



UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

Actividad antimalárica de una preparación tradicional indígena en combinación con fármacos de uso común en la enfermedad

Yinneth Victoria Rodríguez Novoa

Medica veterinaria

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Ciencias, Departamento de Farmacia
Bogotá, Colombia

2016

Actividad antimalárica de una preparación tradicional indígena en combinación con fármacos de uso común en la enfermedad

Yinneth Victoria Rodríguez Novoa

Tesis presentada como requisito parcial para optar al título de:

Magister en Ciencias Farmacología

Director:

Ph.D., Giovanni Garavito Cárdenas

Línea de Investigación:

Farmacología de las terapias antiparasitarias empleadas en medicina tradicional y
popular

Grupo de Investigación:

“Farmacología de medicina tradicional y popular” FaMeTra

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Ciencias, Departamento de Farmacia

Bogotá, Colombia

2016

La enfermedad de la malaria nació cuando el mundo era oscuridad y estaba solo, aún no había hombres sino animales-hombre, entre ellos los dioses murciélago (yine), de su orina nacieron los hombres sancudo. Y existió un sancudo grande que tuvo su mujer y la amaba, pronto tendrían hijos. Pero un día la gente de la nutria en un acto de maldad tomo a la mujer del sancudo y la mató abriendo su vientre, cuando el sancudo vio tal atrocidad, maldijo al mundo con enfermedad, y del vientre de su esposa salió la malaria “andarán mis hijos por toda la tierra repartiendo enfermedad, vengando la muerte de su madre”.

*Cuento indígena relatado por Jesús García
Indígena de la etnia Muinane*

Tienes que hacer las cosas que no crees que eres capaz de hacer – Elenore Roosevelt

A Dios

A Víctor Franco prueba irrefutable de que Dios existe... y me ama.

A mi mamá por ser la mujer más inteligente y bondadosa.

A Mina, Mango, Pancho y Mostaza

Agradecimientos

A Víctor Hugo Franco, por amarme de una forma sobre humana tanto así que a su lado se alivia cualquier dolor del cuerpo y del alma, por acompañarme en todo momento y ser mi fortaleza para comenzar y culminar cada proyecto.

A mi Mamá, por ayudarme a pesar de todo, por ser paciente y seguir adelante.

A mi director Giovanni Garavito Cárdenas por las enseñanzas y consejos académicos y personales, por permitirme trabajar con la comunidad ciudad Hitoma una de las mejores experiencias de mi vida.

Al Abuelo José Octavio García por sus innumerables enseñanzas y buenos deseos. Por su colaboración y permiso para trabajar en este proyecto.

A Jesús García Tejada por ofrecerme una amistad grandiosa y regalarme un poco de su sabiduría. Por su fundamental colaboración y permiso para trabajar en este proyecto.

A José García Tejada, a la abuela Rosa Tejada y a Mauricio García, por permitirme entrar a sus vidas y colaborar en todo lo posible.

A Vanessa Otero Jiménez por toda su ayuda y enseñanzas académicas, por sus consejos de vida, por preocuparse por mí, porque su amistad es uno de los más grandes regalos que obtuve al hacer la maestría.

A Zully Rodríguez y Helena Arias por todos los buenos momentos, por lo aprendido juntas, porque son mujeres fuertes y valientes que lo merecen todo.

A la profesora Yolima Baena, por todas las enseñanzas, por confiar en mi trabajo y permitirme trabajar a su lado.

A Jorge Hernández por sus comentarios siempre en pro de una mejor investigación

A Magda y Ela por toda la colaboración proporcionada.

Al profesor Luis Fernando Ospina por toda la colaboración para la realización de los ensayos *in vivo*.

Al profesor Pablo Palacios por su colaboración en la sede Leticia de la Universidad Nacional de Colombia

A Lina María Mora, Diana Verónica Ortiz y Pedro José Moreno, por ser mis amigos por tantos años, por compartir infinidad de risas y algunas preocupaciones; porque ellos están siempre en mis mejores recuerdos.

Al grupo de Investigación FaMeTra Farmacología de Medicina Tradicional y Popular, por el apoyo financiero para la realización de este proyecto.

Al programa Joven Investigador de Colciencias por su apoyo a través de la convocatoria 617 de 2013

A la Universidad Nacional de Colombia por ser recinto de toda mi vida académica.

Y por último pero no menos importante quiero agradecer a los animales que dieron su vida por esta investigación, espero haber demostrado mi respeto y afecto hacia ellos generándoles la mejor calidad de vida dentro de lo posible.

Resumen

La presente investigación tuvo como objetivo contribuir a la validación de la actividad antimalárica de una preparación tradicional (RT) a base de *Curarea Toxicofera* (Wedd). Barneby & Krukoff, utilizada como antimalárico por la comunidad indígena Ciudad Hitoma del Amazonas Colombiano, adicionalmente se planteó evaluar el tipo de interacción que se presenta tras la administración conjunta con cloroquina (CQ) y artesunato (AS) dos medicamentos de uso común en la enfermedad.

Con el fin de valorar la actividad antiplasmodial de RT, CQ y AS, se empleó en el modelo *in vitro*, el ensayo de inhibición de la invasión y desarrollo del parásito, empleando la cepa FCR-3 de *Plasmodium falciparum* y para evaluar la actividad antimalárica se utilizó el modelo de malaria murina "Test de Peters" cepa *P. berghei* ANKA los anteriores modelos farmacológicos se encuentran actualmente optimizados por el grupo de investigación FaMeTra.

Para la evaluación de las interacciones entre el RT y CQ y entre el RT y AS, se emplearon los mismos modelos farmacológicos con algunas adaptaciones requeridas para las pruebas. Los resultados de las combinaciones dieron como respuesta *in vitro*, sinergismo para RT-CQ y aditividad para RT-AS; los resultados *in vivo* dieron como interacción aditividad para las dos combinaciones. Siendo un resultado positivo y promisorio tanto para el RT como posible antimalárico, como para la combinación de este con los fármacos mencionados.

Palabras clave: Malaria, medicina tradicional, antimaláricos, etnofarmacología, Plasmodium, sinergismo, antagonismo, Interacciones de Droga-Fármaco, Interacciones de Hierba-Droga.

Abstract

The research had as an objective to contribute to the validation of the antimalarial activity of a traditional preparation based of *Curarea Toxicofera* (Wedd). Barneby & Krukoff (RT), used as antimalarial by the indigenous community *ciudad Hitoma* from the Colombian amazon. In addition, it was raised the type of interaction that was developed when it was delivered in companion of chloroquine (CQ) and artesunate (AS), two medicines commonly used in the treatment of malaria.

In order to evaluate the antiplasmodial of RT, CQ and AS the *in vitro* model, inhibition of the invasion essay and the development of the parasite using the strain FCR-3 of *Plasmodium falciparum* and to evaluate the antimalarial activity the model *Murina* "Peters test", strain *P.Berghel* ANKA was used. The previous pharmacological models were optimized by the research group FaMeTra.

For the evaluation of the interaction between RT and CQ, and between the RT and AS, the previous pharmacological models were used, with some required adaptations for the tests. The results of the combinations gave as an *in vitro* result, synergism for RT-CQ and additivity for RT-AS, the *in vivo* results gave as interaction additivity for both combinations. Being a positive and promissory result for both RT as a possible antimalarial, and for its combination with the mentioned drugs.

Key Words:

Malaria, Traditional medicine, antimalarial, ethnopharmacology, *Plasmodium*, synergism, antagonism, drug-drug interaction, herb-drug interaction

Contenido

	Pág.
Resumen	IX
Lista de figuras	XIII
Lista de tablas	XIV
Lista de abreviaturas	XV
Introducción	1
1. Marco Teórico	5
1.1 Malaria	5
1.1.1 Malaria en Colombia.....	7
1.1.2 Ciclo biológico del parásito.....	10
1.1.3 Síntomas y Fisiopatología	12
1.1.4 Tratamiento.....	14
1.1.5 Resistencia a fármacos	16
1.1.6 Interacciones fármaco-medicinas herbales	18
1.2 Etnofarmacología y medicina tradicional	22
1.2.1 Malaria y medicina tradicional	23
1.2.2 Protección al conocimiento médico tradicional.....	24
1.3 Comunidades indígenas en Colombia.....	26
1.4 <i>Curarea toxicofera</i> (Wedd). Barneby & Krukoff	279
2. Materiales y Métodos	33
2.1 Acceso a la comunidad	33
2.1.1 Recolección del material vegetal y preparación del remedio tradicional.....	34
2.2 Evaluación de las interacciones <i>in vitro</i>	34
2.2.1 Evaluación de la actividad antiplasmodial	34
2.2.2 Cálculo de concentraciones inhibitorias 50	35
2.2.3 Ensayos de combinación	37
2.3 Evaluación de las interacciones <i>in vivo</i>	39
2.3.1 Evaluación de la actividad antimalárica	39
2.3.2 Cálculo de dosis inhibitorias 50.....	41
2.3.3 Ensayos de combinación	41
3. Resultados	43

3.1	Acceso a la comunidad	43
3.1.1	Socialización del proyecto	43
3.1.2	Recolección del material vegetal y preparación del remedio tradicional	45
3.1.3	Medicina tradicional indígena en la comunidad ciudad Hitoma	47
3.1.4	La malaria conocimientos, usos y actitudes	49
3.1.5	Otras actividades importantes	49
3.2	Evaluación de las interacciones <i>in vitro</i>	52
3.2.1	Evaluación de la actividad antiplasmodial y cálculo de concentraciones inhibitorias 50	52
3.2.2	Ensayos de combinación	54
3.3	Evaluación de las interacciones <i>in vivo</i>	57
3.3.1	Evaluación de la actividad antimalárica y cálculo de dosis inhibitorias 50	57
3.3.2	Ensayos de combinación	58
4.	Discusión.....	63
5.	Conclusiones y recomendaciones	77
5.1	Conclusiones	77
5.2	Recomendaciones.....	78
A.	Anexo 1: Procedimiento operacional estándar para el descongelamiento y mantenimiento de cultivo de <i>Plasmodium falciparum</i>.....	79
B.	Anexo 2: Procedimiento operacional estándar para el desarrollo de la actividad antiplasmodial <i>in vitro</i>.....	87
C.	Anexo 3: Procedimiento operacional estándar para el desarrollo de la prueba supresiva de 4 días (Test de Peters) de actividad antimalárica.....	93
D.	Anexo 4 : Plegable socialización de resultados previos con la comunidad....	101
E.	Anexo 5: Consentimiento informado previo	103
F.	Anexo 6: Fragmento de la respuesta ante el radicado de consulta previa frente al Ministerio del Interior	105
G.	Anexo 7: Clasificación taxonómica.....	107
	Bibliografía	109

Lista de figuras

	Pág.
Figura 1-1:	Malaria en la región de las Américas por índice parasitario anual (IPA). .. 8
Figura 1-2:	Ciclo de vida del <i>Plasmodium</i> 11
Figura 1-3:	Transportadores y enzimas implicadas en los medicamentos antimaláricos..... 20
Figura 1-4:	Ubicación geográfica de los resguardos indígenas, territorios colectivos de comunidades negras (TCCN) y Kumpanias del pueblo Rom. 27
Figura 1-5:	Clasificación taxonómica de <i>Curarea toxicofera</i> (Wedd). Barneby & krukoff..... 30
Figura 2-1:	Diseño de placa para montaje de ensayos de combinación <i>in vitro</i> 38
Figura 2-2:	Representación gráfica de un isoblograma..... 39
Figura 3-1:	Bejuco <i>Curarea toxicofera</i> (Wedd). Barneby & Krukoff. Recién cortado.46
Figura 3-2:	Maceración (Jesús García) y cocción del bejuco..... 47
Figura 3-3:	Maloka..... 51
Figura 3-4:	Gráficas concentración- respuesta ensayos <i>in vitro</i> . Lectura por microscopía..... 52
Figura 3-5:	Graficas concentración- respuesta ensayos <i>in vitro</i> . Lectura por fluorometría..... 53
Figura 3-6:	Isoblograma combinación RT-CQ, resultados de tres ensayos independientes..... 55
Figura 3-7:	Límites del IC con una confianza de 95% RT-CQ..... 55
Figura 3-8:	Isoblograma combinación RT-AS, resultados de tres ensayos independientes..... 56
Figura 3-9:	Límites del IC con una confianza de 95% RT-AS..... 56
Figura 3-10:	Ensayo combinación RT- CQ <i>in vivo</i> , Test de Peters, Cepa <i>P. berghei</i> ANKA. Método de lectura fluorometría..... 59
Figura 3-11:	Ensayo combinación RT- AS <i>in vivo</i> , Test de Peters, Cepa <i>P. berghei</i> ANKA. Método de lectura fluorometría..... 60

Lista de tablas

	Pág.
Tabla 1-1: Casos estimados de malaria y muertes a consecuencia de esta para 2015.....	6
Tabla 1-2: Hallazgos clínicos y de laboratorio que clasifican el caso de malaria como malaria complicada.	12
Tabla 1-3: Fármacos antimaláricos en Colombia.....	14
Tabla 2-1: Tratamientos empleados en la evaluación <i>in vivo</i> de la combinación RT-CQ.....	42
Tabla 2-2: Tratamientos empleados en la evaluación <i>in vivo</i> de la combinación RT- AS.....	42
Tabla 3-1: CI ₅₀ de las sustancias evaluadas en el ensayo de Inhibición de la invasión y el desarrollo de <i>P. falciparum</i> cepa FCR-3 por microscopía.....	54
Tabla 3-2: CI ₅₀ de las sustancias evaluadas en el ensayo de Inhibición de la invasión y el desarrollo de <i>P. falciparum</i> cepa FCR-3 por fluorometría.....	54
Tabla 3-3: DI ₅₀ ensayo <i>in vivo</i> , Test de Peters, Cepa <i>P. berghei</i> ANKA.....	57
Tabla 3-4: Mortalidad en el ensayo DI ₅₀ del RT.....	57
Tabla 3-5: Mortalidad en el ensayo DI ₅₀ de CQ.....	58
Tabla 3-6: Mortalidad en el ensayo DI ₅₀ de AS.....	58
Tabla 3-7: Mortalidad para el ensayo de combinación RT-CQ.	59
Tabla 3-8: Mortalidad para el ensayo de combinación RT-AS.....	61

Lista de abreviaturas

Abreviaturas

Abreviatura	Término
ANOVA	Análisis de varianza
AS	Artesunato
CI ₅₀	Concentración Inhibitoria 50
COL	Número de colección en Herbario Nacional Colombiano
CQ	Cloroquina
cRPMI	RPMI completo. con adición de plasma
CYPs	Enzimas complejo citocromo P 450
DE	Desviación estándar
DI ₅₀	Dosis Inhibitoria 50
DMSO	Dimetil sulfóxido
FaMeTra	Farmacología de la Medicina Tradicional y Popular
FCR-3	Cepa cloroquinoresistente de <i>P. falciparum</i> (Gambia)
FIC	Concentración inhibitoria fraccional
<i>g</i>	Gravedades
G6PD	Glucosa -6- fosfato-deshidrogenasa
GPS	Global Position System
GRP	Glóbulos rojos parasitados
GRS	Glóbulos rojos sanos
HEPES	4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid
IC	Índice de combinación
INCORA	Instituto Colombiano de la Reforma Agraria
INS	Instituto Nacional de Salud
Ip	Intraperitoneal
Kg	Kilogramo
Log	Logaritmo base diez
min	Minutos
mL	Mililitros
MDR	sistemas transportadores de multiresistencia (multidrug-resistance)
OMS	Organización Mundial de la Salud
OPS	Organización Panamericana de la Salud
P-gp	Glicoproteína P
P.I.	Propiedad intelectual

Abreviatura	Término
RITAM	Research Initiative on Traditional Antimalarial Methods (Iniciativa de Investigación sobre Métodos antipalúdicos tradicionales)
ROS	Especies reactivas de oxígeno
RPMI	Medio Roswell Park Memorial Institute
RT	Remedio tradicional a partir de la cocción de <i>Curarea toxicofera</i> (Wedd.) Barneby & Krukoff
Sivigila	Sistema Nacional de Vigilancia en Salud Pública
Transportadores	Transportadores de membrana
ABC	dependientes de ATP
URF	Unidades Relativas de Fluorescencia
VIH	Virus de la inmunodeficiencia humana
m.s.n.m.	Metros sobre el nivel del mar
nM	Nanomolar
μM	Micromolar
μL	Microlitros
PBS	Phosphate buffered saline (Tampón fosfato salino)

Introducción

En Colombia, la malaria continua siendo un grave problema de salud pública, debido a que cerca del 85% del territorio rural está situado por debajo de los 1.500 metros sobre el nivel del mar, donde se presentan condiciones climáticas, geográficas y epidemiológicas aptas para la transmisión de la enfermedad; según plantea el comunicado “25 de Abril, Día mundial de la malaria” del Instituto Nacional de Salud (INS), cerca del 60% de la población colombiana se encuentra en riesgo de enfermar o morir por esta causa, (de la Hoz, F. 2013).

A pesar que la enfermedad está determinada principalmente por el clima y la ecología y no por la pobreza en sí misma, el impacto recae en poblaciones con ingresos bajos (Cruz Roja, 2009), por lo que la malaria representa un problema social y económico de gran importancia para el país; adicionalmente la falta de una vacuna eficaz y la creciente expansión de parásitos resistentes a antimaláricos comunes y de bajo costo, dificultan el control de la enfermedad (de Andrade-Neto *et al.*, 2007).

Todo este panorama hace imperativo la búsqueda de opciones que permitan una mejor intervención frente al desarrollo de la malaria; en este contexto y contando con la recomendación de la Organización Mundial de la Salud (OMS, 2011) acerca de la implementación de combinaciones terapéuticas, como estrategia en contra del desarrollo de parásitos resistentes, podemos pensar en nuevas alternativas enfocadas a las dinámicas propias del país y uso sostenible de nuestros recursos naturales; Colombia es un país multicultural y megadiverso con un arraigo tradicional y una relación estrecha entre las poblaciones y la naturaleza (Universidad Nacional de Colombia. 2013), lo cual genera oportunidades para aprovechar el conocimiento de la medicina tradicional, acumulado en los habitantes de regiones donde la malaria es endémica; un claro ejemplo de la medicina tradicional indígena frente a la malaria es el que nuestro grupo de investigación FaMeTra (Farmacología de la Medicina Tradicional y popular) ha podido conocer con la comunidad indígena Ciudad Hitoma y su médico tradicional José Octavio

García (*Hitoma safiama*), gracias al él hemos tenido la fortuna de evidenciar las propiedades farmacológicas de las plantas utilizadas por la comunidad en el tratamiento de la enfermedad.

A partir de resultados previos del grupo de investigación (Cárdenas, 2011), continuamos profundizando en otros aspectos relacionados con la práctica ancestral médica como es la combinación de medicamentos y remedios hechos a partir de plantas, todo esto justificado en que las poblaciones cada vez se encuentran más expuestas a terapias farmacológicas occidentales, situación que induce a la combinación de tratamientos tradicionales con medicamentos de uso común en la enfermedad, sin conocer las posibles interacciones y su desenlace tanto terapéutico como toxicológico. Tales interacciones entre hierbas y fármacos pueden implicar la inhibición de las enzimas que metabolizan el fármaco y/o transportadores de fármacos que resultan en un aumento o disminución de los niveles de una o de ambas sustancias conduciendo a reacciones adversas (Venkataramanan, Komoroski, y Strom, 2006) o a benéficas (Lin, 2014).

De esta manera, como primer paso se registra el uso un bejuco selvático *Curarea toxicofera* (Wedd.) Barneby & Krukoff, empleado en decocción para el tratamiento de los pacientes con malaria, posteriormente se seleccionan dos medicamentos de uso común en la enfermedad, recomendados para el tratamiento de la misma en Colombia: cloroquina y artesunato y mediante modelos de farmacología experimental se evaluó la actividad antiplasmodial *in vitro* empleando el modelo de cultivo de *P. falciparum* y la actividad antimalárica *in vivo* a través del modelo de malaria murina, estableciendo las concentraciones inhibitorias 50 (CI_{50}) y las dosis inhibitorias 50 (DI_{50}) del remedio tradicional y de los dos fármacos valorados en combinación con el remedio tradicional estableciendo el tipo de interacción, *In vitro e in vivo*.

Nuestro proyecto busco avanzar en la validación del uso como antimalárico de una preparación tradicional, mediante metodologías de la investigación occidental, enfocadas en las interacciones con fármacos de uso clínico para el tratamiento de la malaria, aportando evidencias experimentales que den soporte al uso que se presenta en zona endémica de remedios tradicionales concomitantemente con medicamentos convencionales. Los resultados obtenidos se retornaron a la comunidad bajo los

lineamientos del Protocolo de Nagoya (Secretaría del Convenio Sobre la Diversidad Biológica, 2011).

Objetivos

Objetivo general

Aportar a la validación de la actividad antimalárica de una preparación tradicional, evaluando las interacciones con fármacos de uso común en la enfermedad, mediante metodologías de investigación occidental.

Objetivos específicos

Profundizar y documentar el modo de empleo de una preparación tradicional antimalárica, obteniendo una muestra de dicha preparación.

Evaluar comparativamente la actividad antiplasmodial *in vitro* del remedio tradicional en combinación con los medicamentos antimaláricos comunes.

Evaluar comparativamente la actividad antimalárica *in vivo* del remedio tradicional en combinación con los medicamentos antimaláricos comunes

1. Marco Teórico

1.1 Malaria

El paludismo o malaria es una enfermedad potencialmente mortal causada por parásitos protozoarios del género *Plasmodium* entre los que se encuentran infectando al humano: *P. falciparum*; *P. vivax*; *P. malariae* y *P. ovale*, dichos parásitos se transmiten por la picadura de mosquitos hembra del género *Anopheles* infectados, los llamados vectores del paludismo, que pican generalmente entre el anochecer y el amanecer, existen alrededor de 400 especies diferentes de mosquitos *Anopheles*, pero sólo 30 de ellas son de importancia en salud pública (OMS, 2015c).

