCION 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 de las Simaroubaceae y Amaryllidaceae (género *Crinum* y *Hymenocallis*). Estas dos familias son muy conocidas en América, varias Simaroubaceae son plantas medicinales utilizadas como febrífugas en América Central y en Amazonia.

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 (Brandao et al., 1992) 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. Las plantas medicinales de interés son *Esebenckia febrifuga* A. Juss. (Rutaceae), *Acanthospermum australe* Ktze (Compositae) y *Tachia guianensis* Aubl. (Gentianaceae). En el cribado al azar, dos plantas fueron elegidas: *Vernonia brasiliiana* (L.) Druce y *Eupatorium squalidum* (D.C.) K. et R.



## Capítulo 1

### ALCALOIDES

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

Al estado salvaje, los árboles de *quina* son originarios de la Cordillera Andina donde se encuentran en zonas subtropicales a una altura de 1500 hasta 3000 metros, en la vertiente oriental húmeda.

Recientemente se descubrió la presencia de árboles del género *Cinchona* en alturas mucho más bajas: 200 hasta 300 metros. 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.

Los cuatro principales alcaloides de las *Cinchonas* (quinina, quinidina, cinconina y cinconidina) han sido caracterizados a mediados del siglo XIX.

La quinina es un amino-alcohol cuya estructura (Figura 12) 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).

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).

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.

Al final de la década de los años 1970 se reconocieron sus cualidades en el tratamiento de casos severos y complicados de la malaria provocada por *P. falciparum*.

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.

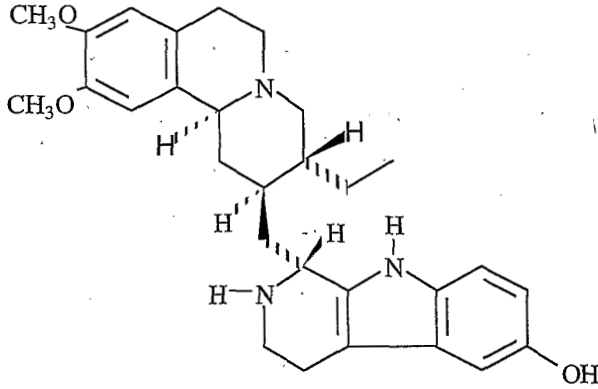
La corteza de *Pogonopus tubulosus* K. Schum. (Rubiaceae), conocida en Bolivia como *quina morada*, es usada tradicionalmente en el Sur del país contra las fiebres palúdicas. Tres alcaloides aislados de la corteza de la planta fueron identificados como: tubulosina (Grellier et al., 1996), psicotrina 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 27), se destaca por su fuerte actividad cuya  $CI_{50} = 0,011 \mu\text{g/ml}$  contra la cepa resistente de *P. falciparum*, una  $CI_{50} = 0,006 \mu\text{g/ml}$  contra la cepa sensible de la misma especie y una dosis eficaz  $50 = 0,45 \text{ mg/kg/4D}$  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).

Los alcaloides aislados en el estudio de la planta boliviana son los mismos que se encontraron en estudios previos (Ma et al., 1990) en *Pogonopus speciosus* (D.C.) Schum., el cual crece en América Central.

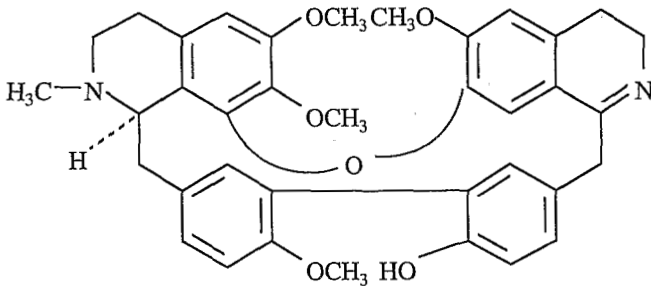
Los resultados químicos proporcionaron argumentos quimio-taxonómicos para la unificación botánica de estas dos especies de Latinoamérica.