El parásito de la malaria fue descubierto en el norte de África por Alphonse Laveran en 1880, posteriormente se identificaron tres especies distintas: *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*, y *Plasmodium malariae*; en 1898 el modo de transmisión en las aves fue revelado por Ronald Ross y 2 años más tarde se describe en los seres humanos por Battista Grassi (Meunier, 2014). *Plasmodium ovale* fue descubierto en 1922 por John William Watson Stephens, en 1948 Henry Edward Shortt y Percy Cyril Claude Garnham mostraron que algunas etapas de la evolución del parásito toman lugar en el hígado, donde *P. ovale* y *P. vivax* permanecen latentes (Meunier, 2014). La raza humana y los parásitos de la malaria han tenido una larga evolución huésped-parásito a través de los siglos, soportando hipótesis que infieren que el aumento de asentamientos de poblaciones humanas, las diásporas de las mismas y el desarrollo intensificado de la agricultura son patrones asociados al desarrollo de la enfermedad. (Hay, Guerra, Tatem, Noor y Snow, 2004).

La malaria actualmente se considera una enfermedad intertropical que afecta a unos 207 millones de personas en el mundo, alrededor del 90% de las muertes se producen en África y el 77% son niños menores de 5 años de edad (OMS, 2015c). Dos mil millones de

personas (un tercio de la población) viven en zonas endémicas y mil millones llevan o han llevado al parásito en algún momento de sus vidas. (Meunier, 2014; Teng, Kiat, Suwanarusk, y Koh, 2016). La estimación del número de casos y muertes en diferentes partes del mundo en el año 2015 se muestra en la Tabla 1-1.

Tabla 1-1: Casos estimados de malaria y muertes a consecuencia de esta para 2015. (OMS, 2015c)

Región	Número de casos estimados	Número de muertes estimadas por malaria
África	188 millones	395.000
América	660.000	500
Oriente medio	3.900.000	6.800
Sudeste asiático	20 millones	32.000
Pacífico occidental	1.500.000	32.000
Total Mundial	214 millones	438.000

La malaria por *P. falciparum* y *P. vivax* suponen el mayor reto en salud pública; *P. falciparum* se encuentra con mayor frecuencia en el continente africano, y es el responsable de la mayoría de las muertes por malaria, *P. vivax* tiene una distribución geográfica más amplia y está mayormente distribuido en áreas fuera de África ya que puede desarrollarse en el vector a temperaturas más bajas logrando sobrevivir en altitudes mayores (OMS, 2015c). *P. vivax* tiene un estadio hepático latente (hipnozoítos) que se puede reactivar meses después la picadura inicial causando recaídas y permitiendo que el protozoario sobreviva durante largos períodos de tiempo aun cuando el vector no esté presente (OMS, 2015c).

Adicional a la distribución geográfica hay otros factores asociados a la presencia de la enfermedad como son: la calidad de los programas de salud pública y su capacidad de diagnóstico; el control y mitigación de brotes epidémicos; el acceso de la población a una atención de salud eficaz y preventiva; la infraestructura de drenaje de aguas residuales; la demografía y los patrones migratorios de población (Poveda *et al.*, 2011); el conflicto armado que da lugar a grandes movimientos de refugiados y desplazamientos a través

de áreas endémicas (Bourdy *et al.*, 2007); condiciones climáticas y ambientales (Zhou, Minakawa, Githeko y Yan, 2004; Poveda *et al.*, 2011); y por último factores socioeconómicos determinantes, incluyendo los niveles de pobreza (Bourdy *et al.*, 2007) desnutrición, niveles bajos de educación y el analfabetismo (Poveda *et al.*, 2011).

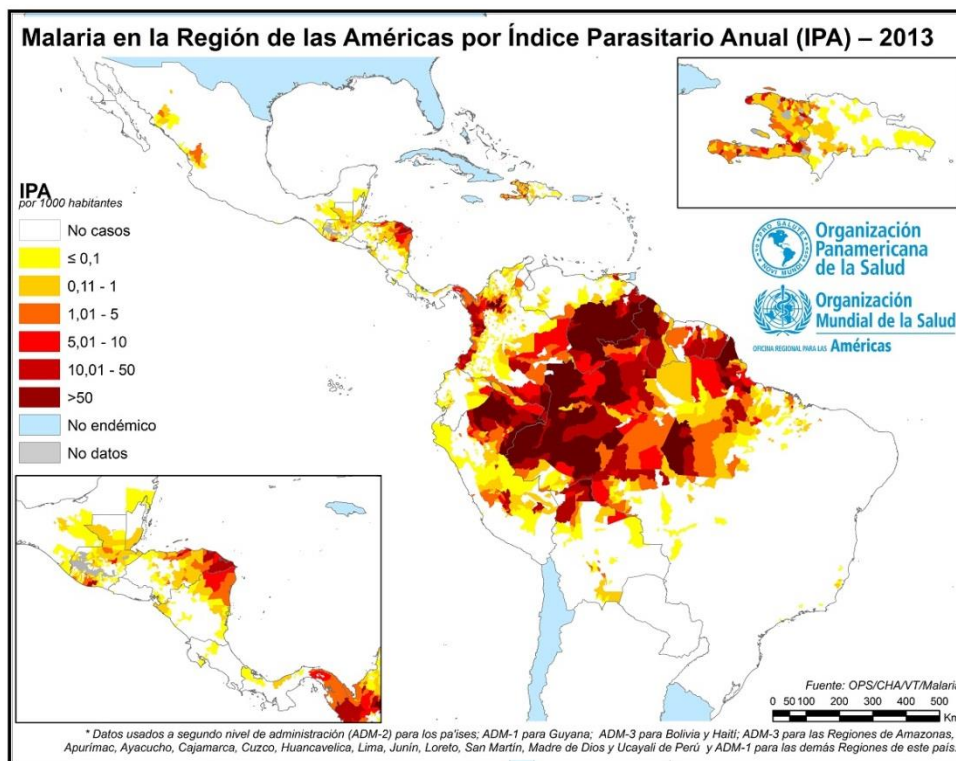
La malaria intensiva se limita a la zona tropical y la zona subtropical, siendo la pobreza también geográficamente específica de este sector (Gallup y Sachs, 2001). A pesar de lo descrito, la malaria se determina principalmente por el clima y la ecología, no por la pobreza en sí, aunque esta parece estar de la mano con la enfermedad impidiendo el progreso (interfiriendo con el trabajo y la educación de la población) y a su vez la pobreza impide el mejoramiento de los sistemas de salud (Gallup y Sachs, 2001).

A pesar de la situación aún apremiante, en el último reporte de malaria de la OMS se observa, en los últimos 5 años, una disminución importante de los casos de malaria y de las muertes por esta en un 18% y un 48% respectivamente debido a la implementación de programas de control del vector (insecticidas y mosquiteros), de cobertura médica con diagnóstico oportuno y diferencial de la especie infectante y tratamientos basados en la combinación de medicamentos, adicionalmente el mejoramiento de condiciones infantiles como el peso al nacer, la desnutrición infantil y programas de manejo de enfermedades concomitantes como la infección respiratoria aguda y el VIH han ayudado a reducir la malaria (OMS, 2015c). Lo cual demuestra que los planes de acción son efectivos y no se deben dejar de impartir, con la esperanza de continuar reduciendo los casos de enfermedad y de dar la opción a países en desarrollo de crecer económicamente sin el lastre de la malaria.

1.1.1 Malaria en Colombia

En América hay transmisión de paludismo en nueve países de la región que comparten la selva amazónica y en ocho países de América Central y el Caribe, las características de transmisión son muy variables entre países, regiones e incluso en un mismo país (Instituto Nacional de Salud INS, 2016b). En la figura 1-1 se observa un mapa descriptivo del índice parasitario anual para Latinoamérica en 2013.

Figura 1-1: Malaria en la región de las Américas por índice parasitario anual (IPA). (Organización Panamericana de la Salud OPS, 2013).



En sur América se listan en orden de número de casos reportados, Brasil con aproximadamente el 42%, Venezuela con el 18% y Colombia con 12% de los casos (Ministerio de Salud y Protección Social-MINSALUD, s.f). Según el boletín epidemiológico semanal (Semana epidemiológica número 06 de 2016) del Instituto Nacional de Salud se han notificado al Sistema Nacional de Vigilancia en Salud Pública (Sivigila) en el país 8.119 casos de malaria hasta el momento de la publicación, de los cuales el 62,2% se asociaron a *P. falciparum*, el 36,1% a *P. vivax* y el 1,6% a infecciones mixtas, los principales departamentos de donde proceden los reportes son Chocó, Nariño, Antioquia, Amazonas y Valle (INS, 2016a).

En Colombia se reportan como vectores de la enfermedad *Anopheles albimanus*, *A. neinai*, *A. pseudopunctipennis*, *A. nuñeztovari* y el *A. darlingi* (OPS, 2011), los cuales se localizan en altitudes inferiores a 1.000 m.s.n.m, asociados con las regiones donde hay

predominio de la enfermedad, constituyendo interacciones ecosistema-enfermedad propicios para la permanencia de la malaria; En el país la morbilidad por malaria en los últimos treinta años ha mantenido una tendencia ascendente, predominando los casos producidos por la especie *Plasmodium vivax* (60-65%), aunque en regiones como la costa pacífica la relación favorece a *Plasmodium falciparum* (INS, 2016b); las áreas rurales con cargas de enfermedad altas están enmarcadas en tres principales áreas, el foco de Urabá - Bajo Cauca – Sur de Córdoba; el foco de la Costa Pacífica y el foco de transición de la Orinoquia-Amazonía (MINSALUD, s.f).

Nuestro país tiene un clima y una variabilidad hidro-climatología que hacen que su predisposición a la malaria sea relevante, especialmente los cambios interanuales relacionados con los fenómenos del niño (fase de calentamiento) y el fenómeno de la niña (fase fría) que describen tendencias importantes para el aumento de la incidencia y la prevalencia de la enfermedad en épocas de calor, esto sumado al calentamiento global y la deforestación, que incrementa la reproducción del vector en zonas rurales (Poveda, 2011) y en zonas con alturas antes no afectadas. Algunos de los factores biológicos y climáticos que influyen en el país son en primer lugar, la calidad y la distribución de aguas superficiales y los lugares de reproducción de insectos; segundo la temperatura y la humedad lo que afecta el ciclo de vida del mosquito y del parásito dentro del vector; en tercer lugar el impacto en los ecosistemas de depredadores de insectos que podrían controlar las poblaciones de mosquitos y en cuarto lugar, la deforestación y el cambio de uso del suelo que contribuyen a aumentar la temperatura del aire y a colonizar zonas selváticas donde la transmisión es mayor (Poveda, 2011).

Por lo tanto el manejo multidisciplinario abarcando áreas como el trabajo social, la medicina, la farmacología y la ecología entre otras es indispensable para afrontar los brotes epidémicos de los cuales el país es objeto, el entendimiento del efecto antrópico negativo sobre los ecosistemas y los perjuicios en la salud que estos desencadenan, son una opción para el cambio y el fortalecimiento de los programas de salud pública que se encuentran en marcha frente a la lucha contra la malaria en Colombia.

1.1.2 Ciclo biológico del parásito

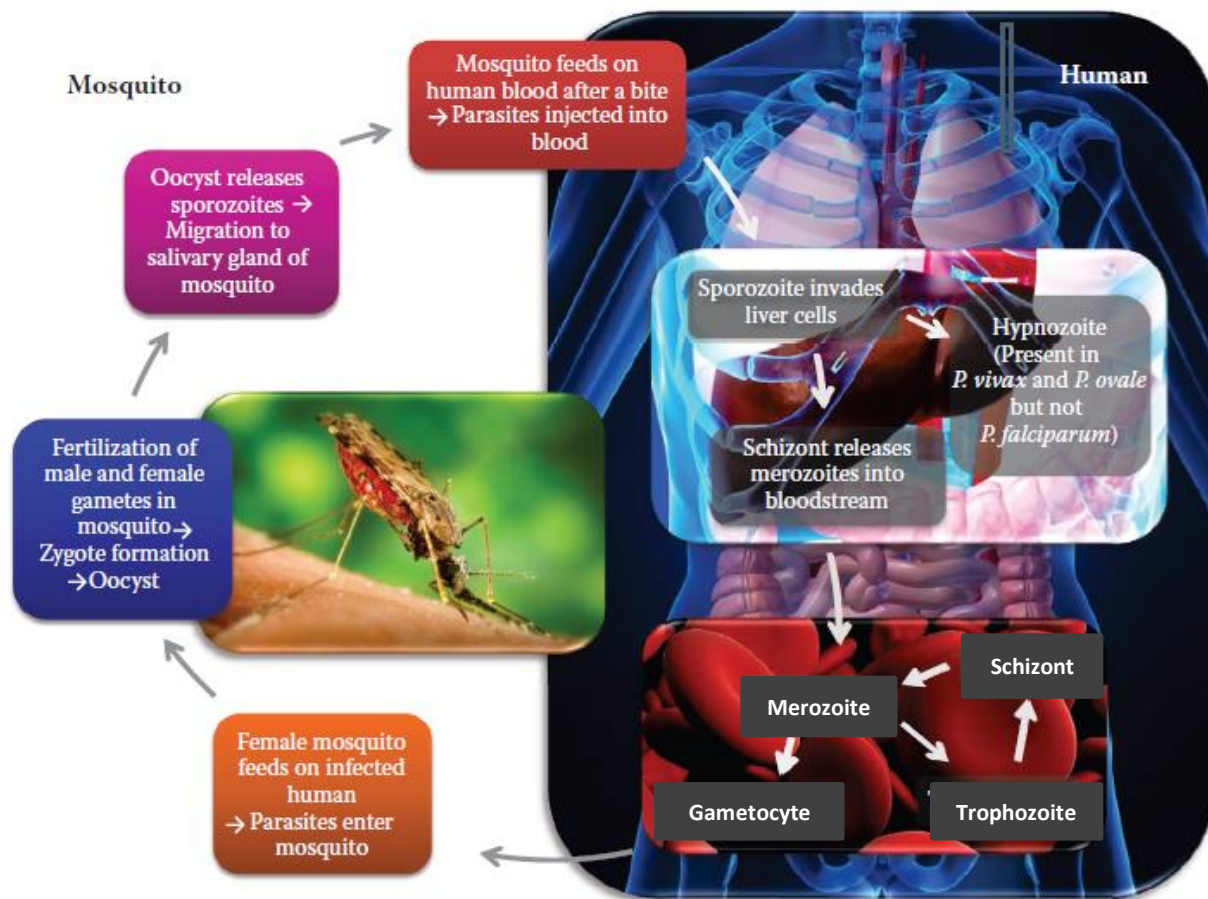
La malaria es transmitida por la hembra del mosquito *Anopheles* de la familia Culicidae, hasta hace un par de años se contaban 4 especies infectantes en humanos *P. falciparum* (el más mortal), *P. vivax*, *P. ovale* y *P. malariae*, recientemente se ha evidenciado la transmisión a humanos de *P. knowlesi*, un parásito que produce malaria en monos del sudeste de Asia y se ha establecido como la quinta especie causante de malaria en humanos. (OMS 2015c; Teng *et al.*, 2016).

Dos hospederos son necesarios para completar el ciclo del *Plasmodium*, diferenciando dos fases, la fase esquizogónica o asexual que se lleva a cabo en el mamífero, en este caso en el humano (hospedero intermediario) y la fase esporogónica asociada a la replicación sexual la cual se presenta en el mosquito *Anopheles* (hospedero definitivo). (Deharo, Gautret, Muñoz y Sauvain, 2000).

Tras la picadura de un mosquito infectado se introducen esporozoítos de *Plasmodium* al torrente sanguíneo, los cuales llegan hasta el tejido parenquimatoso del hígado y por medio de proteínas de los esporozoítos se efectúa la unión a receptores de membrana del hepatocito invadiendo dichas células, es allí donde se lleva a cabo la esquizogonia exoeritrocítica o hepática, formando esquizontes o hipnozoítos formas que en *P. vivax* y *P. ovale* le permiten permanecer latente por largos periodos, los esquizontes a continuación se rompen, después de aproximadamente una semana, para liberar merozoítos en la sangre, cada célula hepática infectada por esquizontes produce entre de 10.000 y 30.000 merozoítos, los cuales invaden los eritrocitos, dando inicio al ciclo eritrocitario (esquizogonia eritrocítica), cada merozoíto puede invadir un eritrocito, penetrando en la célula hospedera y desarrollando dentro de la misma una vacuola parasitófora, donde el parásito se convierte en trofozoíto el cual madura, perdiendo su morfología de anillo y mediante división nuclear comienza a formarse el estado de esquizonte; cuando se produce la ruptura del eritrocito que contiene al esquizonte se liberan a la sangre merozoítos; algunos de estos merozoítos sufren un proceso de diferenciación en formas sexuales denominadas gametocitos (no se dividen, son poco activas metabólicamente) que no suelen aparecer hasta el segundo o tercer ciclo eritrocítico, los gametocitos al ser ingeridos por un mosquito *Anopheles* se transforman en gametos masculinos (microgametocito) y femeninos (macrogametocito), que luego se

unen para formar cigotos diploides en la luz del tracto digestivo del mosquito (fase sexual o ciclo esporogónico), posteriormente se forma un ooquineto (en aproximadamente 24 horas) que traspasa la pared intestinal convirtiéndose en un ooquiste (se sitúa entre el epitelio y la lámina basal del intestino del insecto) a partir del cual se generan esporozoítos mediante reproducción asexual, almacenándose en las glándulas salivares del insecto que llegan a contener de 100 hasta 70.000 esporozoítos que son inoculados nuevamente en el humano a través de la picadura del *Anopheles* (Figura1-2) (Deharo *et al.*, 2000; Teng *et al.*, 2016).

Figura 1-2: Ciclo de vida del *Plasmodium*. (Adaptado de Teng *et al.*, 2016)



1.1.3 Síntomas y Fisiopatología

Según la sintomatología se puede clasificar la enfermedad en malaria no complicada como la malaria sintomática sin signos de severidad o evidencia de disfunción de un órgano vital y malaria complicada cuando se presentan uno o más de los hallazgos clínicos o de laboratorio descritos en la Tabla 1-2. (MINSALUD, 2010).

Tabla 1-2: Hallazgos clínicos y de laboratorio que clasifican el caso de malaria como malaria complicada. (MINSALUD, 2010).

Manifestaciones clínicas	Hallazgos de laboratorio
Postración Perdida de conciencia	
Diestrés respiratorio (respiración acidótica)	Anemia severa
Convulsiones múltiples	Hipoglicemia
Colapso circulatorio	Acidosis
Edema pulmonar (radiológico)	Daño renal
Sangrado anormal	Hiperlactemia
Ictericia	Hiperparasitemia
Hemoglobinuria	

Por lo general luego de 7-21 días (y hasta 9 meses para *P. vivax*) después de ser picado e infectado se da la fase inicial de los síntomas que comprenden: fiebre, escalofríos, sudoración, artralgia, mialgia, cefalea, malestar, náuseas y a veces emesis, diarrea y dolor abdominal; las lesiones herpéticas puede surgir en los labios y la ictericia ocurre con la infección masiva (Meunier, 2014).

La mayoría de los síntomas clínicos iniciales de la malaria están relacionados con la duración de la fase sanguínea del ciclo del parásito; *P. malariae* tiene el ciclo más largo de 72 horas, seguido de *P. falciparum* y *P. vivax* con ciclos de aproximadamente 48 horas y ciclos más cortos de 24 horas para *P. ovale* y *P. knowlesi*, los síntomas clínicos se manifiestan como resultado de la liberación de sustancias de desecho y toxinas pirogénicas (como la hemozoína y el glicosilfosfatidilinositol) (Teng *et al.*, 2016); causando la activación innata de células de la inmunidad como los neutrófilos,

monocitos/macrófagos, células dendríticas, células asesinas naturales (NK), células NKT, y las células T gamma, en un intento de controlar la temprana progresión de la enfermedad a través de la fagocitosis o producción de mediadores inflamatorios dando como consecuencia los síntomas iniciales de la enfermedad. (Autino, Corbett, Castelli y Taramelli, 2012; Teng *et al.*, 2016).

Las infecciones por *P. falciparum* son los casos que más frecuentemente se complican, por lo general presentándose malaria cerebral que tiene un cuadro clínico con signos neurológicos como confusión mental y convulsiones generalizadas. Adicionalmente entre las complicaciones causadas por este tipo de infección se encuentra la ictericia, diarrea intensa, vómitos, dolor difuso agudo, neumonía y la insuficiencia renal (Meunier, 2014). Síntomas relacionados con la capacidad del parásito de citoadherirse al endotelio vascular de varios órganos y tejidos (pulmón, corazón, cerebro, hígado, riñón, tejidos adiposo subcutáneo y la placenta), lo que conlleva al deterioro de flujo sanguíneo produciendo hipoxia local y permitiendo que los glóbulos rojos infectados permanezcan en la microvasculatura de profundidad quedando exentos de la eliminación por el bazo (Autino *et al.*, 2012). Por otra parte, con el secuestro los efectos de las toxinas parasitarias son más localizados y la estimulación de la respuesta inmune del huésped, lo que puede causar una producción centrada de mediadores inflamatorios y daño tisular (Autino *et al.*, 2012)

La insuficiencia renal en la malaria está vinculada a los depósitos subendoteliales de complejos inmunes que contienen IgG, IgM, C3 y en el 25-33% de los casos también antígenos del parásito, la deposición de complejos provoca daño glomerular resultando en glomerulonefritis proliferativa; por otra parte la deshidratación presente en los pacientes y la oclusión de la vasculatura por secuestro parasitario conduce a la isquemia renal; adicionalmente la liberación de cantidades superiores de hemoglobina durante la hemólisis masiva provoca necrosis tubular aguda (Autino *et al.*, 2012)

La malaria crónica o subaguda puede presentarse en infecciones por *P. vivax*, *P. ovale* y *P. malariae* siendo signos característicos la palidez, disnea, edema de las extremidades inferiores, puede aparecer protrusión abdominal debido a esplenomegalia y soplos cardiacos a causa de la anemia (Meunier, 2014). La anemia es una de las causas más comunes de morbilidad y mortalidad en la infección por malaria, particularmente en

mujeres embarazadas y en niños (MINSALUD, 2010). Los posibles mecanismos que contribuyen a la anemia se pueden dividir en dos categorías: aumento de la destrucción de eritrocitos parasitados y no parasitados (lisis mediada inmunológicamente, fagocitosis y secuestro esplénico) y la disminución de la producción de glóbulos rojos (por supresión de la médula ósea, la inadecuada producción de reticulocitos, efectos de citoquinas inflamatorias y efectos de factores parasitarios) (Autino *et al.*, 2012). Por otra parte, los glóbulos rojos no infectados pueden ser alterados por especies reactivas de oxígeno (ROS) y otros factores, convirtiéndose en blanco de auto anticuerpos y de eliminación por parte del bazo (Autino *et al.*, 2012).

1.1.4 Tratamiento

El arsenal de fármacos disponible para el tratamiento de la malaria en Colombia se muestra en la Tabla 1-3.

Tabla 1-3: fármacos antimaláricos en Colombia. (Adaptado Garavito, 2007 y MINSALUD, 2010).

Fármaco	Familia química (pesos moleculares)	Indicación según Guía de Atención Clínica de Malaria 2010 para Colombia	Mecanismos de acción
Artemisinina y sus derivados: Arteméter Artesunato	Sesquiterpenlactonas (298.4) (282.3) (384.4) (284.3) (282.3)	<ul style="list-style-type: none"> Artemeter más Lumefantrine en: <ol style="list-style-type: none"> Esquema de primera línea tratamiento de la malaria no complicada por <i>P. falciparum</i> Tratamiento de la malaria mixta no complicada En segundo trimestre de embarazo por malaria no complicada por <i>P. falciparum</i> Artesunato más doxiciclina o clindamicina en Primera línea de tratamiento para la malaria complicada 	Estrés oxidativo; acción a nivel de las mitocondrias, modificación de las membranas reticuloendoplasmáticas, inhibición de la ATP asa 6.
Benflumentol (Lumefantrina)	Fluoreno (aril-aminoalcohol) (528.9)	<ul style="list-style-type: none"> Lumefantrine más Artemeter en esquemas anteriormente 	Inhibición de la biocristalización del heme

		mencionados.	
Cloroquina	4-aminoquinoleína (519.9)	<ul style="list-style-type: none"> • Cloroquina más primaquina en: <ol style="list-style-type: none"> 1. Tratamiento de malaria por <i>P. vivax</i> no complicada 2. Tratamiento de las recaídas por <i>P. vivax</i> 3. Tratamiento por infecciones por <i>P. ovale</i> • Cloroquina en tratamiento por <i>P. malariae</i> 	Modificación del pH de la vacuola alimenticia, inhibición de la biocristalización del heme.
Primaquina	8-aminoquinoleína (455)	<ul style="list-style-type: none"> • Primaquina en esquema segunda línea para el tratamiento de la malaria no complicada por <i>P. falciparum</i> se utiliza por su efecto gametocida • Primaquina más Cloroquina en esquemas anteriormente mencionados relacionados con <i>P. vivax</i> por su efecto sobre hipnozoítos 	Inhibición de la dihidroorotato reductasa, metabolismo energético mitocondrial, interacción competitiva con los sistemas de reducción a NADPH del eritrocito y del hepatocito utilizados por los esquizontes para obtener elementos esenciales para su metabolismo.
Quinina	4-quinoleína-metanol (amino alcohol) (782.9)	<ul style="list-style-type: none"> • Sulfato de quinina más clindamicina en: <ol style="list-style-type: none"> 1. esquema segunda línea para el tratamiento de la malaria no complicada por <i>P. falciparum</i> 2. Primer trimestre de embarazo en malaria no complicada por <i>P. falciparum</i> • Quinina más doxiciclina o clindamicina en segunda línea de tratamiento para la malaria complicada 	Modificación del pH de la vacuola alimenticia o se une a la ferriprotoporfirina IX y bloquea su degradación en hemozoína.
Antibióticos			
Clindamicina	Lincomicinas (424.9)	<ul style="list-style-type: none"> • Clindamicina más Sulfato de Quinina en esquema anteriormente descrito • Clindamicina más Artesunato en primera línea de tratamiento para 	Inhibición de la síntesis proteica mitocondrial mediante fijación reversible en la sub – unidad 50 S del ribosoma.

		la malaria complicada	
Doxiciclina	Tetraciclina (444.4)	<ul style="list-style-type: none"> • Doxiciclina más quinina en: <ol style="list-style-type: none"> 1. esquema segunda línea para el tratamiento de la malaria no complicada por <i>P. falciparum</i> 2. segunda línea de tratamiento para la malaria complicada • Doxiciclina más Artesunato en primera línea de tratamiento para la malaria complicada 	Inhibición de la síntesis proteica mitocondrial mediante fijación reversible en la sub – unidad 30 S del ribosoma.

1.1.5 Resistencia a fármacos

La segunda mitad del siglo XX vio el surgimiento de cepas resistentes de malaria a la cloroquina, este fenómeno comenzó en el sudeste de Asia y se extendió a África oriental y occidental y a la vez a América del Sur (sobre todo en la cuenca del Amazonas) (Meunier, 2014). Actualmente la resistencia de *P. falciparum* a múltiples fármacos está progresando lenta pero constantemente por lo que se ha empezado a observar resistencia a la artemisinina en *P. falciparum* en cinco países Camboya, Myanmar, República Democrática Popular Lao, Tailandia y Viet Nam (OMS, 2014).

Actualmente se ha documentado resistencia a antimaláricos en tres de las cinco especies de parásitos que afectan a los seres humanos, *P. falciparum*, *P. vivax* y *P. malariae*. (OMS, 2014). Uno de los efectos negativos de la resistencia es el impedimento para eliminar el parásito de forma adecuada, retardando esta eliminación o dejando en circulación parásitos aún activos, dicha situación se ve agravada cuando la resistencia es cruzada ya que no solo se presenta hacia un fármaco, si no hacia todos los fármacos que pertenecen a la misma familia química o tienen mecanismos de acción similares (OMS, 2014). Las infecciones producidas por parásitos resistentes conllevan a que la resistencia se transmita a la siguiente generación o progenie, de manera que la infección continúa y consigo la resistencia; de esta manera reaparece la parasitemia, el estado anémico del paciente empeora, y se propaga la infección de gametocitos resistentes desencadenando en fracasos terapéuticos (Aminake y Pradel, 2013).

En Colombia se reportó por primera vez resistencia a cloroquina en 1961 (Padilla, Uribe, Araújo, Narváez y Valencia, 2011), lo que llevó al Ministerio de Salud a reemplazar el uso de cloroquina por amodiaquina en el esquema de primera línea, en combinación con la sulfadoxina-pirimetamina (MINSALUD, 2010). Desde 1981, se han reportado fallas para muchos otros fármacos antimaláricos (Padilla *et al.*, 2011). Estudios realizados en el país en los últimos 10 años revelan niveles de falla entre 0 y 50% para amodiaquina y entre 0 y 15% para sulfadoxina-pirimetamina (MINSALUD, 2010). Específicamente una investigación llevada a cabo en Turbo, Departamento de Antioquia evidenció que *P. falciparum* presenta resistencia *in vivo*, a la cloroquina, amodiaquina y sulfadoxina/pirimetamina con una frecuencia de 97, 7 y 13%, respectivamente; e *in vitro*, las cifras correspondientes fueron de 21, 23 y 9% respectivamente (Blair, Lacharme, Carmona y Tobón, 2001).

Se necesitan con urgencia nuevas alternativas de tratamiento con el fin de aumentar la efectividad y reducir el riesgo de resistencia (Meunier, 2014; OMS, 2011). La OMS, señala que la resistencia a los antimaláricos se puede prevenir o retardar mediante la combinación de antimaláricos, empleando dosis correctas e incentivando la completa adherencia a los esquemas (Meunier, 2014; MINSALUD, 2010).

El arsenal terapéutico propuesto por la OMS incluye 15 moléculas, de las cuales 11 tienen conexión con productos naturales provenientes de plantas (Bourdy *et al.*, 2007), lo que sugiere que en la naturaleza pueden existir sustancias con efecto antimalárico y que las plantas pueden considerarse como una alternativa para atender la urgente necesidad de nuevos fármacos en la lucha contra la malaria (Muregi *et al.*, 2007).

Sin embargo, a pesar de que la resistencia a los medicamentos es una de las principales causas del fracaso de tratamiento antimalárico, hay muchos otros factores que contribuyen, como el perfil de inmunidad de la comunidad y el individuo, propiedades farmacocinéticas y farmacodinámicas del fármaco, monoterapia fallida, infecciones mixtas, (Orjuela, González y Osorio, 2004; Co, Dennull, Reinbold, Waters, y Johnson, 2009), falta de adherencia al tratamiento, uso incorrecto o dosis subóptimas de los medicamentos, falsificación de medicamentos, el estado nutricional del paciente, e interacciones con otros medicamentos (Kerb *et al.*, 2009).

1.1.6 Interacciones fármaco-medicinas herbales

Las comunidades más afectadas por enfermedades infecciosas con frecuencia tienen dificultades de acceso a los sistemas de salud, lo que los lleva a utilizar remedios tradicionales, sea de manera independiente o mezclados con los medicamentos convencionales (Hayeshi, Masimirembwa, Mukanganyama, y Ungell, 2006), también por la descendencia cultural de algunas comunidades la confianza que tienen en sus tratamientos ancestrales es mucho mayor que la que tienen en la terapéutica occidental, con lo cual hacen más viable la combinación entre medicamentos convencionales y remedios tradicionales.

Sin embargo, debido a la singularidad de las plantas, ya que tienen múltiples componentes que interactúan con gran diversidad de células y/u órganos diana, dan lugar a una variabilidad de acciones al interior del cuerpo humano así como incontables interacciones con otras sustancias (Lin, G. 2014). Una interacción farmacológica se describe como la alteración en la actividad o el efecto de un fármaco por la presencia o por la acción de otro, donde el fármaco objeto es al cual se le modifica su efecto y el fármaco precipitante es el que causa la modificación en el efecto del otro (Girona, L. 2012), en el caso de las interacciones fármaco-medicinas herbales, por lo general el fármaco se comporta como el objeto ya que para la mayoría de estos se conoce la farmacocinética y farmacodinamia de los mismos y por lo tanto se puede evidenciar claramente las alteraciones sobre estos procesos y la medicina herbal se entendería como la sustancia precipitante, aunque tanto el fármaco como la medicina herbal pueden actuar como objetos y precipitantes a la vez.

Las interacciones farmacológicas se producen en general por dos mecanismos diferentes, clasificándose como interacciones farmacodinámicas e interacciones farmacocinéticas, aunque pueden darse en los dos procesos a la vez; las interacciones farmacodinámicas son aquellas debidas a la influencia que tiene un fármaco o sustancia sobre el efecto de otro en los receptores u órganos en los que actúa y las interacciones farmacocinéticas son aquellas debidas a la influencia que tiene un fármaco o sustancia sobre el ciclo del otro en el organismo (Girona, L. 2012).

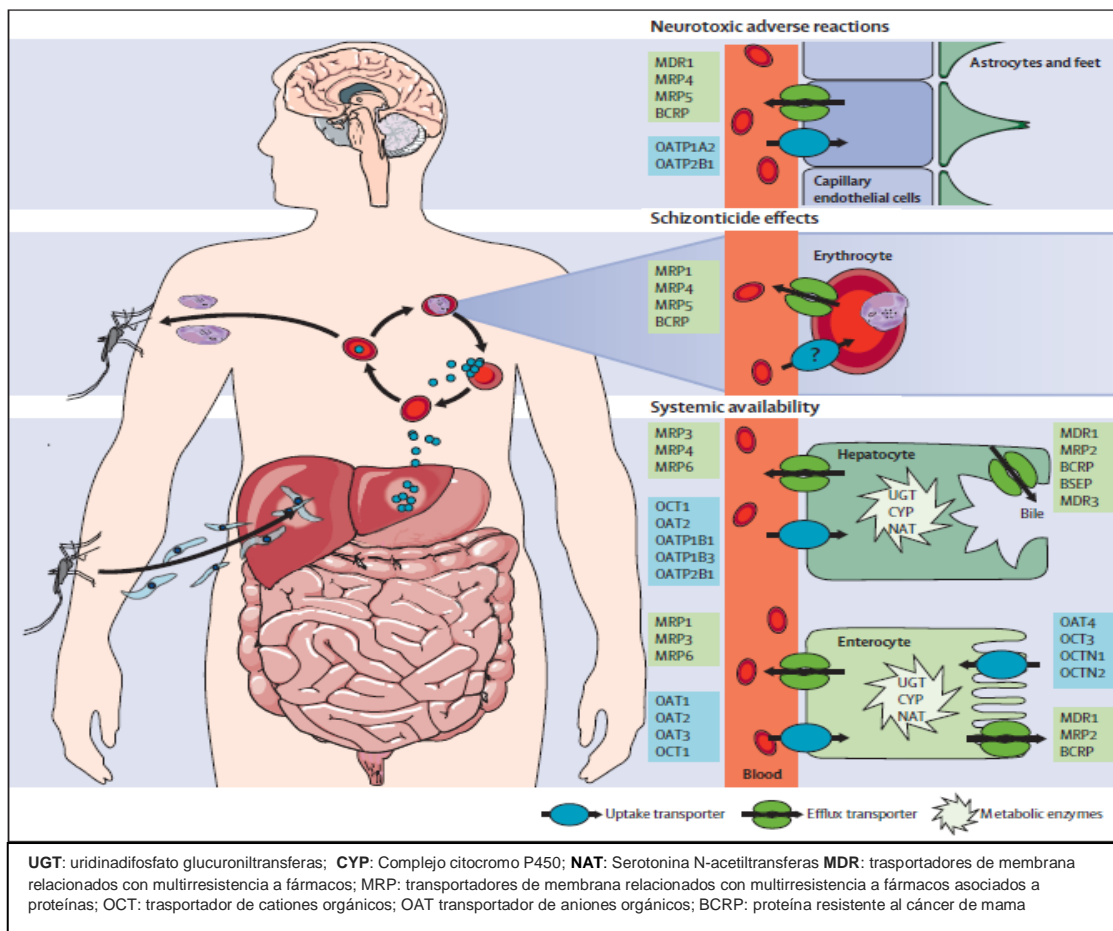
Las interacciones entre fármacos o entre extractos de plantas y fármacos son relacionadas principalmente con alteraciones farmacocinéticas y con la administración oral de los anteriores, las hierbas medicinales pueden aumentar o disminuir la actividad de las enzimas que metabolizan el fármaco o proteínas transportadoras a nivel plasmático y en los tejidos de actividad específica, con lo cual afectan el metabolismo y la concentración de los fármacos usados concomitantemente (Wu, Ma, Ye y Lin, 2015). Se espera que las interacciones entre medicinas herbales y fármacos ocurran durante la absorción intestinal, la distribución, el metabolismo y la excreción renal o eliminación hepática de los fármacos. (Wu *et al.*, 2015).

Los xenobióticos, sean sintéticos o de origen natural se metabolizan mediante la acción enzimática (por ejemplo, enzimas del citocromo P450 [CYPs]) y se transportan a través de barreras impuestas por los mismos tejidos (por ejemplo, P-glicoproteína y los transportadores ABC) y en el plasma (por ejemplo la albumina), todas estas proteínas tienen un importante papel en la absorción intestinal, distribución y la excreción renal o hepática de dichas sustancias. (Kerb *et al.*, 2009).

Los transportadores por lo general son proteínas que permiten el paso de xenobióticos al interior de la células, estos se expresan ampliamente a nivel de las barreras cruciales para la absorción intestinal del fármaco, en el tejido de distribución y eliminación, ubicados en las células epiteliales del intestino, el riñón, hepatocitos, y también en sitios poco penetrables, tales como el cerebro, testículos y placenta (Giacomini *et al.*, 2010, como se citó en Wu *et al.*, 2015). En este orden de ideas, la alteración causada por la coadministración de un producto herbal en la expresión o función de un transportador que tiene como sustrato un fármaco, conduce a consecuencias adversas en la eficacia y seguridad de los medicamentos instaurados como terapia, especialmente para medicamentos con estrecho margen terapéutico (Wu *et al.*, 2015).

Múltiples transportadores de salida y de absorción de fármacos están presentes en las células de diferentes tejidos humanos. En la Figura 1-3 se presentan algunos de estos transportadores y algunas de las enzimas implicadas en el metabolismo de xenobióticos.

Figura 1-3: Transportadores y enzimas implicadas en los medicamentos antimaláricos. (Kerb *et al.*, 2009).



Las interacciones pueden ejercer efectos en cualquiera de estas proteínas sean transportadoras o participen en el metabolismo de los fármacos fase I o fase II. Cuando la alteración se produce a nivel de las enzimas metabolizadoras puede tener dos efectos: en el caso donde los extractos de plantas incrementen la actividad de estas, el paciente se transformaría en un metabolizador rápido con la consecuencia de presentar bajas o nulas concentraciones plasmáticas del fármaco (posiblemente por debajo de la concentración mínima efectiva), en el caso contrario donde la actividad de la enzima sea inhibida tiene como consecuencia una alta concentración del fármaco en plasma llegando a niveles posiblemente superiores a su concentración mínima tóxica, del mismo modo si el fármaco se presenta como un profármaco que requiere bioactivación enzimática y las enzimas encargadas no ejercen dicho efecto, los pacientes presentarán falla en el

tratamiento ya que la molécula activa jamás lograría producirse y ejercer su acción sobre el parásito (por ejemplo, activación de proguanil cicloguanil por CYP2C19) (Kerb *et al.*, 2009).

Por otra parte las interacciones entre fármacos y extractos herbales también pueden generar resultados benéficos como la aditividad y el sinergismo; donde una de las ventajas principales es la reducción la de dosis, con la consecuente disminución de efectos adversos; en cuanto al sinergismo se mencionan con mayor importancia las interacciones farmacodinámicas que las interacciones farmacocinéticas ya que la interacción farmacodinámica entre los xenobióticos determina si ciertas dosis o concentraciones resultan en sinergismo (Jonker, Visser, van der Graaf, Voskuly y Danhof, 2005). Evaluando como tal la actividad estricta en el sitio de acción generando información clave para un diseño racional de combinación de sustancias. Por el contrario las interacciones farmacocinéticas son influenciadas fuertemente por la magnitud de la respuesta al fármaco siendo este efecto relacionado con la concentración plasmática o en el tejido diana y no determina si los medicamentos tienen interacción sinérgica intrínsecamente (Jonker *et al.*, 2005); sin embargo “las respuestas sinérgicas son conferidas por las propiedades farmacológicas conjuntas de la combinación de fármacos y sistemas biológicos” (Jonker *et al.*, 2005) por lo que las dos interacciones deben ser estudiadas en profundidad y ser interpretadas en conjunto.

Los estudios de interacciones por lo general se realizaban entre fármacos que son moléculas con estructura y actividad identificada a diferencia de las medicinas herbales, pero debido al creciente interés en estas últimas y al consumo concomitante de estas con fármacos (Fasinu, Bouic y Rosenkran, 2012), así como al panorama que se ve en países con poblaciones étnicas, que mantienen un fuerte arraigo con tradiciones ancestrales y emplean frecuentemente la medicina tradicional en combinación con fármacos, se ha instado por investigar las interacciones entre fármacos y extractos de plantas medicinales. Específicamente frente a la malaria varios autores han evidenciado tanto *in vitro* como *in vivo* interacciones con resultados que se clasifican desde antagonismo, aditividad o sinergismo entre fármacos antimaláricos y tratamientos tradicionales a base de plantas, utilizados por dichas comunidades para el tratamiento de la enfermedad (Muregi *et al.*, 2004; Waako, Smith y Folb, 2005; Muregi *et al.*, 2007; Chenniappan y Kadarkarai, 2010; Ocloo, Okpattah, Quasie, Sakyiamah y Okine, 2014).

1.2 Etnofarmacología y medicina tradicional

La etnofarmacología utiliza un enfoque en el que hace uso de la eficacia anecdótica de las plantas medicinales para poner a prueba la actividad de estas en el laboratorio (Juerg Gertsch, 2009, citado en Heinrich y Jäger, 2015), el estudio de la herbolaria medicinal y su conocimiento ancestral deben ser objeto de curiosidad científica por parte de profesionales en ciencias sociales en colaboración con biólogos, químicos y farmacéuticos a fin de proporcionar formas alternativas de mitigar malestares y de resolver problemas de salud que a todos afligen (Madaleno, 2007).

Los productos naturales son una rica fuente para el descubrimiento y aislamiento de nuevas moléculas útiles para fármacos modernos, adicionalmente los conocimientos de la medicina tradicional pueden proporcionar un atajo, por cuanto la sustancia de interés probablemente ya tiene repercusiones conocidas (OMS, 2006). En este contexto resaltamos que aproximadamente 250 medicamentos definidos por la OMS como esenciales, 30 se originan a partir de plantas y algunos otros son drogas sintéticas relacionada con fuentes naturales (Bourdy *et al.*, 2007), estas fuentes naturales por lo general fueron reportadas con anterioridad en la medicina tradicional de alguna región haciendo hincapié en la utilidad de los reportes médicos tradicionales de los recursos naturales.

La medicina tradicional también utiliza un enfoque más amplio que abarca la situación socio-cultural y la cosmovisión y creencias de la población local, un aspecto especialmente importante para las comunidades indígenas (Economic and Social Council Chamber., 2009). En Latinoamérica previo al descubrimiento y colonización europea se realizaban innumerables practicas medicinales basadas en la propiedades de plantas, animales y minerales (Madaleno, 2007), lamentablemente se hace evidente que muchas de las descripciones médicas originales no sobreviven, y como consecuencia actualmente sólo se tienen unas pocas piezas de lo que era un rompecabezas mucho más grande (Heinrich y Jäger, 2015). Por lo tanto se hace imperante la búsqueda, el estudio y la referenciación de los conocimientos médicos tradicionales aún presentes en las poblaciones étnicas ya que su pérdida total implicaría una desventaja mucho mayor

para la consecución de fuentes medicinales tan necesarias hoy en día y acentuaría el detrimento de las culturas.