**Figura 27**  
*Tubulosina*



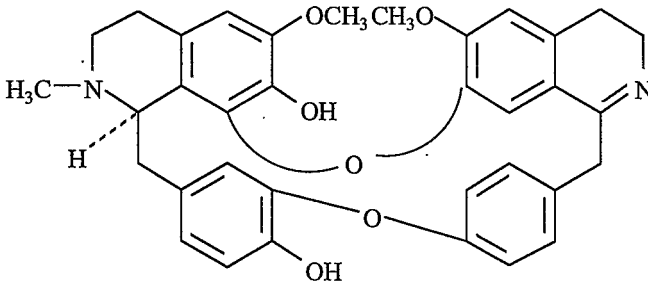
La cordobimina (Wright et al., 1996), un alcaloide de tipo BBIQ (Figura 28) aislado de una planta colombiana del género *Crematosperma* (Annonaceae), se distinguió por su buena actividad antipalúdica. En un estudio general de relación actividad-estructura de BBIQ, la fangchicolina mostró un efecto potencializador interesante (Frappier et al., 1996).

**Figura 28**  
*Cordobimina*



Otra BBIQ, la krukovina (Figura 29) aislada de *Abuta grandifolia* Sandw. (Menispermaceae), un bejuco de la Amazonia 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 29  
Krukovina



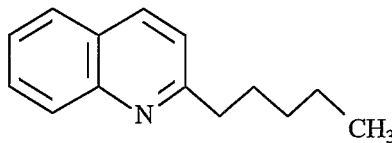
Un alcaloide isoquinoleico aporfínico, la roemrefidina, aislado de *Sparattanthelium amazonum* Mart. (Hernandiaceae) – una liana usada contra las síntomas de la malaria por una etnia boliviana, los Chacobo – mostró una actividad mediana *in vitro* contra cepas sensibles y resistentes de *Plasmodium falciparum*. Su actividad fue confirmada *in vivo* sobre *P. berghei* (Muñoz et al., 1999).

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 un otro grupo nativo de la región, los Mosevenes, como febrífugo.

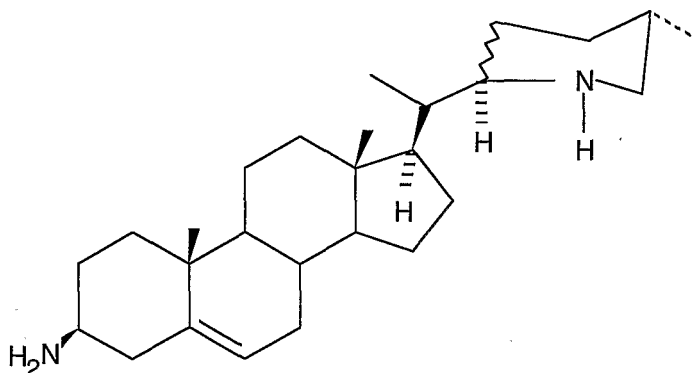
La actividad del extracto de alcaloides totales y de 6 alcaloides de tipo quinolinas substituidas en 2 (Figura 30), sobre *P. vinckei* (Gantier et al., 1996) confirmaron el interés del uso medicinal.

Figura 30  
Quinolinas substituidas en 2



Un alcaloide aminosteroide, la sarachina (Figura 31), ha sido aislado de una otra planta boliviana, *Saracha punctata* Ruíz & Pavón (Solanaceae). Este alcaloide presenta una  $CI_{50}$  de 0,01  $\mu\text{g/ml}$  contra la cepa cloroquina-sensible y una  $CI_{50}$  de 0,07  $\mu\text{g/ml}$  contra la cepa resistente. Este compuesto es también activo *in vivo* contra *P. vinckei* a 100 mg/kg/4J provocando una inhibición del 83% de la parasitemia. Sobre *P. berghei* (NK65) con una dosis de 32 mg/kg/4J, se observa una inhibición del 69% (Moretti et al., 1998).