1.2.1 Malaria y medicina tradicional

La malaria, es una enfermedad que ha afectado durante siglos diferentes regiones del mundo y en muchas de ellas se encuentran poblaciones étnicas con gran desarrollo cultural relacionado con el uso de la naturaleza como fuente para su supervivencia, la medicina tradicional empleada por dichas culturas es y ha sido una fuente importante de conocimiento sobre el tratamiento de esta enfermedad. Entre los primeros registros escritos de tratamientos contra la malaria se encuentran una serie de tablillas de arcilla babilónicas del periodo 2600 A.C (Graz, Kitua y Malebo, 2011).

Las plantas tradicionales son la terapia de primera línea en zonas endémicas de malaria, puesto que son usadas por un 25 a 75% de las personas, son ejemplos puntuales del aprovechamiento de la medicina tradicional y del uso de plantas el aislamiento de compuestos de extractos crudos como la artemisinina y la quinina, siendo una prueba más de que las plantas medicinales son una fuente potencial de nuevos fármacos antimaláricos (Teng *et al.*, 2016). El uso de la corteza de Chichona (*Cinchona officinalis*) por los aborígenes de sur América fue aprovechado por los europeos para el descubrimiento de la quinina, en el siglo XIX, a partir de la cual se han sintetizado derivados como la cloroquina, amodiaquina, primaquina y mefloquina (Graz *et al.*, 2011), El remedio herbal chino tradicional qīnghāo (*Artemisia annua*) que era utilizado para el tratamiento de fiebres intermitentes se observó por primera vez en un documento que se encuentra en una tumba que data de 168 AC (Graz *et al.*, 2011) a partir de dicho remedio chino se han sintetizado los derivados de la artemisinina ampliamente usados y recomendados para el tratamiento de la malaria causada por *P. falciparum*.

Los últimos reportes indican un total de 1.854 plantas de 196 familias y 1.012 géneros que son usadas globalmente para el tratamiento de la malaria; no es sorprendente observar que las plantas de las que se aislaron la artemisinina y la quinina pertenecen a la segunda y tercera familias con mayor frecuencia (*Compositae* y *Rubiaceae*), la mayoría de las plantas reportadas fueron y son utilizadas por poblaciones étnicas en zonas endémicas (Teng *et al.*, 2016). Siendo Colombia un país biodiverso y multicultural existe

una alta posibilidad de encontrar fuentes naturales con potencial farmacológico que sean útiles en enfermedades endémicas como la malaria, por lo que investigaciones de tipo etnofarmacológico son justificadas y necesarias.

1.2.2 Protección del conocimiento médico tradicional

Según la Organización Mundial de la Propiedad Intelectual (OMPI), “Los conocimientos médicos tradicionales tienen valor social, cultural y científico y son importantes para muchos pueblos indígenas y comunidades locales; debido al creciente interés comercial y científico en los sistemas de medicina tradicional se ha instado a dar mayor reconocimiento a los conocimientos médicos tradicionales, a respetarlos, preservarlos y protegerlos” (Organización Mundial de la Propiedad Intelectual OMPI, 2013).

La medicina tradicional y su papel en el desarrollo social y tecnológico de los países actualmente son examinados en diferentes foros internacionales, organizados por la OMS, Organización Mundial del Comercio (OMC), la organización de las naciones unidas para la educación la ciencia y la cultura (UNESCO) y la organización de naciones unidas (ONU), entre otros, reconociendo que los conocimientos médicos tradicionales, en los cuales se utiliza plantas medicinales están directamente relacionados con el uso de los recursos genéticos y que estos existen naturalmente y no pueden ser objeto de protección como propiedad intelectual (P. I.), a pesar de esto los conocimientos médicos tradicionales están implícitos en reglas sobre el acceso y participación de beneficios en virtud de acuerdos internacionales (OMPI, 2013).

La protección por P. I. puede asumir dos formas – positiva y preventiva:

Mediante la protección positiva se otorgan derechos de P.I. sobre la materia objeto de los conocimientos médicos tradicionales. Esto puede ayudar a las comunidades a impedir el acceso ilegítimo a los conocimientos médicos tradicionales o su uso con ánimo de lucro por terceros sin que medie una participación equitativa en los beneficios. Asimismo, mediante dicha protección, la comunidad de origen puede explotar activamente los conocimientos médicos

tradicionales, por ejemplo, estableciendo sus propias empresas basadas en esos conocimientos (OMPI, 2013).

Mediante la protección preventiva no se conceden derechos de P.I. sobre la materia objeto de los conocimientos médicos tradicionales, sino que se procura impedir que un tercero adquiera ese tipo de derechos. Entre las estrategias de protección preventiva figura el uso de conocimientos médicos tradicionales catalogados para impugnar la validez de patentes sobre invenciones reivindicadas que se basan directamente en esos conocimientos, frenar u oponerse a su concesión. (OMPI, 2013).

Existen ciertos requisitos para poder obtener el otorgamiento de P.I. sobre cualquier materia, como ser una actividad novedosa, suponer características de inventiva y tener aplicación industrial, por lo que las comunidades que poseen conocimientos médicos tradicionales enfrentan obstáculos serios para satisfacer dichas condiciones (OMPI, 2013). Adicionalmente el papeleo legal y científico necesario para obtener dichas patentes por lo general está fuera del alcance de las comunidades indígenas.

Actualmente varios países como la India (Biblioteca digital de conocimientos tradicionales (TKDL), Corea (Portal coreano de conocimientos tradicionales) y China (Base de datos de patentes de medicina china tradicional) han optado por instaurar una protección preventiva por medio de la catalogación de los conocimientos médicos tradicionales en un intento de proporcionar una protección preventiva a los conocimientos (OMPI, s.f). De esta manera la persona o sector que solicite una patente sobre una actividad relacionada con conocimientos médicos tradicionales debe pasar primero por la revisión profunda del estado de la técnica encontrándose información que reporte el uso ancestral del conocimiento asociado a una comunidad, impidiendo con ello la concesión ilegítima de patentes (OMPI, 2013).

Los catálogos han demostrado su eficacia al momento de intervenir en contra de una patente solicitada por extranjeros, ya que antes de estos catálogos el procedimiento para revertir una patente demoraba años y generaba un costo altísimo para su consecución, debido a que tenía que demostrarse el uso tradicional por parte de una comunidad lo que en ocasiones no se lograba por la falta de registros, perdiendo la comunidad sus

derechos sobre estos conocimientos, a pesar del inmenso trabajo y la importante inversión destinada a la realización de la catalogación de los conocimientos tradicionales de un país o una localidad, se ha podido utilizar estas bibliotecas como prueba indiscutible del uso de material genético asociando a conocimientos tradicionales impidiendo previamente la otorgación de patentes a industrias ajenas a la población tradicional, eliminando la problemática de revertir patentes.

1.3 Comunidades indígenas en Colombia

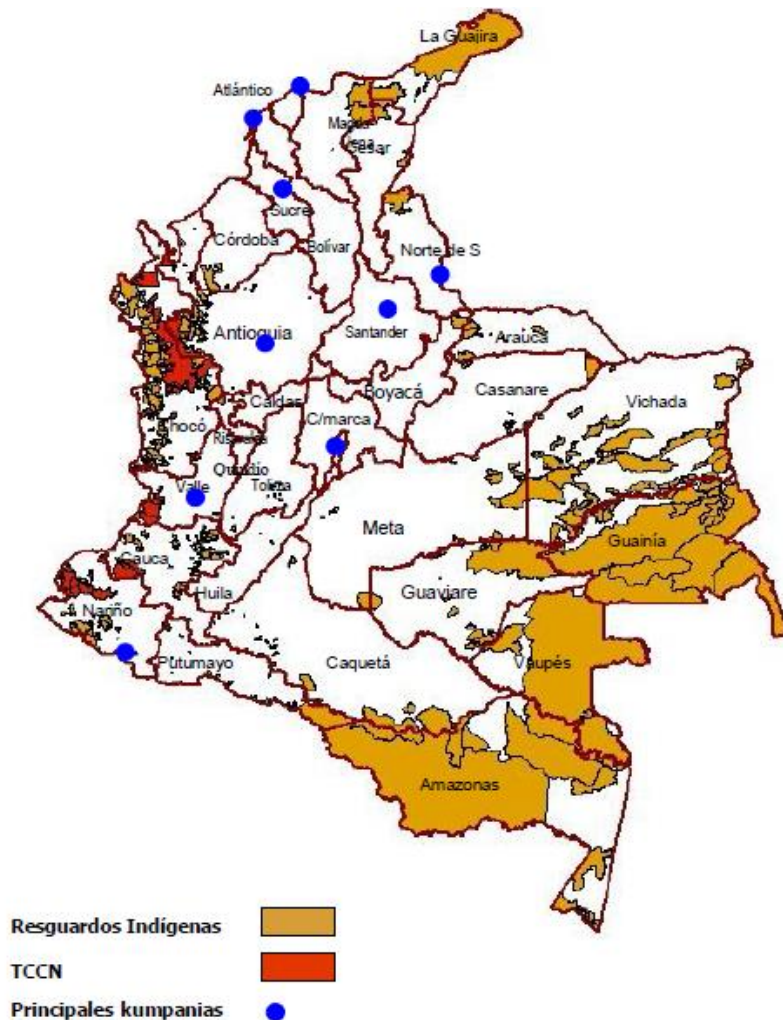
“La existencia de indígenas, negros y gitanos en Colombia como conglomerados humanos, con especificidades particulares que denotan mundos plétóricos de significados, contenidos en sus conocimientos, saberes, relaciones y por lo tanto en prácticas sociales diversas que implican formas distintas de ser, de sentir y de actuar frente a las necesidades, las problemáticas y las posibilidades de concebir la vida, constituye una riqueza inconmensurable en el concierto de la vida nacional.” En América el proceso de colonialismo permitió el encuentro entre estas culturas y las europeas propiciando el inicio de novedosas formas de relaciones y de cosmovisiones, que con el tiempo se fueron afianzando, reacomodando y reinventando el mundo; Colombia es actualmente un producto del más variado mestizaje, esta situación de diversidad la hace privilegiada respecto de los demás países del mundo (Departamento Administrativo Nacional de Estadística-DANE, 2007).

Las etnias reconocidas en Colombia son las poblaciones indígenas, afrocolombianas incluídas las comunidades raizales de San Andrés y Providencia y la comunidad de San Basilio de Palenque, en el departamento de Bolívar y el pueblo Rom (DANE, 2007). En la Figura 1-4 se describe geográficamente la ubicación de los resguardos indígenas, territorios colectivos de comunidades negras (TCCN) y Kumpanias del pueblo Rom.

La distribución por pertenecía étnica, según el censo 2005, para el total de la población colombiana designan a las comunidades indígenas un 3,43% (DANE, 2007). Esta descripción estadística demuestra la minúscula población con tradiciones y saberes indígenas ancestrales. Dicha situación y la disminución lenta pero constante de las

poblaciones indígenas y otras etnias se asocia a procesos de desplazamiento forzado, lo que ocasiona la migración hacia centros urbanos; la baja cobertura salubre y social hacia estas poblaciones genera altas mortalidades en los niños perdiendo generaciones nuevas y la constante presión del mundo occidental amenaza constantemente la supervivencia de las comunidades indígenas en la actualidad.

Figura 1-4: Ubicación geográfica de los resguardos indígenas, territorios colectivos de comunidades negras (TCCN) y Kumpanias del pueblo Rom. (DANE, 2007).



En 1989 un estudio nacional reportó las causas de enfermedad y/o muerte en las poblaciones indígenas como problemas infecciosos y carenciales incluyendo la tuberculosis, la desnutrición, el parasitismo intestinal, la diarrea, las infecciones respiratorias, las enfermedades de la piel y de los dientes y la malaria (Arango, 1989

como se citó en Duque, 1998). “Adicionalmente en el documento sobre el Programa para el apoyo y fortalecimiento étnico de los pueblos indígenas de Colombia, se afirmaba que las políticas estatales de salud para los pueblos indígenas no han contado con su participación en el diseño y ejecución, ni con el personal preparado para la atención médica intercultural” (Departamento Nacional de Planeación DNP, 1995 cómo se citó en Duque, 1998).

Dicha situación justifica la investigación y la inversión social y económica en estas poblaciones con el fin de identificar elementos de ayuda, respetando su autonomía y cosmovisión, de tal manera que se logre un acuerdo intercultural de investigación que traiga beneficios a la comunidad, en uno de los sectores vitales más importantes como es la salud. La investigación respetuosa y el registro de sus tradiciones médicas pueden contribuir a contrarrestar la pérdida de sus conocimientos, adicionalmente y la procura de proporcionar protección preventiva a su conocimiento tradicional lograría registrar como propiedad intelectual de la comunidad su saber médico.

Aproximándonos a la descripción de la comunidad con la cual trabajamos tenemos que según el último censo general en Colombia 2005, en el país residen 87 pueblos indígenas identificados plenamente, los cuales hablan 64 lenguas amerindias y una diversidad de dialectos que se agrupan en 13 familias lingüísticas; los departamentos con mayor porcentaje de indígenas son Guainía, Vaupés, La Guajira, Amazonas, Vichada, Cauca y Nariño. Adicionalmente se reconoce que las comunidades indígenas se encuentran ubicadas en regiones naturales como la selva, las sabanas naturales de la Orinoquía, los Andes colombianos, los valles interandinos y en la planicie del Caribe (DANE, 2007), conviviendo y aprovechando la riqueza natural de los lugares donde habitan.

En el Amazonas se reconocen las poblaciones indígenas Makuna, Matapí, Miraña, Nonuya, Ocaina, Tanimuka, Tariano, Tikuna, Yagua, Yauna, Yukuna, Yuri y Uitoto (DANE, 2007), a este último grupo étnico pertenece la comunidad Hitoma, eje fundamental de este trabajo.

En historia de la etnia Uitoto se identifica que se mantuvieron relativamente aislados hasta finales del siglo XIX debido a la difícil navegación por los ríos en sus territorios, hasta que comenzó el auge extractivo de la quina y el caucho, como resultado del conflicto colombo-peruano este grupo se dispersó, refugiándose en la Amazonía colombiana (Alto Comisionado de las Naciones Unidas para los Refugiados ACNUR, 2011). Con dificultad se inició un proceso de recuperación socio-cultural, que en 1988 llegó a su apogeo con la creación del resguardo más grande del país Predio Putumayo en el cual se organizó un modelo de distribución territorial que permitió la integración étnica y social. “De acuerdo a su mito de origen, todos los grupos étnicos se encontraban debajo de la tierra, los Uitoto emergieron de un orificio ubicado en la región de la Chorrera, canal por el cual la tierra respira” (ACNUR, 2011).

La comunidad ciudad Hitoma ubicada en un resguardo Uitoto comparte cualidades y problemáticas comunes para la población indígena Colombiana. Dentro de sus muchas cualidades se encuentra el impresionante y magnífico saber natural, la asociación entre el derecho y el deber con la tierra en la que nos encontramos, el uso racional y respetuoso de la naturaleza para sus actividades diarias como la alimentación, la vivienda y la salud. Lamentablemente toda la comunidad y la familia del médico tradicional han tenido que vivir experiencias dolorosas como las mencionadas anteriormente, que dificultan la continuidad de una vida como ellos la conocen, aun así es milagroso ver como su esencia no cambia a pesar de las dificultades y como su fortaleza les hace seguir trabajando por conservar su cultura y sus raíces y compartir dicha cosmovisión con los demás.

1.4 *Curarea toxicofera* (Wedd.) Barneby & Krukoff

Curarea toxicofera (Wedd.) Barneby & Krukoff, es una liana trepadora nativa de meso y sur América (Wiersema y León, 2013), perteneciente a la familia de las menispermáceas, la clasificación taxonómica se presenta en la Figura 1-5 y su fecha de determinación fue en 1970.

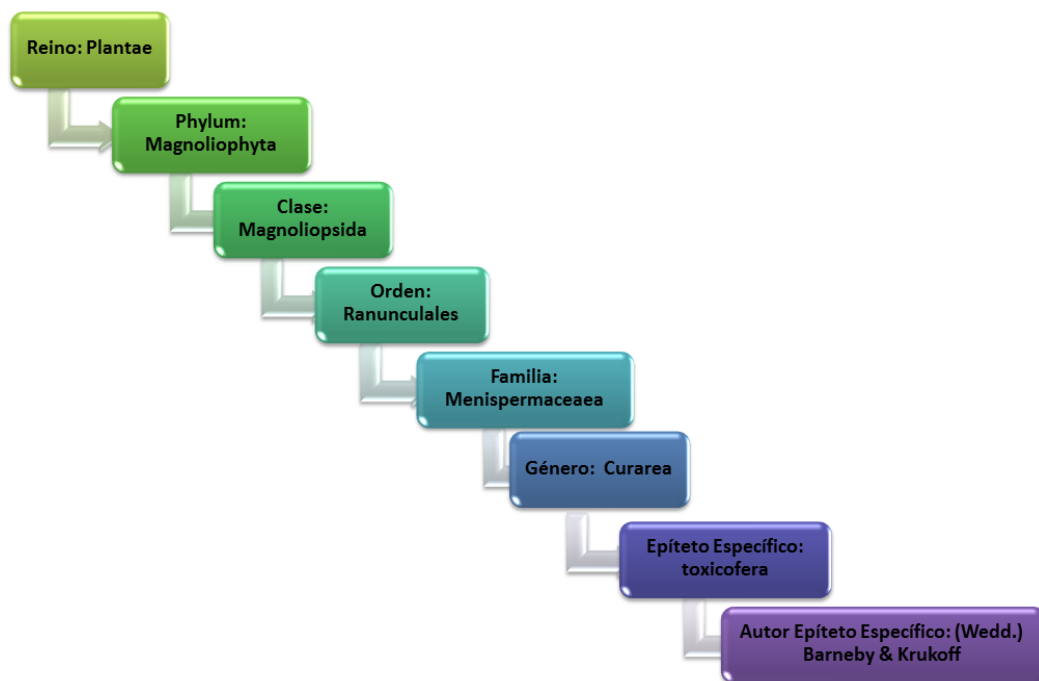
Las menispermáceas se encuentran ampliamente distribuidas en todo el mundo tropical; existen alrededor de setenta géneros identificados de los cuales diecisiete pertenecen al

Nuevo Mundo, el número de especies identificadas es de aproximadamente 142 (Menachery, 1996).

Esta planta presenta sinonimias como: *Abuta boliviana* Rusby; *Chondrodendron bioccai* Lusina; *Chondrodendron polyanthum* (Diels) Diels; *Cocculus toxicoferus* Wedd. *Hyperbaena polyantha* Diels (The Plant List. 2013) y *Chondrodendron toxicoferum* (Wedd.) Krukoff & Moldenke (The Plant List, 2013; Herbario Universidad de Panamá, 2015).

La familia Menispermaceae es el principal grupo de angiospermas (plantas con flores), para el género *Curarea* encontramos las siguientes especies descritas: *Curarea candicans* (Rich. ex DC.) Barneby & Krukoff, *Curarea crassa* Barneby, *Curarea cuatrecasasii* Barneby & Krukoff, *Curarea phaeofusca* R. Ortiz, *Curarea tecunarium* Barneby & Krukoff y *Curarea toxicofera* (Wedd.) Barneby & Krukoff (The Plant List. 2013).

Figura 1-5: Clasificación taxonómica de *Curarea toxicofera* (Wedd.) Barneby & Krukoff. Adaptado de Instituto de Ciencias Naturales ICN- Universidad Nacional de Colombia



Dentro de los metabolitos secundarios más reportados para *Curarea toxicofera* (Wedd.) Barneby & Krukoff se encuentran los alcaloides (Bisset NG. 1992), específicamente para esta planta se reportan, (-)-Curina, (+)-Isochondodendrine, (-)-Toxicoferina y una mezcla 1:1 de (-)-Curina y (-)-Tubocurine (Menachery, 1996), debido a las propiedades que le confieren estos metabolitos a la planta, esta es utilizada en diferentes culturas indígenas nativas de Brasil, Bolivia, Colombia, Ecuador, Guayana Francesa, Perú y Surinam para la producción del curare o jamamadi que es un veneno potente para la cacería (Menachery, 1996). Para la fabricación de ese veneno la especie es acompañada por otras plantas selváticas de la familia menispermácea como *Chondrodendron tomentosum* y *Curarea candicans*, *C. tecunarium* y otros géneros como *Abuta*, *Anomospermum*, *Cissampelos*, *Orthomene*, *Sciadotenia* y *Telotoxicum* (Menachery, 1996), el método de preparación depende de la etnia o comunidad.

La familia Menispermácea contiene muchas plantas medicinales y tóxicas, es estudios *in vitro* se ha relacionado el poder venenoso de estas plantas con citotoxicidad suponiendo una utilidad anticancerígena, también se ha estudiado, con resultados benéficos, la tubocurarina aislada de *Chondrodendron tomentosum* como relajante muscular (Menachery, 1996) y anteriormente en el grupo de investigación FaMeTra (Cardenas, 2011) y en el presente estudio se propone una actividad antimalárica promisorio para *Curarea toxicofera* (Wedd.) Barneby & Krukoff.

2. Materiales y Métodos

2.1 Acceso a la comunidad

Trabajos previos del grupo de investigación FaMeTra realizados con la familia y con el médico tradicional de la comunidad ciudad Hitoma permitieron tener un contacto directo con ellos; en febrero de 2013 se realizó una reunión en Bogotá con José Octavio García, (*Hitoma safiama* que significa luz del sol), “el abuelo” o “hitoma” como se le llama al médico tradicional, en dicha reunión se planteó la posibilidad de una visita para continuar trabajando con las plantas que son la base para la preparación de remedios tradicionales antimaláricos y los mismos remedios, el abuelo aceptó y mostró estar a gusto con el trabajo llevado a cabo anteriormente. La preparación para la visita se enfocó en la revisión de literatura, en temas como etnofarmacología, epidemiología de la enfermedad y su impacto en la región donde se ubica la comunidad, conocimiento tradicional, botánica, etnografía colombiana y aspectos legales sobre la colecta de material vegetal y el acceso a comunidades indígenas.