Figura 31  
*Sarachina*



A partir de la corteza de tallo, de las raíces y de los ramos de *Nectandra salicifolia* (H.B.K.) Nees (Lauraceae), colectada en la selva húmeda de Costa Rica, fueron aislados 16 alcaloides de los cuales 8 aporfínicos conocidos (+)-boldina, (+)-isoboldina, (+)-laurolitsina [(+)-norboldina], (+)-norpurpureina, (+)-norisocoridina, (+)-isocoridina, (+)-laurotetanina, (+)-N-metillaurotetanina, que presentan una  $CI_{50}$  entre 1240 y 7150 ng/ml contra la cepa cloroquina-sensible D6 y una  $CI_{50}$  entre 1680-4480 ng/ml contra la cepa cloroquina-resistente W2 (Böhlke et al., 1996).





## Capítulo 2

### COMPUESTOS GRASOS Y TERPENOS

#### 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).

#### TERPENOS

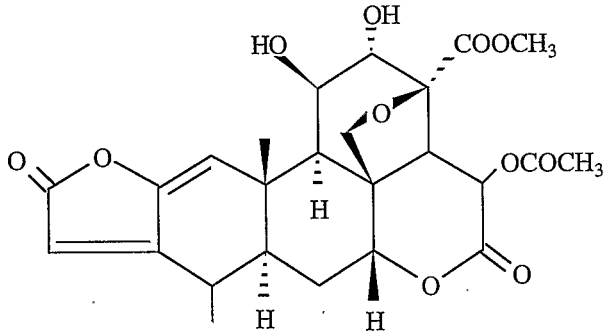
En el cribado de Merck, la familia de las Simaroubaceae es mencionada como la más promisoría por la fuerte actividad antipalúdica de la mayoría de sus miembros.

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

Con concentraciones bajas (0,006 µg/ml), el sergeolido (Figura 32), aislado de *Picrolemma pseudocoffea* Ducke, es capaz de inhibir completamente el crecimiento de cepas de *P. falciparum* sensibles y resistentes a la cloroquina. También, cantidades débiles (0,26 mg/kg/día) reducen la virulencia de la infección del ratón por *P. berghei*.

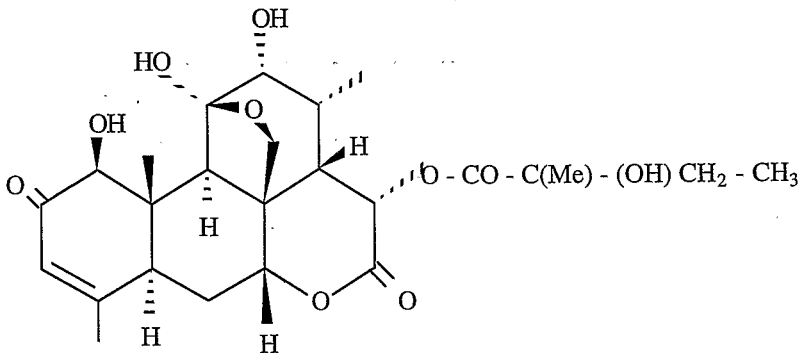
Lastimosamente, el sergeolido no puede ser muy útil para el tratamiento de la malaria debido a su toxicidad aguda elevada (dosis letal 50 = 1,8 mg/kg).

**Figura 32**  
*Sergeolido*



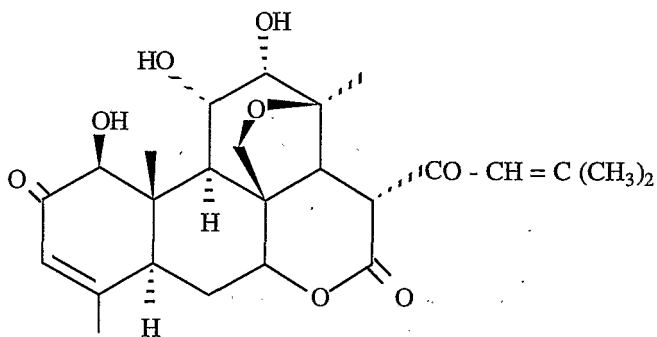
O'Neill et al. (1988) mostraron la actividad antipalúdica de la glaucarubinona (Figura 33) y sus derivados aislados de las frutas de *Simarouba amara* Aubl. colectadas en Panamá. Este trabajo confirmó el interés de esta familia de compuestos pero también su elevada toxicidad.

**Figura 33**  
*Glaucarubinona*



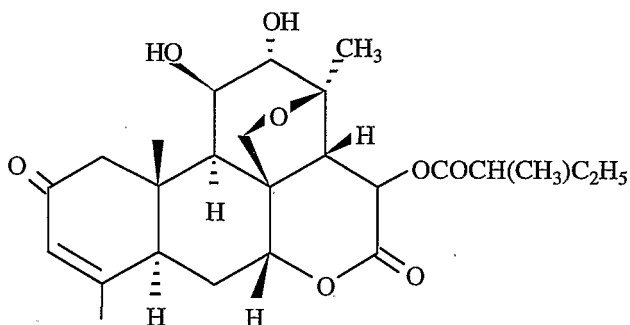
Un trabajo sobre un nuevo quasinoide antimalárico, la gutolactona (Figura 34), se realizó a partir de la corteza de *Simaba guaianensis* Aubl. colectada cerca de Manaus, en Brasil (Cabral et al., 1993).

Figura 34  
Gutolactona



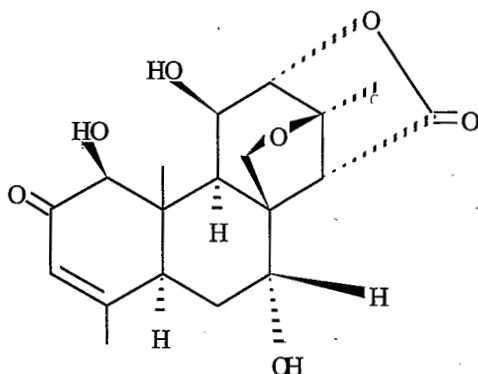
Este compuesto presentó una fuerte actividad antipalúdica *in vitro* similar a la actividad de la simalikalactona D (Figura 35) aislada también de la misma planta y de Simaroubaceae africanas.

Figura 35  
Simalikalactona D



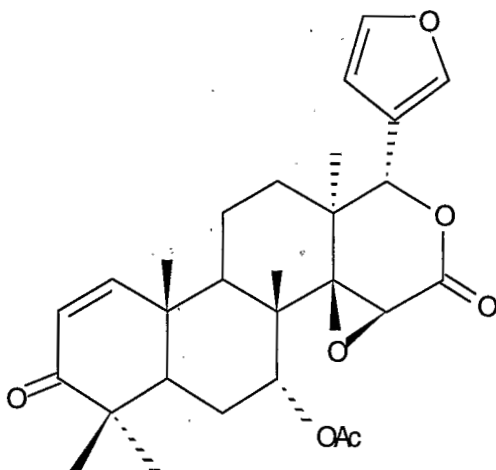
Se comprobó la actividad de un quasinoide (C19), la cedronina (Figura 36) aislada de *Simaba cedron* Planch. de uso popular contra las fiebres en América Latina (Moretti et al., 1994). Este último compuesto parece menos tóxico pero su actividad antipalúdica es de menor interés en comparación con el sergeolido, el cuál se constituye como el más activo de los quasinoideos aislados de plantas americanas.

Figura 36  
*Cedronina*



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 37) tiene una  $CI_{50}$  de 20 ng/ml.