Con el beneplácito del abuelo nos embarcamos hacia Leticia a realizar el trabajo de campo que consistió en la recolección de las plantas y la observación de la preparación del remedio, contando con el permiso marco de colecta dado a la Universidad Nacional de Colombia mediante resolución 0255 del 12 de marzo de 2014 por la Autoridad Nacional de Licencias Ambientales ANLA, y con el oficio OF115-000039982-DCP-2500 del Ministerio del Interior donde se nos autoriza a trabajar sin la necesidad de consulta previa (Anexo 6) se procedió a formalizar un consentimiento previo informado para el cual José de Jesús García Tejada (hijo del abuelo y cuyo nombre es Kimibaigio que significa Voz del magure, instrumento antiguo que se utiliza para comunicación entre las aldeas) nos prestó su ayuda para la redacción y corrección de nuestra propuesta en la cual definíamos los compromisos de cada parte y la participación que se tendría de los posibles beneficios derivados de la investigación.

Nos ubicamos en la sede Amazonía de la Universidad Nacional de Colombia en la cual contamos con el valioso apoyo del profesor Pablo Palacios quien nos orientó en diferentes áreas para obtener un buen desempeño en el trabajo; de la Universidad partíamos diariamente en horas de la mañana hacia la maloka, donde comenzábamos el trabajo con el abuelo y su familia.

2.1.1 Recolección del material vegetal y preparación del remedio tradicional

Jesús García con su amplio conocimiento en la búsqueda de plantas en la selva nos sugirió elementos prioritarios para nuestra tarea en la selva. Tras lo cual nos preparamos con materiales como: costales, alcohol, machete, papel periódico, cámara fotográfica, GPS, blusas de manga larga, repelente y agua para beber constantemente. Adicionalmente Jesús nos pidió tabaco ya que en la cosmovisión de la comunidad este provee de protección en la selva. En tres días completos de búsqueda se encontró lo necesario para la preparación del remedio tradicional y se colectó un ejemplar con partes aéreas de la planta con el fin de identificarla y depositarla en el Herbario Nacional Colombiano. Se observó la preparación del remedio y durante esta nos compartieron visiones y pensamientos respecto a la medicina tradicional indígena.

El remedio se envasó en botellas de agua y se refrigeró durante 24 horas en la Universidad Nacional de Colombia Sede Amazonía, donde también se preparó el material vegetal colectado para presentarlo en el Herbario Nacional Colombiano. El Remedio y el material vegetal colectado fue transportado por vía aérea hacia Universidad Nacional de Colombia Sede Bogotá donde el remedio fue liofilizado en el equipo LABCONCO FREEZONE 4,5; posteriormente se almacenó protegido de la luz y de la humedad, a temperatura ambiente.

2.2 Evaluación de las interacciones *in vitro*

2.2.1 Evaluación de la actividad antiplasmodial

La actividad antimalárica *in vitro* fue evaluada en cultivo de *P. falciparum* cepa FCR3 cloroquino resistente obtenida en la universidad de Antioquia, los glóbulos rojos humanos

y el suero fueron gentilmente donados por Hemocentro Distrital de Bogotá D.C, el cultivo continuo de la cepa *in vitro* se realizó de acuerdo con la metodología descrita por Trager y Jensen (1976) ver Anexo 1. El cultivo se mantuvo con medio RPMI 1640 (Sigma-Aldrich®) como medio de cultivo (suplementado con HEPES (25 mM), glucosa (22nM), hipoxantina (170 µM), bicarbonato de sodio (24 mM)); en el caso del cRPMI (medio completo) se adicionó suero humano al 10%; Se conservó un hematocrito de 5% e se incubó a 37 °C en atmosfera 5% de CO₂ y una humedad de alrededor del 90%. El medio de cultivo fue cambiado diariamente y la adición de glóbulos rojos se realizó según el resultado de la revisión por microscopía de los frotis los cuales fueron fijados con metanol y teñidos con Giemsa (Deharo *et al.*, 2000). Previamente al inicio de cada ensayo se sincronizó el cultivo en estadio de anillos usando para esto una solución de sorbitol 5%, el cual lisa aquellos eritrocitos parasitados con estadios maduros del *Plasmodium falciparum*.

El ensayo de inhibición de la invasión y desarrollo del parásito se realizó siguiendo el protocolo propuesto por Deharo *et al.*, (2000) y adaptado por el grupo de investigación a las condiciones experimentales del Departamento de Farmacia de la Universidad Nacional de Colombia Sede Bogotá (Anexo 2).

2.2.2 Cálculo de concentraciones inhibitorias 50

Con el fin de calcular la concentración inhibitoria 50 (CI₅₀) de cada uno de los fármacos y el remedio tradicional (RT), se evaluaron en el ensayo de inhibición de la invasión y desarrollo del parásito, en primer lugar la actividad del RT, posteriormente de cloroquina (CQ) y finalmente de artesunato (AS). Tres ensayos independientes para cada una de las sustancias, la lectura de los resultados se realizó por dos métodos: microscopía y fluorometría.

Se evaluó el remedio tradicional obtenido a partir de la decocción de *Curarea toxicofera* (Wedd.) Barneby & Krukoff, tomando 20 mg de liofilizado y se disolvió en 1 mL de RPMI, a partir del cual por medio de diluciones seriadas se obtuvo concentraciones de 100 µg/mL, 50 µg/mL, 25 µg/mL, 12,5 µg/mL, 6,25 µg/mL, 3,12 µg/mL, cada concentración fue valorada por triplicado. Para el montaje de cada placa (placa de 96 pozos) se partió de una parasitemia en pozo de 2%, con hematocrito al 2,5%, en cada pozo se sirvió 100

µl de la concentración de remedio a evaluar; como control positivo se utilizó cloroquina difosfato (SIGMA Lote 84H1169) y como control negativo se empleó una suspensión de eritrocitos parasitados al 2%.

En el caso de la evaluación de la actividad antimalárica de CQ se partió de una solución madre de la misma en RPMI de 1.000 µg /mL, se realizaron diluciones en cRPMI hasta obtener las siguientes concentraciones en placa 1 µg/mL, 0,5 µg/mL, 0,25 µg/mL, 0,125 µg/mL, 0,063 µg/mL y 0,031 µg/mL, el montaje de la placa se realizó en las mismas condiciones antes descritas.

Para artesunato (Sigma Lote 021M1730V) se utilizó una solución madre de AS de 200 µg/ml en NaHCO₃, se realizaron diluciones en cRPMI hasta obtener las siguientes concentraciones en placa de 0,05 µg/mL, 0,025 µg/mL, 0,0125 µg/mL, 0,0063µg/mL, 0,0031 µg/mL y 0,0016 µg/mL, 0,0008 µg/mL, 0,0004 µg/mL y se procedió de igual modo que para el anterior fármaco.

Posterior a 48 horas de incubación, se centrifugaron las placas a 600 G por 5 min, se realizaron frotis en láminas portaobjetos con el pellet de glóbulos rojos y se tiñó con Giemsa, se realizó lectura con objetivo de inmersión en microscopio óptico Nikon Eclipse.

La ecuación 1 muestra los parámetros implícitos en el cálculo de la inhibición de la parasitemia, la cual se realizó haciendo conteo de Glóbulos Rojos Sanos (GRS) y parasitados (GRP) por cada 1.000 de glóbulos rojos totales.

Ecuación 1. Cálculo del porcentaje de inhibición de la parasitemia

$$\% \text{ inhibición} = \frac{\text{Parasitemia del control de crecimiento} - \text{Parasitemia de la muestra}}{\text{Parasitemia del control de crecimiento}}$$

La lectura por fluorimetría se realizó con base en los adelantos obtenidos en la adaptación y optimización del método por medio de la fluorescencia de SYBR Green I en las muestras de sangre parasitada basándonos en el protocolo adaptado por Arias (2015)

para las condiciones y objetivos del laboratorio y de la investigación. De igual forma que para la lectura descrita anteriormente posterior a 48 horas de incubación, se centrifugaron las placas a 600 G por 5 min, se retiró el sobrenadante; al realizar dos lavados con PBS 1% con el fin de descartar residuos del tratamiento, posteriormente se resuspendió el pellet de cada pozo adicionando 150 μ l de PBS al 1% homogenizando el total del volumen. A continuación se tomaron 100 μ l de cada pozo y se trasladaron a una placa negra de 96 pozos fondo plano, adicionando 100 μ l de una solución de SYBR Green I 2X disuelta en tampón de lisis, después de 2 horas de incubación a temperatura ambiente y protegido de la luz se realizó lectura de la placa en Fluorómetro LB 970 Twinkle (BERTHOLD-Technologies. Gmbh & Co.KG), empleando como longitud de onda de emisión 485nm y de excitación 535nm; los resultados fueron reportados como Unidades Relativas de Fluorescencia (URF). Se realizó la corrección de la lectura restando los valores del blanco (GRS). El porcentaje de Inhibición de la parasitemia fue calculado teniendo en cuenta la ecuación de calibración del método para la cepa FCR-3.

El cálculo de las IC_{50} se realizó por medio de una regresión no lineal en el Software Graph pad Prism 6 utilizando los datos obtenidos tanto por fluorimetría como por microscopía.

2.2.3 Ensayos de combinación

Teniendo en cuenta la CI_{50} de cada una de las sustancias en trabajo (remedio de *Curarea toxicofera* (Wedd). Barneby & Krukoff, CQ y AS) se combinaron por separado el RT con CQ y el RT con AS, con tres ensayos independientes para cada combinación. Se plantearon varios porcentajes o fracciones de la CI_{50} ya calculada para cada una de las sustancias a combinar y se combinaron como se muestra en la Figura 2-1. La lectura se realizó por el método fluorométrico como se describió anteriormente.

Se calcularon las concentraciones inhibitorias fraccionales (FIC) (Ecuación 2) para cada sustancia donde se hallara una inhibición del 50 % de la parasitemia y a partir de estas se construyeron isobogramas (ya que las FIC para cada sustancia pasan a ser las parejas ordenadas que se grafican en el isobograma) con el fin de determinar si la interacción entre las sustancias era de tipo sinergismo, aditividad o antagonismo, representados en la Figura 2-2. (Garavito, 2007; Co *et al.*, 2009; Rasoanaivo, Wright,

Willcox, y Gilbert, 2011; Zofou, Tene, Tane y Titanji, 2012; Matthews, Usman-Idris, Khan, Read, y Nirmalan, 2013).

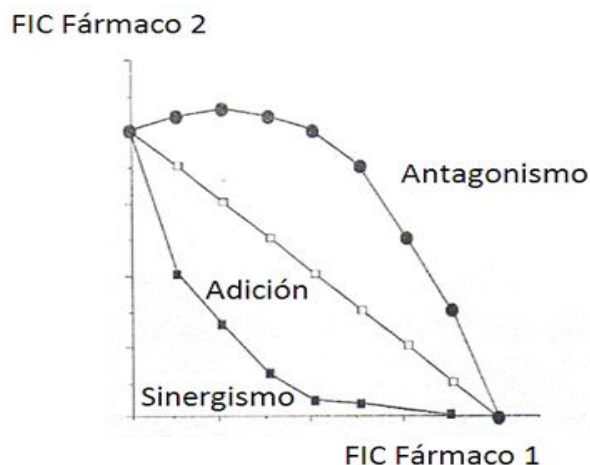
Ecuación 2. Cálculo de las Concentraciones Inhibitorias Fraccionales (FIC)

$$FIC = \frac{CI50 \text{ del sustancia A en combinación}}{CI50 \text{ del sustancia A solo}}$$

Figura 2-1: Diseño de placa para montaje de ensayos de combinación *in vitro*.

		Remedio																				
		25%		25%		50%		50%		75%		75%		100%		100%		200%		200%		
		0% CI 50	0% CI 50	CI 50	CI 50	CI 50	CI 50	CI 50	CI 50	CI 50	CI 50	CI 50	CI 50	CI 50	CI 50	CI 50	CI 50	CI 50	CI 50	CI 50		
fármaco		1	2	3	4	5	6	7	8	9	5	11	12									
a	combinar					GRS	GRS	GRS														A
	0% CI 50																					B
	25% CI 50																					C
	50% CI 50																					D
	75% CI 50																					E
	100% CI 50																					F
	200% CI 50																					G
						GRP	GRP	GRP														H

50µl de remedio + 50µl del fármaco+ 100µl GRP	GRS-glóbulos rojos sanos	GRP-Glóbulos rojos parasitados. control de crecimiento	200 µl agua destilada
--	--------------------------	---	-----------------------

Figura 2-2: Representación gráfica de un isoblograma (Deharo *et al.*, 2000).

Los resultados también se expresaron por medio de la sumatoria de las (FIC) también llamado índice de combinación (IC) que se define como: $(CI_{50} \text{ del reactivo A en combinación} / CI_{50} \text{ del reactivo A solo}) + (CI_{50} \text{ del reactivo B en combinación} / CI_{50} \text{ del reactivo B solo})$, por cada concentración evaluada (Zofou *et al.*, 2012); los valores de la sumatoria son clasificados como se muestra a continuación. (Fivelman, Adagu y Warhurst, 2004, como se citó en Zofou *et al.*, 2012; Garavito 2007)

IC >1: antagonismo

IC =1 aditividad

IC <1 sinergismo

2.3 Evaluación de las interacciones *in vivo*

2.3.1 Evaluación de la actividad antimalárica

Para la evaluación de la actividad antimalárica del RT y de los fármacos (CQ y AS), se empleó el modelo farmacológico de malaria murina *Test de Peters* o Prueba supresiva de cuatro días ver Anexo 3, descrito por (Deharo *et al.*, 2000) y adaptado por (Garavito, 2003).

En las pruebas realizadas se utilizaron ratones (*Mus musculus*) ICR hembras de aproximadamente 4 semanas de edad, con un peso entre 18 g y 22 g, mantenidos con consumo de agua y comida *Ad libitum* y temperatura controlada (22°C +/- 1°C) en ciclos de 12 horas luz/oscuridad, los individuos fueron procedentes del Bioterio del Departamento de Farmacia de la Universidad Nacional de Colombia.

De acuerdo con el diseño experimental cada grupo de tratamiento fue conformado por 5 animales, posterior a la asignación aleatoria del tratamiento los individuos fueron infectados por vía intraperitoneal (ip) con *Plasmodium berghei* ANKA en una concentración de 1×10^7 parásitos/100µL, a las dos horas post-infección y a la misma hora durante 4 días consecutivos, a los animales se les administró el tratamiento correspondiente por vía oral por medio de sonda orogástrica. A las 24 horas posteriores al último tratamiento se tomaron muestras de cada individuo para la evaluación por microscopía y por fluorometría.

El mantenimiento de los animales, los ensayos y la evaluación posterior se realizaron teniendo en cuenta la normatividad sobre el manejo ético de animales establecido en la Resolución 008430 de 1993 del Ministerio de Salud, capítulo sexto, la cual hace referencia al uso de animales vivos en experimentos en investigación en Colombia. También se siguieron las normas establecidas por el Bioterio de Farmacia de la Universidad Nacional de Colombia y los protocolos internos de la Universidad Nacional de Colombia en cuanto al manejo y disposición de material biológico. El protocolo utilizado para la evaluación se encuentra avalado por el Comité de Ética de la Facultad de Ciencias

En todos los ensayos *in vivo* se registró la mortalidad de los individuos, para realizar un análisis comparativo de los promedios de mortalidad para los grupos de cada ensayo los datos fueron sometidos a pruebas con el fin de verificar requisitos para realizar estadística paramétrica. Teniendo en cuenta los resultados se aplicaron pruebas de hipótesis ANOVA con $\alpha = 0,05$ y cuando la conclusión era que las medias de los tratamientos si tenían diferencia estadísticamente significativa, se realizó una prueba Dunnett con $\alpha = 0,05$ con el fin de evidenciar diferencias entre el promedio de mortalidad de cada grupo frente al promedio de mortalidad del control (vehículo).

2.3.2 Cálculo de dosis inhibitorias 50

Con el fin de calcular las dosis inhibitorias 50 (DI_{50}) se realizaron tres pruebas independientes, en la primera se evaluó el RT, posteriormente CQ y por último AS, para cada sustancia se realizó un único ensayo.

Para el RT se evaluaron en 6 grupos de tratamiento las siguientes dosis: 800 mg/kg; 400 mg/kg; 200 mg/kg y 100 mg/kg, como control negativo se empleó el vehículo-agua destilada y como control positivo CQ a dosis de 3 mg/kg. Para CQ se evaluaron en 5 grupos de tratamiento las siguientes dosis: 0,8 mg/kg, 1,5 mg/kg; 3 mg/kg y 6 mg/kg y como control negativo se evaluó el vehículo, en este caso agua destilada. Para AS se evaluaron en 3 grupos de tratamientos las siguientes dosis: 2,5 mg /kg y 5 mg /kg; como control negativo se evaluó el vehículo que en este caso fue bicarbonato de sodio al 5%. La determinación de la actividad antimalárica se calculó como la reducción en la parasitemia de los animales tratados respecto al grupo control negativo (vehículo), expresado en porcentaje de inhibición como la media \pm DE (Ver ecuación 3).

Ecuación 3: Cálculo del porcentaje de inhibición de la parasitemia.

$$\% \text{ inhibición} = \frac{\text{Parasitemia del control negativo} - \text{Parasitemia del tratamiento}}{\text{Parasitemia del control negativo}}$$

El cálculo de la DI_{50} se realizó por medio de regresión no lineal empleando el software GraphPad Prism 6.

2.3.3 Ensayos de combinación

Para la evaluación de la actividad antimalárica de las combinaciones RT-CQ y RT-AS se empleó el modelo farmacológico de malaria murina (*Test de Peters*) con una adaptación del diseño experimental de la prueba, para cada combinación se realizó un único ensayo (teniendo en cuenta que en las pruebas *in vivo* cada animal se considera una unidad experimental independiente)

Para el ensayo de combinación entre el RT y CQ se evaluó en 6 grupos de animales los siguientes tratamientos (Tabla. 2-1)

Tabla 2-1: Tratamientos empleados en la evaluación *in vivo* de la combinación RT-CQ

Grupo	Tratamiento
1	CQ 3 mg/kg
2	CQ 1,5 mg/kg
3	RT 358 mg/kg
4	RT 1020 mg/kg
5	RT 358 mg/kg + CQ 1,5 mg/kg
6	Vehículo (Agua).

Para el ensayo de combinación del RT y AS se evaluaron en 6 grupos de animales los siguientes tratamientos (Tabla 2-2).

Tabla 2-2: Tratamientos empleados en la evaluación *in vivo* de la combinación RT-AS

Grupo	Tratamiento
1	AS 1,25 mg/kg
2	AS 2,5 mg/kg
3	RT 200 mg/kg
4	RT 200 mg/kg + AS 1,25 mg/kg
5	RT 200 mg/kg + AS 2,5 mg/kg
6	Bicarbonato de sodio al 5%

Los resultados de parasitemia de ambos ensayos fueron cuantificados por fluorometría. Para cada ensayo de combinación RT-CQ y RT-AS por separado, se comparó el % de inhibición de la parasitemia de la combinación frente al valor teórico correspondiente a la suma de los % de inhibición de cada sustancia al ser administradas solas, suponiendo que esta suma sería el efecto aditivo de las dos sustancias (Garavito, Bertani, Quiliano, Aldana y Deharo, 2012; Gathirwa *et al.*, 2008).

3.Resultados

3.1 Acceso a la comunidad

Como se mencionó anteriormente en la reunión realizada a principio del año 2013 se le planteo a el abuelo la continuación del trabajo enfocado en la medicina tradicional que él maneja con miras el estudio de plantas empleadas como antimaláricos, obteniendo su aprobación. El abuelo en esta oportunidad comentó algunas experiencias previas acerca de la medicina indígena dentro de las cuales reportó la remisión de un familiar con lepra usando como tratamiento la mordedura de una boa y el uso de plantas, este caso tratado por su padre como médico de la comunidad para ese momento; también mencionó el tratamiento de personas “blancas” que buscaban solución a enfermedades diagnosticadas y tratadas con medicina alopática pero sin evolución positiva, en estos casos el tratamiento se enfoca al individuo usando plantas selváticas medicinales y apoyándose en una correcta alimentación, destacando que la curación y por lo tanto la salud la obtienen del ambiente y de sus actividades diarias.

Dentro de la problemática de las comunidades indígenas en el país el abuelo mencionó el impacto de empresas en la región amazónica y el mermado interés de las nuevas generaciones por actividades tradicionales como el uso de plantas medicinales, situación que obviamente repercute negativamente en la conservación del inmenso conocimiento que tienen estas comunidades sobre las especies potenciales en el campo de la medicina, así como en otros enfoques útiles.

3.1.1 Socialización del proyecto

La visita a la familia se realizó en agosto del 2013, el contacto fue directamente el abuelo, Hitoma safiama, quien nos atendió en Leticia y nos indicó como llegar a la maloka donde vive actualmente, la ubicación de la comunidad Indígena Ciudad Hitoma es en el

resguardo Uitoto en el Km 7 vía Leticia-Tarapacá, del Departamento de Amazonas, Colombia, la maloka se ubica en las siguientes coordenadas (S 04o 08´404´´ latitud Sur, W 069o 55´450´´ longitud Oeste, Elevación: 244 ft), el resguardo fue legitimado mediante resolución No. 005 del 29 de enero de 1986 del Instituto Colombiano de la Reforma Agraria INCORA.

Al llegar se hizo una presentación detallada a la familia entera en la que se les informó del proyecto a desarrollar, así como se les recordó los resultados del anterior trabajo (Anexo 4) y se les habló de los mecanismos de protección de conocimiento tradicional y los derechos que tienen por ley en el tipo de investigación que adelantamos; se realizó una presentación completa de los derechos de consulta previa y consentimiento libre previo e informado; basados en documentos públicos del Ministerio del Interior y de Justicia (Ministerio del Interior y de Justicia República de Colombia (2009) y de la cartilla “Tejiendo Derechos” de la Organización Nacional Indígena de Colombia – ONIC (Organización Nacional Indígena de Colombia ONIC., s.f), aclarando la posición del grupo de investigación. Adicionalmente se les comunicó sobre la participación justa y equitativa de los beneficios que se derivaran del proyecto atendiendo al Protocolo de Nagoya sobre Acceso y Participación en los Beneficios (Secretaría del Convenio sobre Diversidad Biológica, 2011). Dicha documentación fue entregada a la familia con el fin de que en su posesión tuviesen la oportunidad de revisar y proponer cambios a la propuesta siguiendo una política de investigación transparente con la comunidad. Las dudas que surgieron fueron resueltas inmediatamente y las sugerencias hechas tanto al proyecto como al documento de consentimiento fueron adoptadas (ver Anexo 5).

En un principio Jesús García (hijo mayor del médico tradicional) nos comentó acerca de la prevención que se tiene frente a las investigaciones y trabajos que se quieren hacer con la comunidad, dado que muchas de estas intervenciones han usado su conocimiento tradicional y su entorno para beneficio propio sin retribución a la comunidad; por lo que se les recordó que nuestro compromiso con ellos es retribuir la información que se obtenga a partir de la investigación con el material vegetal y la preparación tradicional que nos proporcionaron y de la misma manera que hizo en ocasiones anteriores.

En nuestra visita también conocimos a la esposa del abuelo “la abuela” Rosa Tejada que en mukuna (dialecto de la etnia Múidu) recibe el nombre de Naimaquicuriño (dulce) y a José García (Soratiqui-sabiduría) otro hijo del abuelo quien es cazador, lamentablemente no pudimos hablar mucho con él ya que precisamente durante la visita salió de cacería, de igual forma conocimos a Mauricio el hijo de Jesús; durante nuestro trabajo pudimos disfrutar de la hospitalidad de toda la familia, que nos brindó varios de los alimentos tradicionales, por lo que pudimos probar diferentes preparaciones de pescados, fariña y casabe (preparaciones con yuca brava) y bebidas como la caguana y el jaibiqui.

3.1.2 Recolección del material vegetal y preparación del remedio tradicional

La recolección de la planta fue guiada constantemente por Jesús, quien nos mostró que la elección de algunas especies vegetales se realiza por características organolépticas como el aroma y el sabor, otras plantas usadas con mayor frecuencia se reconocen solamente por el fenotipo. El caminar por la selva se comienza muy temprano en la mañana, lo primero que se hace es pedir permiso a la selva para entrar en ella y pedir que lo que buscamos lo encontremos “*que no se esconda*” y podamos usarlo, también es fundamental llevar el mambe y ambil este último “*para que nos proteja de accidentes en la selva*”, son aproximadamente dos horas hasta llegar a la selva propiamente dicha donde se marca el punto de partida para comenzar la búsqueda, por día se escoge una dirección en la cual explorar, se debe caminar mucho y prestar atención a todo ya que las plantas medicinales son escasas; lo que se atribuye a su poder sagrado “*como son sagradas son pocas*”.

Para el tratamiento de la malaria se busca en especial que el sabor de la planta sea amargo “*entre más amargo más contenido de quina*” por lo tanto la asocian como “*mejor para el tratamiento de la enfermedad*”, en nuestro trabajo logramos recolectar la planta de interés, un bejuco (S 04o 07.768´ W 069o 55.246´ Elevación: 307 ft; las coordenadas fueron determinadas con GPS Garmin Etrex vista®) que fue muy escaso durante nuestra búsqueda, esta es una liana, y se utiliza la corteza para la preparación medicinal, esta también es empleada junto a otras plantas para hacer curare, el abuelo afirma que “*algo puede ser remedio o veneno a la vez*” dependiendo de la preparación, también nos reportó que el bejuco es utilizado para otras patologías como el dengue y la prostatitis.

Un ejemplar del bejuco fue colectado para clasificación en el Herbario Nacional Colombiano y fue identificado como *Curarea toxicofera* (Wedd.) Barneby & Krukoff con un número de COL 570486 (ver Anexo 7). La colecta se realizó en época seca, se registró una humedad relativa de 84%, la altura de la zona se encuentra entre 90 y 100 m.s.n.m, con una temperatura entre los 29°C - 32°C.

El bejuco es una especie vegetal de la familia menispermaceae, consiste en unas lianas y enredaderas trepadoras en arboles de gran altura, su altura depende de la edad de la planta, el ejemplar que tomamos tenía aproximadamente 4 cm de ancho y 3 metros de alto, se encontró alrededor de un árbol llamado “castaño”, pose hojas grandes con el diámetro mayor de 12 cm y blanquecinas por el envés y al corte exuda líquido de color traslucido. (Figura 3-1)

Figura 3-1: Bejuco *Curarea toxicofera* (Wedd.) Barneby & Krukoff. Recién cortado



La preparación de los remedios consiste por lo general en la decocción de algunas partes de las plantas en fogón de leña; para el bejuco se utilizó la corteza del mismo, se tomaron 8 trozos de aproximadamente 10 x 2 centímetros (alrededor de 70 gr de material vegetal fresco) los cuales fueron prensados previamente y colocados en abundante agua

(cerca de 2 litros); el tiempo en el fuego está determinado por la práctica, en este caso fue de aproximadamente 30 minutos hasta observar el cambio de color del agua (Figura 3-2), posterior a la cocción, el abuelo nos comentó que el remedio se toma por tres días seguidos dos veces al día, o bien dependiendo del tiempo y complejidad del padecimiento.

Figura 3-2: Corte (Jesús García) y decocción del bejuco



El bejuco hace parte de la preparación del veneno llamado curare, en cuanto a este la abuela Rosa nos explica que *“no es un veneno como tal por que no mata”* que lo que hace es que inmoviliza al animal que se quiere cazar para que lo puedan atrapar y ahí es cuando el cazador procede a sacrificarlo *“no es veneno porque si no los animales no se podrían comer”*; la abuela nos comenta que desde niña ella vio cómo su abuelo y sus tíos preparaban el curare *“mi tío machacaba el bejuco y lo cocinaba en una olla de barro con harta agua, y al bejuco le sale todo lo amargo, se cuele y quedaba espesito, ese se guarda en un coco con artos huecos”* y cuando los hombres salen a cazar llevan el curare y *“untan un palito de algodón y lo boquetean al animal”*.

3.1.3 Medicina tradicional indígena en la comunidad ciudad Hitoma

En cuanto a la medicina tradicional indígena se percibe como un arte que se hereda; tiene una preparación desde la niñez y es una parte importante en la vida de la comunidad, la buena salud de los indígenas se la atribuyen no solo a los tratamientos

sino a la alimentación y a un estado de paz espiritual asociado a la naturaleza, mencionan el ají como componente importante para el mantenimiento de la salud ya que *“hace la sangre caliente y fortalece los glóbulos también”*, mencionan el “ambil” que significa fuerza y protección, este se prepara con hojas de tabaco las cuales se maceran y se cocinan hasta quedar una pasta seca la cual *“da fuerza por que mantiene caliente el cuerpo”*, el componente espiritual debe acompañar tanto al médico tradicional como al paciente durante el tratamiento, afirman que *“hasta el agua puede curar”* si se tiene fe y confianza, adicionalmente indican que durante un tratamiento deben cohibirse de sustancias dulces, alcohólicas y de las relaciones sexuales.

La medicina tradicional se mantiene gracias a el mambeo (reunión donde se mastica el mambe un polvo hecho de hojas de coca), porque es en estos encuentros donde los hombres y especialmente los abuelos transmiten las enseñanzas y comparten conocimientos con otros médicos, lo cual permite ampliar métodos de curación, también durante el mambeo se pueden comunicar con el padre creador y pedir por el hallazgo de una planta u otro componente de la naturaleza para lograr a curación de una persona.

La enfermedad en general la atribuyen a una alteración alimenticia y espiritual, las enfermedades han acompañado a los indígenas desde su origen y ancestralmente han desarrollado tratamientos y curas; para algunas enfermedades existen leyendas que explican su origen como maldiciones de espíritus.

El uso de plantas para el tratamiento de patologías como la malaria es un componente principal de la medicina tradicional, los médicos también experimentan con varias plantas o partes de ellas hasta encontrar la mejor opción curativa para cada individuo, ya que *“no en todas las personas funciona igual el mismo tratamiento”*. Cuando necesitan determinada planta se recurre a la chagra que es donde cultivan alimentos y algunas plantas de uso frecuente, también se considera que *“la chagra es el banco, si se necesita dinero se vende algún producto de la chagra”*, una de las plantas que se mantiene en la chagra es el tabaco que como se mencionó anteriormente es la materia prima de donde obtienen el “ambil”; otra planta fundamental en la chagra es la coca de donde obtienen el mambe después de secar las hojas en una paila grande a fuego de leña, las hojas se maceran hasta lograr un polvo fino que se guarda en tarros de plástico, el mambe se

asocia con la “palabra”, estas dos plantas junto con la albaca se consideran un regalo del padre creador y cada una de ellas tiene una leyenda que explica su origen.

En general cuando alguien de la comunidad siente malestar lo primero que hacen es tomar una infusión de albaca (que la llaman jaibiqui), la albaca es la principal planta medicinal para la comunidad y la mantienen cerca de la casa o en la chagras para su uso frecuente, reportan que mantiene la inmunidad, ayuda a eliminar sustancias del cuerpo y mantiene el funcionamiento urinario y reproductivo especialmente en las mujeres. Cuando el malestar continua a pesar del consumo de jaibiqui, se acude al médico tradicional; otra planta que nos referenciaron de uso frecuente es el “acaído” que sirve como anestesia para los dientes cuando se mastica la raíz, no pudimos ver de qué planta se trataba ya que como nos mencionó la abuela Rosa *“antes había mucho y se veía seguido en las chagras pero ya no”*; cuando las plantas no se encuentran en la chagra se camina por la selva hasta encontrarlas.

3.1.4 La malaria conocimientos, usos y actitudes

Lo primero que observamos con interés es que reconocen que la malaria es una enfermedad asociada a la colonización *“la malaria llegó con los blancos y por eso muchos indígenas sufrieron y murieron pues no tenían conocimiento sobre cómo tratarla hasta que encontraron alternativas terapéuticas en la selva”*

Describen como síntomas de la malaria, una sensación de candela en el pecho, fiebre que dura muchos días, dolor en los huesos y temblor en los músculos, adicionalmente identifican el vector trasmisor de la enfermedad que en lenguaje mukuna (etnia Múidu) lo llaman *“widodo”*; cuando alguien de la comunidad tiene malaria acude al abuelo y *“depende de la cantidad de días que lleve enfermo se da la dosis del remedio”*; según Jesús *“al principio el remedio se toma tibio pero al final es frío o si está muy avanzado se toma una gran cantidad de remedio frío”*.

3.1.5 Otras actividades importantes

La etnia a la que pertenece el médico tradicional es Muinane y su esposa Rosa es Múidu, según Jesús Muinane significa *“la gente de abajo, los dueños de la palabra de la sabiduría, dueños de la fuerza”* asociada al tabaco; Múidu viene de la palabra múrui que

significa la “*gente de arriba, dueños de muniya-amena el árbol de la abundancia del río Amazonas*”, los Múidu como la abuela Rosa hablan mukuna y los Muinane hablaban en muinane, la etnia a la que pertenecen los hijos del abuelo como Jesús y José es Muinane pues siguen la ascendencia cultural del padre; adicionalmente los dos grupos indígenas se diferencian en características folclóricas, por ejemplo las canciones de los Múidu son largas y se bailan con ramas en la mano y movimientos repetitivos “*haciendo cuclillas*”, los Muinane tienen canciones cortas por lo que cantan varias seguidas “*haciendo un mosaico*” y se baila entrelazando los brazos.

El canto en las reuniones es fundamental y una actividad muy respetada, “*hay canciones muy sagradas para meditar y otras que son canciones de fiesta para recochar*” los cantores ensayan previamente a las reuniones, y designan el cantor principal y los acompañantes que según Jesús son la alegría de las canciones, Jesús además de ser el heredero del conocimiento médico de su padre, es un cantor que con orgullo nos enseñó varias canciones de los dos grupos étnicos.

La percepción de la naturaleza es mágica ya que todos los componentes de ella se les atribuye características de los seres humanos, es como a los animales y a las plantas las llaman gente “*se les debe pedir permiso para cazar a esta gente*” como Jesús nos decía “*a esta gente: los árboles, los animales*” en las leyendas los animales cobran personalidad y pueden ser buenas o malas personas, estos también juegan un papel importante en la identificación de algunas tribus que están representadas por un animal, Jesús nos hablaba de la “gente de la nutria” “la gente del tigre” etc.

Jesús nos habló de los cambios que ha sufrido su comunidad con el paso de los años, nos mencionó que antes las tribus eran muy estrictas y por eso la gente era buena y no había tantos delitos, por ejemplo nos contó que si alguien robaba, los caciques los castigaban cortando sus manos o que si una persona comenzaba a faltar a las normas se le llamaba la atención varias veces y cuando no hacía caso se vendía esta persona a tribus caníbales como los Bora que eran “*gente guerrera*”, el abuelo también nos comentó que el gobierno ha hecho esfuerzos por proporcionarles fuentes de trabajo, pero mal planteadas para ellos ya que son empresas de colonos que no concuerdan con el estilo de vida de la comunidad.

En el anterior trabajo que se realizó, la comunidad no tenía la maloka, lo que afectaba la continuación de algunas tradiciones; en nuestra visita encontramos recién construida una maloca amplia (Figura 3-3) bajo la cual el abuelo permite la entrada de quien quiera compartir en el mambeo y así retomar algunas de las tradiciones, ya que toda la familia es consciente que la comunidad en general se encuentra bastante intervenida por la cultura occidental, lo que se evidencia con el manejo de la tecnología y el uso cada vez más frecuente de la medicina alopática.

Figura 3-3: Maloka



Las experiencias de vida urbana de algunos de sus miembros, alteran de muchas maneras la cultura ya que cambian por completo la visión tradicional del mundo; a pesar de lo fuertemente intervenidos que se encuentran, el abuelo señaló con gran sapiencia que su forma de ser es parte de su identidad como indígenas, y el orgullo de ser Muinane se ve en todos los miembros de la familia con los que pudimos hablar. De manera constante hicieron hincapié en que les gustaría que a partir de sus aportes fuese posible la construcción de una escuela y un centro de salud, que pueda manejar de manera complementaria la medicina tradicional indígena y la occidental, a lo que se les aclaró que el alcance de estas investigaciones iniciales no permite al grupo de investigación hacer compromisos de este tipo.

3.2 Evaluación de las interacciones *in vitro*

3.2.1 Evaluación de la actividad antiplasmodial y cálculo de concentraciones inhibitorias 50

Mediante el modelo farmacológico del ensayo de inhibición de la invasión y desarrollo del parásito *Plasmodium falciparum* cepa FCR-3, se observó la actividad que tiene el RT (*Curarea toxicofera* (Wedd.) Barneby & Krukoff), CQ y AS sobre el estadio eritrocitario del parásito, los resultados se muestran como curvas de concentración-respuesta evaluados por los dos métodos de lectura. (Figura 3-4. y Figura 3-5) tomando los valores obtenidos de tres ensayos independientes

Figura 3-4: Gráficas concentración- respuesta ensayos *in vitro*. Lectura por microscopía

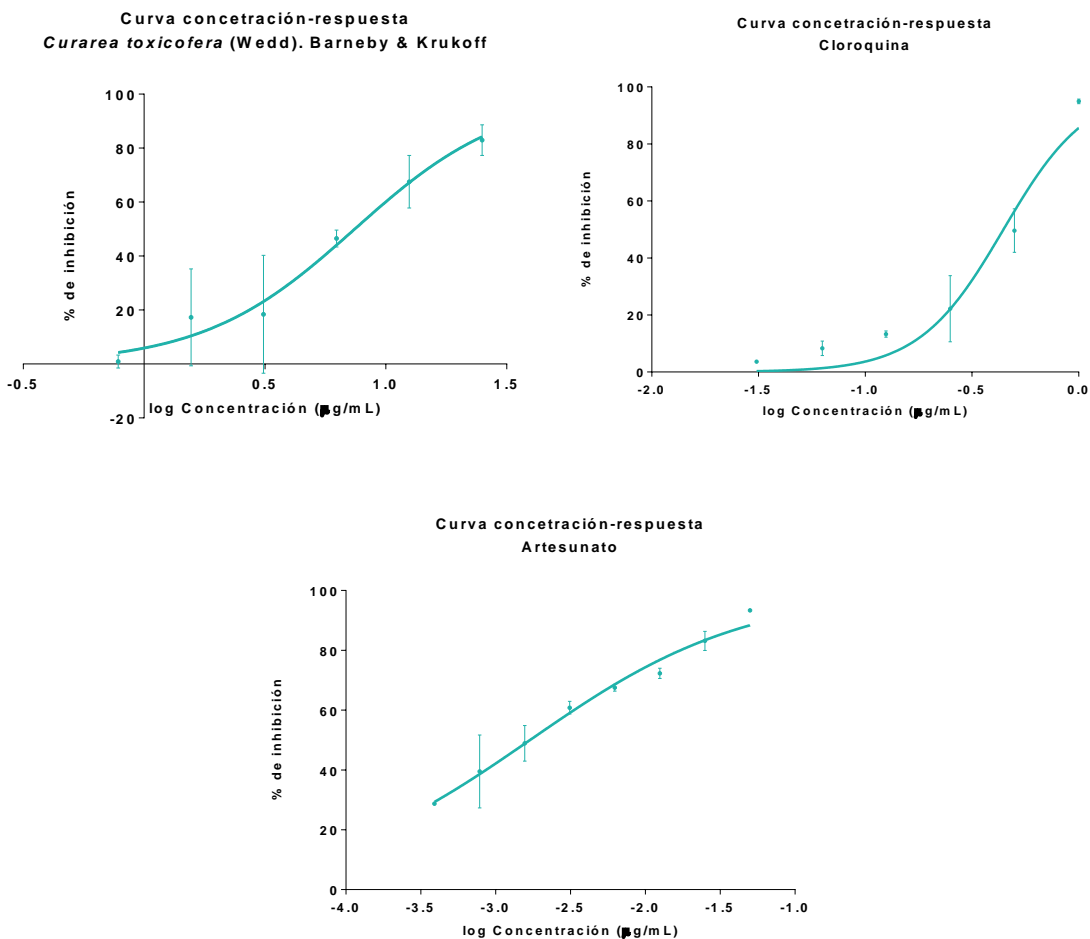
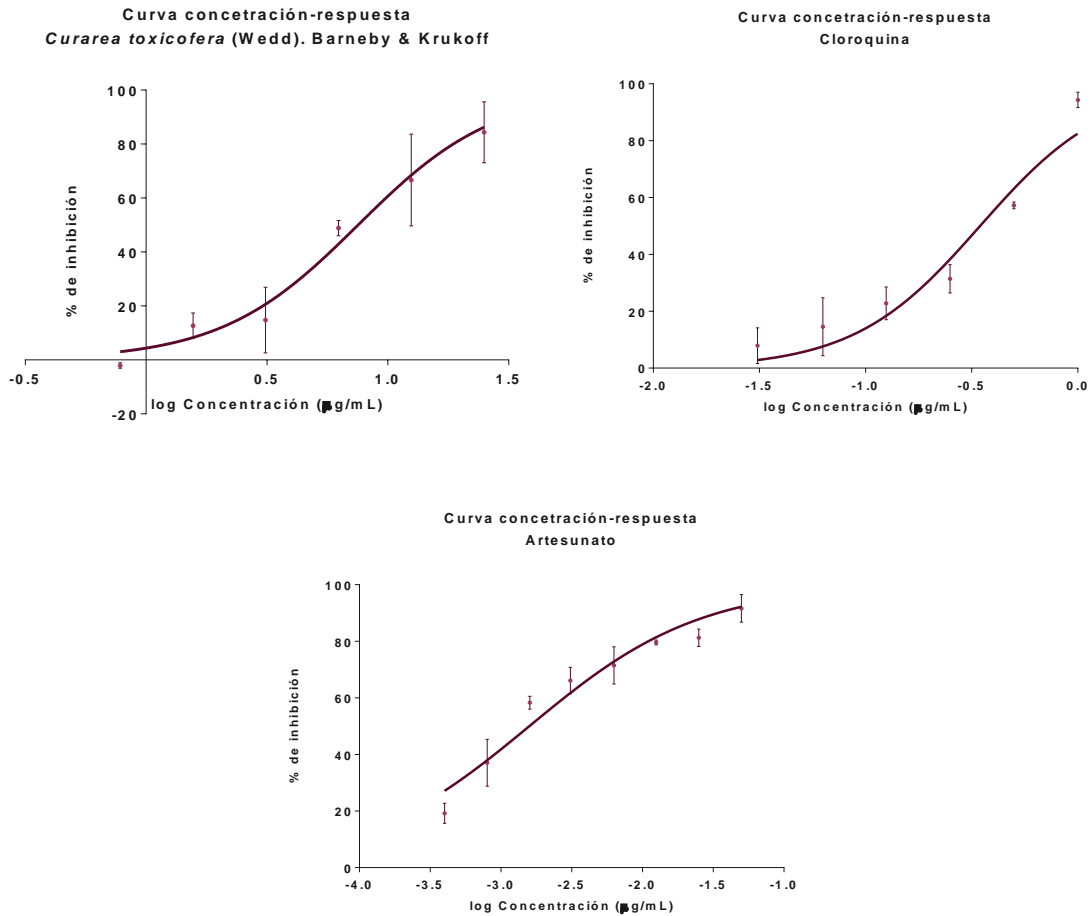


Figura 3-5: Gráficas concentración- respuesta ensayos *in vitro*. Lectura por fluorimetría

Con las curvas antes descritas y empleando regresión no lineal se calcularon las CI_{50} para cada sustancia los valores expresan el promedio \pm DE de tres ensayos independientes realizados para cada sustancia por los métodos de lectura microscopía Tabla 3-1 y fluorimetría Tabla 3-2. El análisis de los datos se realizó usando el Software Graph pad Prism 6.