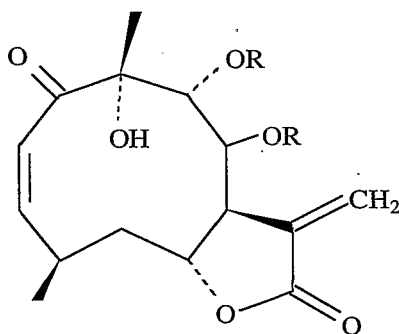
Figura 37  
*Gedunina*



El estudio farmacológico de *Neurolaena lobata* R. Br. está relacionado con la elaboración de la farmacopea caribeña (Proyecto TRAMIL “Investigación Científica y Uso Popular de Plantas Medicinales en el Caribe”) en la cual la planta fue examinada por su uso significativo en Guatemala como antipalúdico. Trabajos realizados en Bolivia presentaron a través de la red electrónica de TRAMIL la actividad antipalúdica *in vivo* de extractos acuosos y clorofórmicos de la planta pero con evidencia de toxicidad (Germosen-Robineau; 1995). Estos resultados fueron confirmados *in vitro* e *in vivo* por otro grupo. Se demostró la actividad de las sesquiterpeno lactonas aisladas de esta Asteraceae, las neuroleninas (Figura 38). François et al. (1996) aislaron las sesquiterpeno lactonas: neurolenina A, B, C, D y lobatina A y B que tienen, *in vitro*, valores de  $CI_{50}$  situadas entre 0,26-6,2  $\mu\text{g/ml}$ . Estos compuestos presentan un cierto grado de toxicidad en relación con el doble enlace cerca del grupo carbonílico del carbono 1.

Un estudio sobre el contenido relativo de distintas cepas de *N. lobata* de Guatemala demostró el carácter variable del contenido en terpenos (Passriete et al., 1998). El poder tóxico o curativo podría depender de la variedad de la planta utilizada.

Figura 38  
Neuroleninas



## CONCLUSION

Varios compuestos presentados en este libro manifiestan actividad antipalúdica *in vitro* e *in vivo*. La mayoría de estos productos son alcaloides o terpenos pero con grandes variaciones en sus estructuras. De muchos de ellos no se van a poder lograr nuevos fármacos por razones de toxicidad, de actividad no específica o simplemente por motivos económicos. No obstante, algunos pueden servir como modelos para sintetizar compuestos más eficaces y otros, asociados con los antimaláricos comerciales, podrían ser utilizados como sinergizantes o potencializadores.

Existen muchos ejemplos de productos o extractos crudos que presentan diferencias de actividad entre los modelos *in vivo* e *in vitro*. Estas diferencias pueden tener varios orígenes. Antes todo, algunas incertidumbres permanecerán siempre sobre la exactitud del uso de las especies tradicionalmente empleadas para curar la malaria, o cualquier tipo de otra enfermedad. En la medicina tradicional indígena, cuando alguien se enferma, se le administra un tratamiento con una planta particular; si la persona no mejora después de pocos días, le se administra otra planta/tratamiento hasta que los síntomas desaparezcan. Por lo tanto, es a veces difícil determinar qué planta es realmente activa contra una sintomatología dada, y ésta es la razón por la cual es más adecuado evaluar la actividad de un conjunto de plantas que una planta sola.

La eficacia de las plantas medicinales, y especialmente de las plantas utilizadas en el tratamiento de malaria, podría también ser relacionada con el nivel de inmunidad de las personas tratadas. En casos de infecciones por *Plasmodium* es bien conocido que las personas que viven en áreas endémicas desarrollan una cierta inmunidad contra este parásito.

Por lo tanto, es posible que una baja actividad observada en los ratones no-inmunes es suficiente para curar la gente inmunizada, o también se puede pensar que algunas especies actúan como inmunomoduladores.

La carencia de actividad *in vivo* de extractos activos *in vitro* podría estar debido a la ruta de administración (en general intraperitoneal) que es diferente de la vía oral tradicional o también los procesos metabólicos ausentes *in vitro*.

Las pruebas desempeñadas en los laboratorios no reflejan las condiciones para la administración de las plantas medicinales *in situ* específicamente, usando materia seca en vez de fresca, usando solventes alcohólicos en vez de agua.

Además muchos de los productos aislados por la metodología química corriente son poco polares a la diferencia de la composición de las infusiones preparadas en forma tradicional. El desarrollo de la química de los compuestos polares es necesario para no dejar de lado estos posibles fármacos solubles en agua.