Tabla 3-1: CI_{50} de las sustancias evaluadas en el ensayo de Inhibición de la invasión y el desarrollo de *P. falciparum* cepa FCR-3 por microscopía

	Microscopía		
Sustancia	CI_{50} $\mu\text{g/ml}$	CI_{50} μM	CI_{50} nM
RT	7,48 \pm 0,57	-	-
CQ	0,45 \pm 0,06	0,86 \pm 0,12	863,40 \pm 118,76
AS	0,0017 \pm 0,0005	0,004 \pm 0,0001	4,05 \pm 0,15

Tabla 3-2: CI_{50} de las sustancias evaluadas en el ensayo de Inhibición de la invasión y el desarrollo de *P. falciparum* cepa FCR-3 por fluorometría

	Fluorometría		
Sustancia	CI_{50} $\mu\text{g/ml}$	CI_{50} μM	CI_{50} nM
RT	7,85 \pm 1,21	-	-
CQ	0,34 \pm 0,05	0,66 \pm 0,09	666,51 \pm 91,99
AS	0,0016 \pm 0,00006	0,004 \pm 0,001	4,44 \pm 1,29

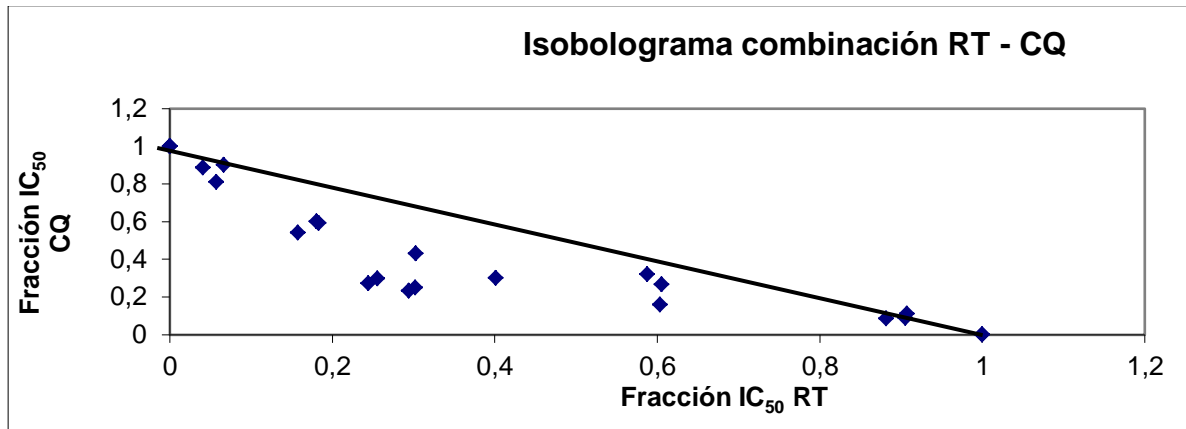
Aunque el método fluorométrico para el momento de la realización de los ensayos se encontraba en adaptación y optimización, los resultados entre los dos métodos son consistentes por lo que para los ensayos de combinación *in vitro* se decide utilizar la lectura por fluorometría únicamente, ya que por microscopía la dificultad de lectura de un número superior de pozos se hace complicada y requiere de mucho tiempo con lo cual el trabajo en el cultivo y la toma de decisiones sería muy prolongada.

3.2.2 Ensayos de combinación

Para los ensayos de combinación *in vitro*, se realizó el cálculo de la Concentración Inhibitoria Fraccional (FIC) por separado para cada sustancia con el fin de computar la sumatoria de las concentraciones inhibitorias fraccionales (ΣFIC) o Índice de Combinación (IC) estableciendo que un valor mayor a 1 implica antagonismo, un valor igual a 1 se asocia con aditividad y un valor menor a 1 concluye que la interacción es sinérgica (Fivelman *et al.*, 2004 citado en Zofou *et al.*, 2012).

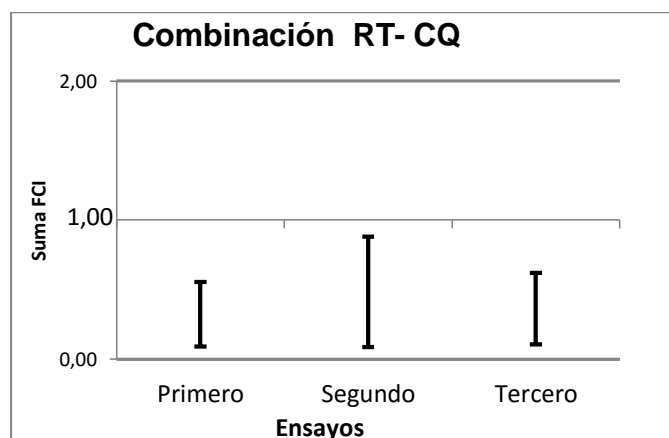
El isoblograma que reúne los tres ensayos para la evaluación de la combinación entre el RT y CQ, muestra una distribución de datos por debajo del isobolo (Figura 3-6).

Figura 3-6: Isoblograma combinación RT-CQ, resultados de tres ensayos independientes.



En el isoblograma presentado se observan los puntos coincidentes con una inhibición del 50% de la parasitemia por debajo de la línea de isobolo lo que sugiere interacción de tipo sinergismo, el cálculo del IC es de $0,39 \pm 0,16$ (expresado como promedio \pm DE*1,96) generando intervalos con un 95% de confianza (Garavito, 2007). En la Figura 3-7 se muestran los intervalos de confianza para los tres ensayos de combinación de RT y CQ, confirmando que todos los intervalos de cada uno de los ensayos se encuentra por debajo de 1, reiterando el resultado sinérgico de la combinación *in vitro*.

Figura 3-7: Límites del IC con una confianza de 95% RT-CQ



Para la combinación entre RT y AS el isoblograma en la Figura 3-8 muestra que los puntos son coincidentes con una inhibición del 50% de la parasitemia a nivel de la línea de isobolo lo que sugiere interacción de tipo aditividad, el cálculo del IC es de $0,94 \pm 0,34$ (expresado como promedio \pm DE*1,96) generando intervalos con un 95% de confianza, donde 1 se encuentra dentro de los límites, lo cual confirmaría la aditividad como tipo de interacción en los ensayos *in vitro*. (Garavito, 2007). En la figura 3-9 se muestran los intervalos de confianza para los tres ensayos de combinación de RT- AS.

Figura 3-8: Isoblograma combinación RT-AS, resultados de tres ensayos independientes

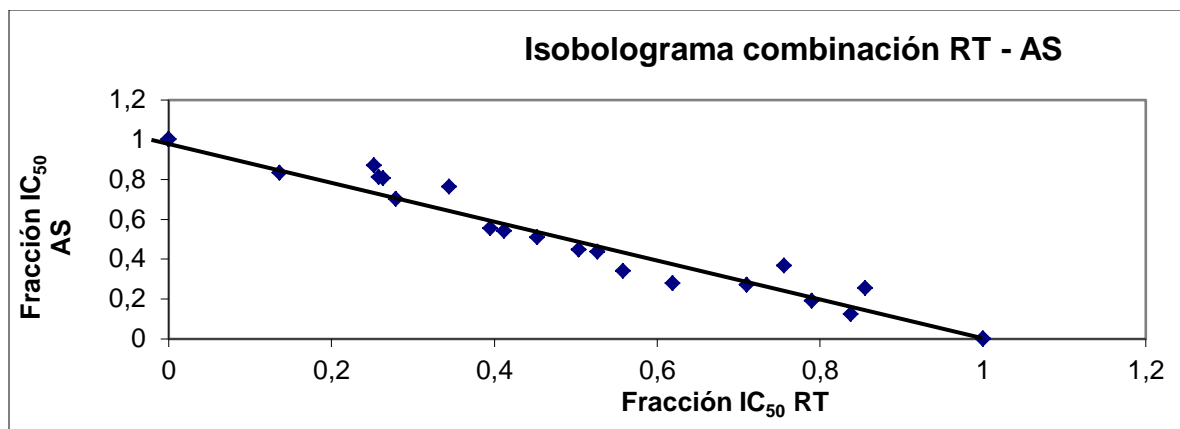
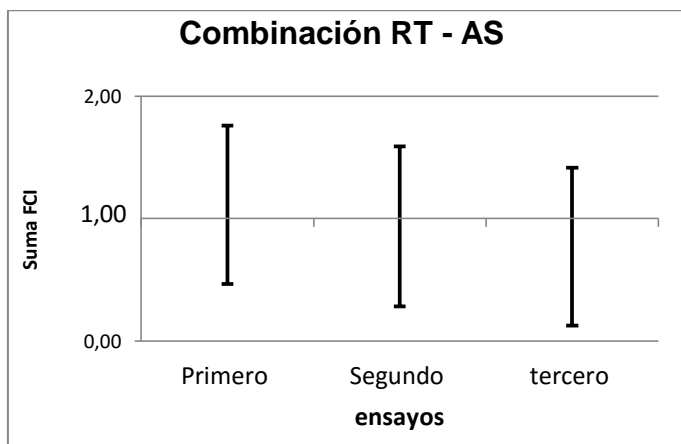


Figura 3-9: Límites del IC con una confianza de 95% RT-AS



3.3 Evaluación de las interacciones *in vivo*

3.3.1 Evaluación de la actividad antimalárica y cálculo de dosis inhibitorias 50

Por medio de un diseño experimental basado en el del Test de Peters o prueba supresiva de 4 días se evaluaron diferentes dosis del RT, CQ y AS en un único ensayo independiente para cada sustancia, las lecturas fueron obtenidas por el método microscópico y fluorométrico, mediante regresión no lineal se identificaron las DI_{50} para cada sustancia, los valores expresan el promedio \pm DE (Tabla 3-3). El análisis de los datos se realizó usando el Software Graph pad Prism 6.

Tabla 3-3: DI_{50} ensayo *in vivo*, Test de Peters, Cepa *P. berghei* ANKA

Sustancia	DI_{50} microscopía (mg/kg)	DI_{50} Fluorometría (mg/kg)
RT	358 \pm 48	329 \pm 66
CQ	2,95 \pm 0,42	3,05 \pm 0,23
AS	2,76 \pm 0,12	2,66 \pm 0,07

Dentro del protocolo se evaluó la mortalidad de los individuos como una variable dura para cada ensayo, también se administró eutanasia teniendo en cuenta el punto final del ensayo para cada individuo según los síntomas desarrollados y la calidad de vida que cada organismo presentara. Se presentan la mortalidad de los individuos para el ensayo de DI_{50} del RT (Tabla 3-4); CQ (Tabla 3-5) y AS (Tabla 3-6).

Tabla 3-4: Mortalidad en el ensayo DI_{50} del RT

Tratamiento	Promedio supervivencia (días)	Prueba de Dunnett 95% confianza
Control (Vehículo)	8,8	
RT 100mg/kg	10,6	Sin evidencia para concluir diferencias con el control
RT 200mg/kg	11,4	Sin evidencia para concluir diferencias con el control
RT 400 mg/7kg	11,4	Sin evidencia para concluir diferencias con el control
RT 800 mg/kg	13,2	Diferencias significativas con el control
CQ 3 mg/kg	12,2	Diferencias significativas con el control

Tabla 3-5: Mortalidad en el ensayo DI_{50} de CQ

Tratamiento	Promedio supervivencia (días)	Resultado ANOVA
Control (Vehículo)	9	no hay diferencias estadísticas entre los tratamientos
CQ 0,8mg/kg	10	
CQ 1,5mg/kg	8,6	
CQ 3mg/kg	9,8	
CQ 6mg/kg	10,4	

Tabla 3-6: Mortalidad en el ensayo DI_{50} de AS

Tratamiento	Promedio supervivencia (días)	Prueba de Dunnett 95% confianza
Control (Vehículo)	9,7	
AS 2,5mg/kg	11,7	Sin evidencia para concluir diferencias con el control
AS 5mg/kg	13,3	Diferencias significativas con el control

3.3.2 Ensayos de combinación

Los ensayos de combinación se realizaron como se describió en la metodología, por separado para cada combinación.

En Figura 3-10 se observan los resultados obtenidos para la combinación entre el RT y CQ *in vivo* por el método de lectura de fluorimetría, en la parte superior de la gráfica se muestra el porcentaje (%) de inhibición de la parasitemia que se logró con la combinación, la parte inferior muestra el porcentaje (%) de inhibición de la parasitemia obtenida por el RT solo a dos concentraciones DI_{50} y DI_{90} , en el medio se registra el porcentaje (%) de inhibición de la parasitemia obtenida para CQ sola a las dosis de 3mg/kg y 1,5mg/kg. Las barras de color blanco muestran el valor teórico esperado si el resultado de la interacción fuera aditividad.

Figura 3-10: Ensayo combinación RT-CQ *in vivo*, Test de Peters, Cepa *P. berghei* ANKA. Método de lectura fluorometría.

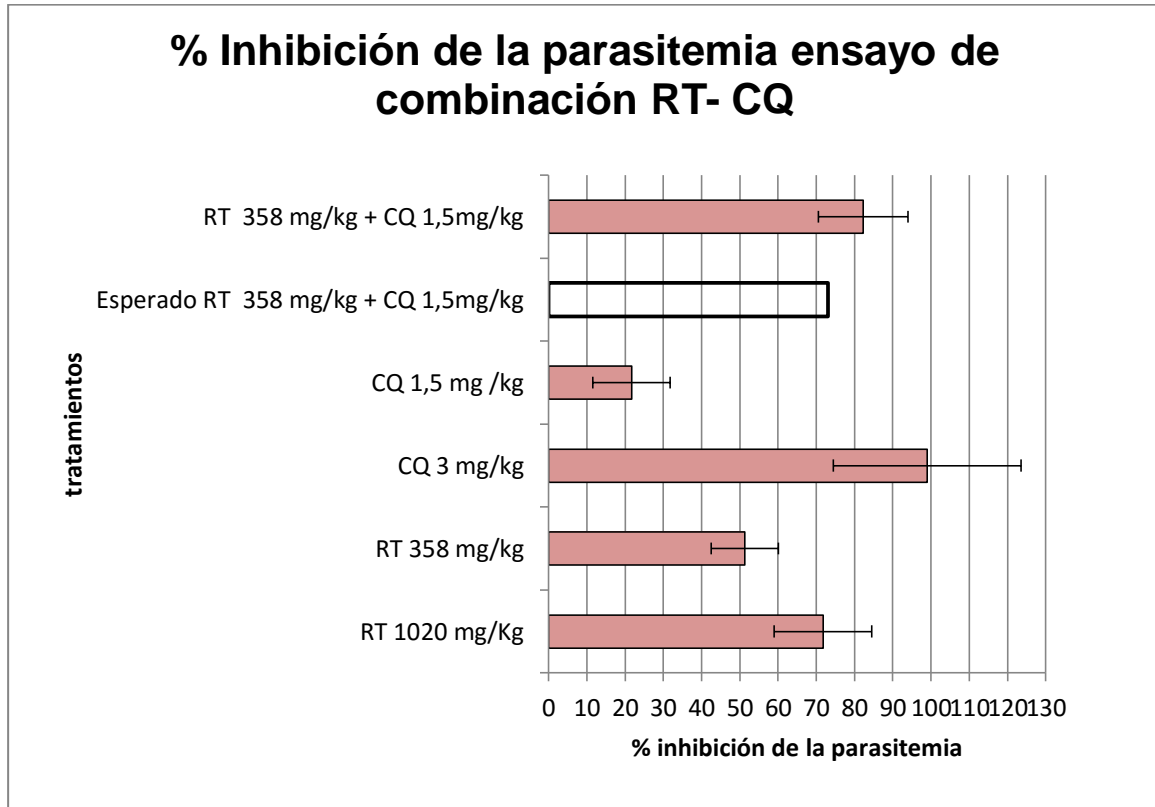


Tabla 3-7: Mortalidad para el ensayo de combinación RT-CQ.

Tratamientos	Promedio supervivencia (días)	Prueba de Dunnett 95% confianza
Control (Vehículo)	9,4	
CQ 3 mg/kg	13	Sin evidencia para concluir diferencias con el control
RT 1020mg/kg	13,2	Diferencias significativas con el control
CQ 1,5 mg/kg	11,2	Sin evidencia para concluir diferencias con el control
RT 358mg/kg	12,2	Sin evidencia para concluir diferencias con el control
Combinación RT 358mg/kg + CQ 1,5mg/kg	11,6	Sin evidencia para concluir diferencias con el control

En Figura 3-11 se observan los resultados obtenidos para la combinación entre el RT y AS por el método de lectura fluorométrico, en la parte superior de la figura se muestran las combinaciones, la parte inferior muestra las sustancias solas a las concentraciones evaluadas para cada una. Las barras de color blanco muestran el valor teórico esperado si el resultado de la interacción fuera aditividad.

Figura 3-11: Ensayo combinación RT- AS *in vivo*, Test de Peters, Cepa *P. berghei* ANKA. Método de lectura fluorometría

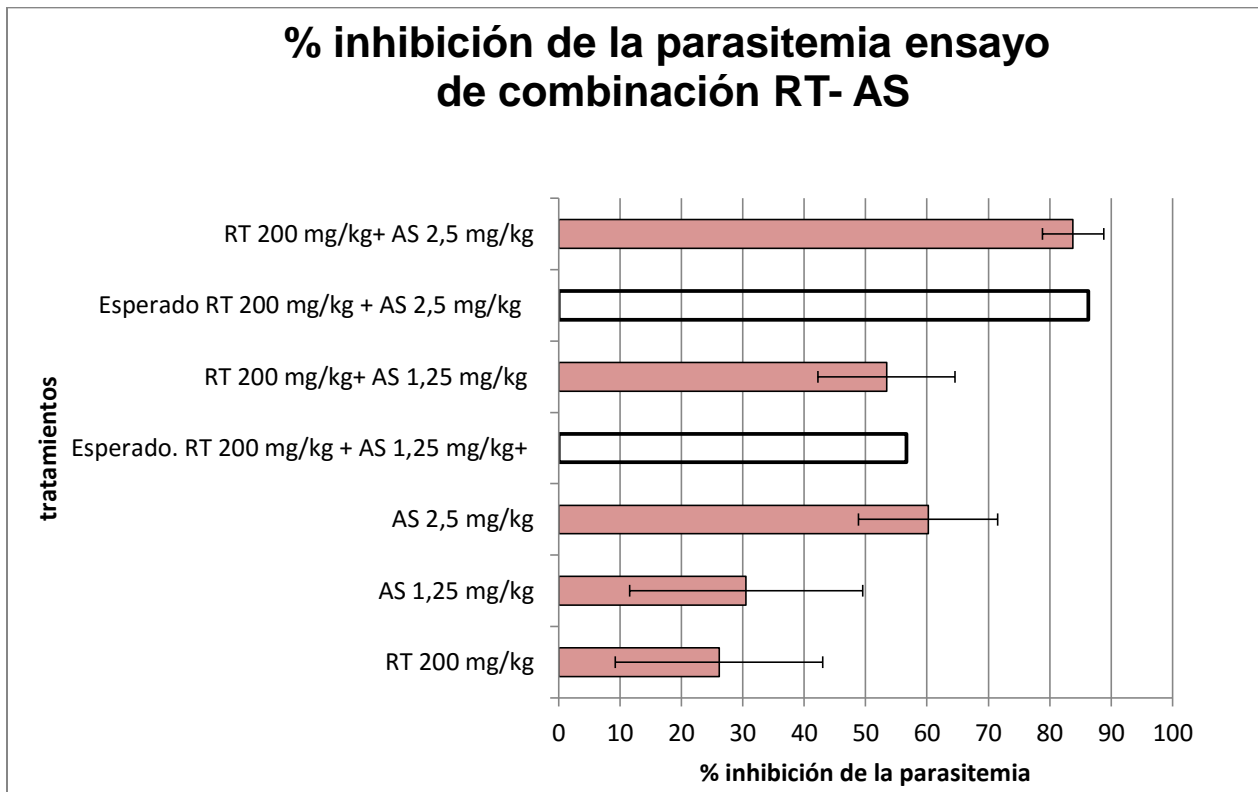


Tabla 3-8: Mortalidad para el ensayo de combinación RT-AS.

Tratamientos	Promedio supervivencia (días)	Prueba de Dunnett 95% confianza
Control (Vehículo)	9,4	
AS 1,25mg/kg	10,6	Sin evidencia para concluir diferencias con el control
AS 2,5mg/kg	12,2	Diferencias significativas con el control
RT 200mg/kg	10,6	Sin evidencia para concluir diferencias con el control
Combinación AS 1,25 mg/kg + RT 200mg/kg	12,8	Diferencias significativas con el control
Combinación AS 2,5 mg/kg + RT 200mg/kg	13,4	Diferencias significativas con el control

4. Discusión

El médico tradicional de la comunidad ciudad Hitoma y su familia, son fuente y resguardan un inmenso conocimiento medicinal para múltiples enfermedades que los han aquejado por generaciones, entre estas la malaria; el saber tradicional de esta población como el de muchas otras en el país se encuentra en un grave peligro, ya sea por las problemáticas sociales que enfrentan, por la disminución constante de la tradición oral por la cual se transmiten estos conocimientos, derivada de la influencia occidental que genera falta de interés de las nuevas generaciones en ese conocimiento, como por los mecanismos actuales de protección del conocimiento médico tradicional que no están contemplados para el alcance de comunidades como esta.

En Colombia los mecanismos de protección no son claros y aún no se ha instaurado una biblioteca de conocimientos tradicionales que permita una protección preventiva sobre los mismos, de manera similar a lo realizado por otros países como anteriormente se describió, por lo que vemos en nuestro trabajo una opción para consignar el uso de *Curarea Toxicofera* (Wedd.) Barneby & Krukoff por la comunidad ciudad Hitoma para el tratamiento de la malaria; el presente trabajo también ofrece una oportunidad en cuanto a la documentación de este conocimiento previniendo la pérdida del mismo debido a la lamentable desaparición de las comunidades indígenas o por la pérdida de sus valiosas tradiciones.