Finalmente, debemos recalcar que el uso tradicional es para una gran parte de la población la única vía de tratamiento contra el paludismo en zonas endémicas, descuidadas o alejadas.

### Referencias

- Basco, L.K., Ruggeri, C. and LeBras, J. (1994). *Molécules antipaludiques: mécanismes d'action, mécanismes de résistance et relations structure-activité des schizontocides sanguins*, Masson, Paris.
- Böhlke, M., Guinaudeau, H., Angerhofer, C.K., Wongpanich, V., Soejarto, D.D., Farnsworth, N.R., Mora, G.A. and Poveda, L.J. (1996). Costaricine, a new antiplasmodial bisbenzylisoquinoline alkaloid from *Nectandra salicifolia* trunk bark. *Journal of Natural Products*, 59, 577-580.
- Brandao, M.G.L., Grandi, T.S.M., Rocha, E.M.M., Sawyer, D.R. and Krettili, A.U. (1992) Survey of medicinal plants used as antimalarials in the Amazon. *Journal of Ethnopharmacology*, 36, 2, 175-82.
- Cabral, J.A., McChesney, J.D. and Milhous, W.K. (1993) A new antimalarial quassinoid from *Simaba guianensis*. *Journal of Natural Products*, 56, 1954-1961
- Deharo, E., Sauvain, M., Moretti, C., Richard, B., Ruiz, E. and Massiot, G. (1992) Activité antipaludique du n-hentriacontanol isolé de *Cuatrestia* sp. (Solanaceae). *Annales de Parasitologie Humaine et Comparée*, 67, 126-127.



- Fandeur, T., Moretti, C. and Polonsky, J. (1985) *In vitro* and *in vivo* assessment of the antimalarial activity of sergeolide. *Planta Medica*, 1, 20-23.
- François, G., Passreiter, C.M., Woerdenbag, H.J., and Van Looveren, M. (1996) Antiplasmodial activities and cytotoxic effects of aqueous extracts and sesquiterpene lactones from *Neurolaena lobata*. *Planta Medica*, 62, 2, 126-129.
- Frappier, F., Jossang, A., Soudon J., Calvo F., Rasonaivo, P., Ratsmamanga-Urveg, S., Saez, J., Schrével, J. and Grellier, P. (1996) Bisbenzylisoquinolines as modulators of chloroquine resistance in *Plasmodium falciparum* and multidrug resistance in tumor cells. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 40, 1476-1481.
- Gantier, J.C., Fournet, A., Munos, M.H. and Hocquemiller, R. (1996) The effect of some 2-substitued quinolines isolated from *Galipea longiflora* on *Plasmodium vinckei petteri* infected mice. *Planta Medica*, 62, 285-286.
- Gerмосen-Robineau (1995) *Hacia una Farmacopea Caribeña: Monografía Neurolaena lobata*, Enda-caribe, UAG & Universidad de Antoquía, Santo Domingo, 696.
- Grellier, Ph., Ramiamanana, L., Millerioux, V., Deharo, E., Schrével, J., Frappier, F., Trigalo, F., Bodo, B. and Pousset, J.L. (1996) Antimalarial activity of cryptolepine and isocryptolepine, alkaloids isolated from *Cryptolepis sanguinolenta*. *Phytotherapy Research*, 10, 317-321.
- 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, Heidelberg, New York and Tokyo, 60-81.
- Ma, W.W., Anderson, J.E., McKenzie, A.T., Byrn, S.R. and McLaughlin, J.L. (1990) Tubulosine: an antitumor constituent of *Pogonopus speciosus*, 53, 1009-1014. *Journal of Natural Products*, 53, 4, 1009-1014.
- Moretti, C., Deharo, E., Sauvain, M., Jardel, C., Timon David, P. and Gasquet, M. (1994) Antimalarial activity of C19 quassinoid cedronine. *Journal of Ethnopharmacology*, 43, 57-61.
- Moretti, C., Sauvain, M., Lavaud, C., Massiot, G., Bravo, J.A. and Muñoz, V. (1998) A novel antiprotozoal aminosteroid from *Saracha punctata*. *Journal of Natural Products*, 61, 11, 1390-1393.
- Muñoz, V., Sauvain, M., Mollinedo, P., Callapa, J., Rojas, I., Gimenez, A., Valentin, A. and Mallié, M. (1999) Antimalarial activity and cytotoxicity of (-)-roemrefidine isolated from the stem bark of *Sparattanthelium amazonum*. *Planta Medica*, 65, 448-449.
- O'Neill, M., Bray, D.H., Boardman, P., Wrigt, C.W., Phillipson, J.D., Warhurst, D.C., Gupta, M.P., Correya, M. and Solis, P. (1988) Plants as sources of antimalarial drug, Part 6: Activities of *Simarouba amara* fruits. *Journal of Ethnopharmacology*, 22, 2, 183-190.
- Passreire, C.M. and Medillana Aldana, B.E. (1998) Variability of sesquiterpene lactones in *Neurolaena lobata* of different origin. *Planta Medica*, 64, 427-430.
- Rea, L., Gimenez, A., Ruiz, E., Angelo, A., Muñoz, V. and Sauvain, M. (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.

Sauvain, M., Moretti, C., Bravo, J.A., Callapa, J., Muñoz, V., Ruiz, E., Richard, B. and Le Men-Olivier L. (1996). Antimalarial activity of alkaloids from *Pogonopus tubulosus*. *Phytotherapy Research*, 10,198-201.

Spencer, C.F., Koniuski, F.R., Rogers, E.F., Shavel, J., Eanston, N.R., Kaczka, A., Kuehl, F.A., Phillips, R.F., Walti, A. and Folkers, K. (1947). Survey of plants for antimalarial activity. *Journal of Natural Products*, 10,145-174.

Steele, J.C., Simmonds, M.S.J., Veitch, N.C. and Warhurst, D.C. (1999) Evaluation of the antiplasmodial activity of bisbenzylisoquinoline alkaloids from *Abuta grandifolia*. *Planta Medica*, 65, 413-416.

Wright, C.W., Bray, D.H., O'Neill, M.J., Warhurst, D.C., Phillipson, J.D., Quetin-Leclercq, J. and Angenot L. (1991) Antiamoebic and antiplasmodial activities of alkaloids isolated from *Strychnos usambarensis*. *Planta Medica*, 57, 337-340.

Wright, C.W., Phillipson, J.D., Awe, S.O., Kirby, G.C., Warhurst, D.C., Quetin-Leclercq J. and Angenot L. (1996) Antimalarial activity of cryptolepine and some other anhydronium bases. *Phytotherapy Research*, 10, 361-363.



**La presente edición se terminó de imprimir  
en junio de 2000,  
en los talleres Gráficos "Perez"**

**Depósito Legal: 4-1-874-00  
La Paz - Bolivia**

Los últimos informes de la Organización Mundial de la Salud muestran un incremento alarmante de la malaria en el mundo, con 300-500 millones de casos y 1,7-2,5 millones de muertes anualmente. Desgraciadamente, casi todas las regiones endémicas presentan cepas cloroquina-resistentes, la lucha antivectorial es difícil y las perspectivas de una vacuna eficaz prácticamente desaparecieron. Actualmente el control de la malaria se apoya fundamentalmente en el tratamiento antipalúdico. Por lo tanto, la búsqueda de nuevas drogas antipalúdicas -de origen natural, sintético y hemisintético, usadas solas o combinadas- representa una prioridad mundial.

Este manual de *Técnicas de Laboratorio* ha sido escrito para ayudar a todos los que se inician en la quimioterapia experimental antipalúdica.

La experiencia de los autores y de los miembros del laboratorio de Farmacognosía de la Universidad Mayor de San Andrés (La Paz, Bolivia) ha permitido destacar las técnicas y los métodos que tienen mayor aplicación en esta área, para contribuir a brindar éxito en la lucha contra una de las plagas que afectan a los países más pobres del mundo.