El abordaje para encontrar un antimalárico en fuentes naturales tiene muchas variantes se destacan los enfoques principales a continuación: selección aleatoria seguido del screening químico; selección aleatoria seguida de los ensayos antimicrobianos, el seguimiento de los informes de actividad antimicrobiana y por último el seguimiento de los usos etnomédicos de las plantas en contra las enfermedades (Chinwe, Obinna, Ebele y Chukwuemeka, 2010). De estos cuatro enfoques la selección de plantas en función de

la información etnobotánica ha demostrado reducir el tiempo y los recursos en la consecución de material herbal con propiedades terapéuticas (Adebayo y Kretti, A, 2011). Este enfoque es el que el grupo de investigación FaMeTra (Farmacología de la medicina tradicional y popular) ha decidido adelantar y ha llevado a cabo en los últimos 13 años, con resultados positivos e interesantes, adicionalmente el bagaje cultural y etnofarmacológico que los investigadores hemos recibido de la comunidad indígena y del proceso de investigación *per se*, es sumamente enriquecedor como profesionales en ciencias básicas y de la salud y como personas.

Para el presente estudio se consideró la utilización del RT preparado por el mismo abuelo (Médico tradicional, José Octavio García), con el fin de investigar de la manera más cercana la realidad a la que la comunidad está expuesta, por lo que coincidimos con lo expuesto por (Adebayo y Kretti, A, 2011), quien menciona la importancia de seguir las indicaciones de la preparación respecto a lo descrito por los médicos tradicionales, con el fin de imitar de manera autóctona la forma en que las plantas son utilizadas (Adebayo y Kretti, A, 2011).

En la medicina popular de Nigeria se han identificado principios activos contra la malaria en 16 plantas, entre los compuestos activos aislados de estas se evidenció como metabolito secundario principal los alcaloides, seguido de limonoides (Adebayo y Kretti, A, 2011), lo cual sugiere que la presencia de alcaloides en las plantas tiene un efecto positivo contra *Plasmodium sp*, siendo este el caso de *Curarea Toxicofera* (Wedd.) Barneby & Krukoff, para la cual en nuestro grupo de investigación se han identificado metabolitos como alcaloides y Esteroides/triterpenos (Rodríguez, 2015; Cardenas, 2011), Rodríguez (2015) también presume la presencia de flavonoides como otro metabolito secundario presente en el remedio tradicional de *Curarea Toxicofera* (Wedd.) Barneby & Krukoff. La presencia de alcaloides para la especie parece ser el hallazgo predominante ya que la identificación de este metabolito secundario coincide con otros reportes donde no solo han identificado estructuras alcaloideas sino que han aislado específicamente en la planta los siguientes alcaloides (-)-Curina, (+)-Isochondodendrine, (-)-Toxicoferina y una mezcla 1:1 de (-)-Curina y (-)-Tubocurine (Menachery, 1996).

Los ensayos *in vitro* nos permitieron obtener una CI_{50} para el RT de $7,48 \pm 0,57 \mu\text{g/ml}$ y $7,85 \pm 1,21 \mu\text{g/ml}$ por los métodos de microscopía y fluorimetría respectivamente, valores que se encuentran en el mismo grado de magnitud que los resultados obtenidos por Rodríguez (2015) de $6,56 \pm 0,18 \mu\text{g/ml}$ y por Cardenas (2011) de $3,02 \pm 1 \mu\text{g/ml}$ para la misma preparación tradicional mediante el método de microscopía. En los ensayos *in vivo* se obtuvo una DI_{50} para el RT de $358 \pm 48 \text{ mg/kg}$ y $329 \pm 66 \text{ mg/kg}$ por los métodos de microscopía y fluorimetría respectivamente, resultado que concuerda con el hallazgo de Rodríguez (2015) donde reporta una inhibición de la parasitemia *in vivo* del 64,21% para el RT a una dosis de 400 mg/kg. Los resultados de CI_{50} y DI_{50} mencionados para la presente investigación se clasifican como una actividad antimalárica de buena a moderada según los criterios de la red RITAM (Rodríguez, 2015) de similar manera otro estudio etnofarmacológico en antimaláricos considera compuestos con buena actividad a los extractos con CI_{50} menores a $5 \mu\text{g/ml}$ (Adebayo y Kretti, A, 2011), encontrando nuestros resultados en este mismo orden de magnitud.

A pesar que los datos de las CI_{50} son decisivos para considerar un compuesto o una preparación como activa, no se pudo pasar por alto que los productos naturales así como los sintéticos se metabolizan y tienen un proceso farmacocinético a menudo totalmente ignorado (Adebayo y Kretti, A, 2011), por lo que estudios de actividad *in vivo* y de farmacocinética son muy útiles para confirmar la actividad de un producto. Lamentablemente los compuestos activos en las plantas a menudo se encuentran en bajas concentraciones lo que limita su dosificación en modelos *in vivo* y obviamente necesitan de dosis altas lo que disminuye su significancia en el uso terapéutico (Adebayo y Kretti, A, 2011). En nuestro caso la DI_{50} obtenida para RT resulta ser una dosis media, comparada con otros estudios *in vivo* que evalúan dosis de extractos herbarios desde 100 mg/kg hasta 800 mg/kg; a las cuales al obtener un % de inhibición de la parasitemia superior al 50 % las reporta como promisorios antimaláricos.

La realización de los ensayos de combinación responde a la necesidad de instaurar estrategias que contrarresten el rápido desarrollo de la resistencia a antimaláricos por parte del parásito (Co, E, 2009) y a la necesidad de estudiar el uso concomitante que se da frecuentemente en zona endémica. Debido a que todas las culturas y en especial las comunidades indígenas como la comunidad ciudad Hitoma tienen una larga historia de medicina tradicional, no es extraño que se reporte que alrededor del 80% de la población

de los países en desarrollo como Colombia todavía utilizan medicinas tradicionales para su atención médica, situación que fue evidente en la visita a la comunidad, adicionalmente se menciona que el costo de los remedios tradicionales es más bajo que el costo actual de los medicamentos occidentales (Kim, 2005; OMS, 2006; Graz *et al.*, 2011) y teniendo en cuenta los bajos ingresos monetarios que devengan los miembros de la comunidad y de la familia del médico tradicional, el factor económico es un elemento importante a tener en cuenta en el porqué de la combinación de terapias, adicional a la confianza innata que tienen en su medicina ancestral.

Del mismo modo se reporta que una tercera parte de la población mundial aún carece de acceso regular a los medicamentos modernos esenciales, (OMS, 2006) y cuando es posible, la medicina occidental se utiliza en conjunción con la medicina tradicional (Organización de las Naciones Unidas para la Educación, la Ciencia y la Cultura UNESCO, 2011). En relación a lo anterior, el acceso a los centros de salud por parte de la población indígena de la comunidad lo acarrearán los seguros estatales de salud, aunque también ellos indican que el desplazamiento lo deben hacer hasta el centro de Leticia y desde la comunidad el trayecto solo se puede hacer en moto, ya que la distancia de la maloka u otros lugares de la comunidad hasta la avenida por donde pasa el transporte urbano es de difícil acceso, situación que en un paciente con una enfermedad debilitante como la malaria dificultaría la llegada a un centro de salud convencional, por lo que al llegar a este seguramente ya habrá consumido remedios tradicionales, escenario que junto con las anteriores situaciones explica el uso de la terapia tradicional en conjunto con la terapia occidental ya que el uso de cualquier tipo de medicamentos por lo general no es mutuamente excluyente para los pueblos indígenas o no indígenas (Economic and Social Council Chamber., 2009), como probablemente sucede con frecuencia en la comunidad ciudad Hitoma y en otras muchas, como lo reportado en estudios realizados en la India donde el uso de los extractos de plantas junto con cloroquina para el tratamiento de malaria es habitual (Chenniappan y Kadarkarai, 2010) y como en zonas endémicas de malaria en la región central y oriental africana donde reportan el uso concomitante de extractos de la planta *Aspilia africana* y artemisinina (Waako *et al.*, 2005).

Sin embargo y pese a la utilidad de la medicina tradicional el uso inadecuado de los conocimientos locales e indígenas podría ser una práctica potencialmente peligrosa si los mecanismos de control apropiados no están preparados para actuar; dentro del contexto de la atención primaria de salud, se considera que los dos tipos de medicina tradicional y occidental se podrían mezclar en una armonía beneficiosa (Economic and Social Council Chamber., 2009). Situación que no en todos los casos tiene un desenlace conocido y que inevitablemente puede producir interacciones beneficiosas o perjudiciales (Lin, 2014). Interacciones que fueron uno de los principales objetivos del presente estudio con el fin de aportar conocimiento a los mecanismos de control en salud para el país y en especial para la región.

La elección de la cloroquina (CQ) como uno de los medicamentos a evaluar en combinación se relaciona a la presencia mayoritaria de casos por *P. vivax* en nuestra región, asociado con la recomendación de la OMS sobre el uso de cloroquina como tratamiento de la malaria producida por *P. vivax*. (Rodríguez, et al., 2009; OMS, 2015b), concordando con la Guía para Atención Clínica Integral del paciente con malaria, implementada para Colombia (MINSALUD, 2010).

La cloroquina es una 4-aminoquinoleína con actividad esquizonticida pronunciada y rápida contra las formas hemáticas de los parásitos, produce una alta mortalidad en estos, modificando el pH de la vacuola parasitaria y evitando que el parásito cristalice la hemoglobina (OMS, 1995; Garavito, 2007), es efectiva sobre *P. ovale* y *P. malariae* y sobre las cepas susceptibles de *P. vivax* y *P. falciparum*, no es activa contra las formas intrahepáticas (OMS. 1995). En los ensayos *in vitro* el cálculo de la CI_{50} para cloroquina fue comparable con lo reportado por otros autores para la cepa FCR3 de *P. falciparum* (Pradines, et al., 2002; Molyneaux, Krugliak, Ginsburg y Chibale, 2005; Guetzoyan et al., 2007; Mendoza et al., 2011), lo que indica que en el tiempo que hemos trabajado la cepa, esta no ha variado de forma relevante su sensibilidad frente a la CQ.

Siendo este un fármaco de bajo costo la combinación de CQ con otra molécula o extracto que sea efectiva y que en combinación muestren efectos positivos, podría ser una ayuda en el tratamiento de la malaria ya que el alto costo de las terapias es un impedimento para el acceso a las mismas (Rodríguez A. et al., 2009). El resultado de la combinación según el método de análisis utilizado concluyo que la interacción entre RT y CQ a nivel *in*

vitro es de tipo sinérgico, “La sinergia tiene lugar cuando la combinación de dos sustancias da como resultado una mayor intensidad de la respuesta que la que se espera bajo la suposición de aditividad (sin interacción) y de los efectos de cada uno de los fármacos por separado” (Jonker *et al.*, 2005) para una cepa resistente a CQ como FCR3 el resultado sinérgico *in vitro* entre el RT y CQ es un hallazgo importante ya que sugiere a largo plazo la posible reactivación de la CQ al combinarse con otras moléculas presentes en el RT, lo que apunta a un beneficio en cuanto al uso renovado de una terapia económica y la probable disminución del valor que representa luchar contra una cepa resistente de malaria.

El RT mostró aditividad al combinarse con CQ en el ensayo *in vivo* en ratones; sugiriendo que al combinarse los efectos de las dos sustancias activas se sumarían en el tratamiento considerándose una respuesta positiva. El resultado de la interacción del RT y CQ *in vitro* (sinergismo) difiere del resultado *in vivo* (aditividad), a pesar de este último resultado en el contexto de una medicina herbal, los niveles más bajos de sinergia son todavía útiles, ya que contribuyen al efecto mejorado (Rasoanaivo *et al.*, 2011); también se puede considerar efectos sinérgicos cuando se logra una reducción de los efectos secundarios indeseados sin que haya necesariamente un aumento del efecto terapéutico *per se* (Jonker *et al.*, 2005). En nuestro diseño experimental no se planteó el estudio de efectos adversos de la CQ y la posible disminución de estos al ser combinado con el RT, lo cual posiblemente podría transformar el resultado de aditividad antimalárica confirmando la sinergia presentada en el ensayo antiplasmodial. La disminución de efectos adversos se espera lograr al utilizar menores dosis, reduciendo el riesgo de toxicidad asociado generalmente a estas terapias, en caso de lograr esta reducción de dosis se sustentaría la utilidad de la preparación tradicional en el tratamiento de la enfermedad y en combinación con CQ.

Los resultados diferentes entre los ensayos de actividad antiplasmodial y antimalárica y entre los ensayos de combinación *in vitro* e *in vivo* se justifican en que en los sistemas *in vitro* se mide la actividad antiparasitaria directa, mientras que en los ensayos *in vivo* los parásitos están expuestos a niveles variables de fármacos y sus metabolitos (Snyder, Chollet, Santo-Tomas, Scheurer y Wittlin, 2007). Es importante tener claro que la respuesta sinérgica esta conferida por las características farmacológicas de la

combinación de xenobióticos y el sistema biológico integro en el que actúan, por lo que una combinación de sustancias que resulta ser sinérgica en el receptor a nivel *in vitro*, puede no ser sinérgica a nivel de la respuesta *in vivo* ya que en el modelo *in vivo*, adicionalmente al papel farmacodinámico se cuenta con la farmacocinética de los mismos (Jonker *et al.*, 2005). Esta aclaración justifica en parte los resultados en la combinación RT–CQ. Adicionalmente Jonker *et al* (2005) presentan su posición crítica frente a ensayos donde se utiliza concentraciones fijas de las sustancias a combinar como se realizó en el presente estudio *in vivo*, ya que por modelos matemáticos “*response surface methodology*” estos autores mencionan que aunque útil para una comparación directa los resultados experimentales con concentraciones fijas, no muestran el grado de sinergismo y/o antagonismo de diferentes concentraciones de ambas sustancias.

La segunda especie en frecuencia responsable de producir malaria en el país es *Plasmodium falciparum*, dicha especie implica una preocupación importante ya que para esta se reportan más casos fatales que en las demás especies; se escogió el artesunato (AS) como otro medicamento de uso común para evaluar en combinación con el RT dado que la OMS recomienda los tratamientos combinados basados en derivados de la artemisinina para el tratamiento del paludismo producido por *P. falciparum* (OMS. 2015b) La aparición de resistencia de *P. falciparum* a la artemisinina y sus derivados, y a otros antimaláricos presenta una preocupación en materia de salud pública ya que afecta la sostenibilidad del esfuerzo que se ha realizado a escala mundial para reducir la carga del paludismo (OMS 2015a). En Colombia se reportaron cepas resistentes de *P. falciparum* a cloroquina por primera vez en 1961, siendo el segundo reporte mundial después de Tailandia (Rodríguez *et al.*, 2009) adicional a esto la carga que se presenta en la costa pacífica nos ubica como país en una situación de alarma por esta infección (INS, 2016b).

El artesunato es un hemisuccinato derivado de la artemisinina, soluble en agua (OMS, 1995) cuyo mecanismo de acción está relacionado con estrés oxidativo, modificación de las membranas del retículo endoplasmático, a nivel de la mitocondria parasitaria (Garavito, 2007) y con la síntesis de proteínas en el parásito (Rodríguez *et al.*, 2009). También se reporta la inhibición de Ca²⁺-ATPasa (PfATP6) parasitaria impidiendo el transporte de iones dentro del parásito (Arnou *et al.*, 2011). La artemisinina y sus derivados no deben ser monoterapia oral, ya que esto promueve la aparición de

resistencia al tratamiento (OMS, 2015b), por lo que se debe procurar la administración conjunta con otra molécula eficaz.

El Artesunato en nuestros ensayos *in vitro* reporto CI_{50} comparables a lo reportado en la literatura (Vivas *et al.*, 2007; Jiang GF. 1992; Iwatsuki *et al.*, 2011) al igual que los resultados encontrados en los ensayos *in vivo* donde la ID_{50} fue similar a lo descrito por otros autores. (de Pilla *et al.*, 2008; Vivas *et al.* 2007; Ocloo, Okpattah, Quasie, Sakyamah, y Okine, 2014; Adegbolagun, Emikpe, Woranola, y Ogunremi, 2014).

Los derivados de la artemisinina son medicamentos de alto costo en comparación con moléculas más antiguas como la quinina (Orjuela *et al.*, 2004), encontrar una combinación probablemente sinérgica que pueda disminuir la dosis de este puede ser una opción para contribuir a los esfuerzos mundiales por el control de la enfermedad. Como se demostró la combinación RT-AS tanto *in vitro* como *in vivo* presentó aditividad, lo que sugiere que el RT podría ser una opción positiva a futuro, para combinar con AS a nivel de la comunidad en caso de ser necesario.

En las recomendaciones ya descritas por la OMS se plantea como *plus* del tratamiento las combinaciones con derivados de artemisinina, por lo que se busca un fármaco o sustancia que funcione como pareja ideal al combinarse con dichos derivados, (Mishra, Chakraborty, Pal y Dey, 2010; Snyder *et al.*., 2007), el AS tiene un tiempo corto de vida media por lo que pueden quedar parásitos residuales (Kerb *et al.*, 2009), por lo tanto el fármaco-pareja ideal para el AS debería tener un prolongado tiempo de vida media con el fin de evitar la recrudescencia de la enfermedad y limitar el desarrollo de la resistencia comúnmente asociado con la monoterapias (Snyder *et al.*., 2007; Kerb *et al.*, 2009). En este caso la administración concomitante de AS y el RT, mostro aditividad tanto *in vitro* como *in vivo* lo cual es benéfico para la terapia, la profundización en cuanto a la cinética del RT podría definir el tiempo de vida media de las moléculas que lo componen y favorecer aún más la recomendación de su administración conjunta.

Los productos a base de plantas contienen varios productos químicos que son metabolizados en las vías de fase I y fase II y también sirven como sustratos para ciertos transportadores. Debido a su interacción con estas enzimas y transportadores existe la

posibilidad de generar una alteración en la actividad de enzimas que intervienen en el metabolismo de fármacos y transportadores de los mismos (Venkataramanan *et al.*, 2006). El potencial de los productos naturales para provocar interacciones con la terapéutica occidental está siendo descubierto y analizado tanto en el nivel del sistema CYP 450 como a nivel de transportadores intracelulares y plasmáticos; un ejemplo de transportador intracelular es la glucoproteína P (P-gp) (Hayeshi *et al.*, 2006). La P-gp está ampliamente distribuida y se expresa en las células del epitelio intestinal, hepatocitos, en las células del riñón y en las células del endotelio capilar formando parte de la barrera hematoencefálica, esta se encarga de expulsar gran cantidad de sustancias (xenobióticos) fuera de la célula (Ferreiros., s.f). En el estudio de Hayeshi (2006) se demostró que el AS no inhibe la P-gp, aunque la dihydroartemisinina si, al igual que la CQ que también demostró tener la capacidad de inhibir esta proteína. La CQ también parece ser un amplio inhibidor de los transportadores ABC y a la vez un sustrato potencial de algunos de ellos (Kerb *et al.*, 2009). Sin embargo la combinación de RT-CQ o de RT-AS a las dosis utilizadas no demostró efectos de toxicidad aguda o de inhibición del efecto antimalárico de las sustancias combinadas, por lo que podemos suponer que las dosis utilizadas de las sustancias no repercutieron en interacciones con esta proteína transportadora.

En el mismo estudio (Hayeshi *et al.*, 2006) revisaron algunos compuestos flavonoides e identificaron que estos tienen capacidad de inhibir la actividad de la P-gp aunque en porcentajes muy bajos, los flavonoides reportados por Rodriguez (2015) para *Curarea Toxicofera* (Wedd.) Barneby & Krukoff, parecen no interferir en la actividad de la P-gp ya que no se evidencio alteraciones negativas en los resultados *in vivo* para las combinaciones RT-CQ o de RT-AS.

Los siguientes alcaloides aislados de plantas medicinales tienen diferentes relaciones con la P-gp: la berberina y el Coptisine induce la expresión de P-gp y a la vez son sustrato de la misma, el Palmatine y el Jateorhizine son sustrato de la P-gp y los alcaloides Berbamine, Fangchinoline y el 5-Bromotetrandrine han demostrado inhibir la P-gp (Wu *et al.*, 2015), ya que no todos los alcaloides comparten el mismo comportamiento sobre esta proteína y sobre otros transportadores no podemos generalizar ni suponer algún comportamiento de los alcaloides presentes en el RT sobre la Glicoproteína P u otras proteínas de transporte, por lo cual la profundización en el

impacto del RT sobre esta proteína sería de gran beneficio, aún más cuando los dos fármacos o los metabolitos de estos si han demostrado inhibir la P-gp.

Continuando con la interacción con proteínas el cual es un factor importantísimo en la cinética de los fármacos y otros xenobióticos como los productos herbales, es claro que la eficacia de los fármacos está directamente relacionada con la concentración libre de dichas sustancias en el plasma (Rolan, 1994 citado en Shao, Ai, Xu y Fan, 2016). Las interacciones entre fármacos y xenobióticos pueden ocurrir cuando la administración se hace en conjunto ya que estos pueden competir por el mismo sitio de unión a proteínas plasmáticas, lo que conduce a la fluctuación inesperada de la concentración plasmática de los medicamentos administrados (Rowley *et al.*, 1997; Smith y de Waterbeemd, 1999 citados en Shao *et al.*, 2016), este caso ha sido demostrado en la administración simultánea del extracto de la planta *Salvia miltiorrhiza* con warfarina, donde este anticoagulante se libera de su unión con la albúmina aumentando sus concentraciones libres en el plasma y por lo tanto potenciando la actividad anticoagulante, que en este caso llega a ser contemplado como un riesgo (Shao *et al.*, 2016), para *Curarea Toxicofera* (Wedd.) Barneby & Krukoff y sus metabolitos no se conoce el porcentaje de unión a proteínas plasmáticas y a pesar de no haber evaluado las concentraciones plasmáticas de CQ o de AS en los ratones a los cuales se les administró concomitantemente el RT, el efecto antimalárico de los dos fármacos no mostró variación significativa comparado con el efecto antimalárico cuando estos se administraron solos, como tampoco se evidenciaron efectos adversos relacionados con una elevada concentración de dichos fármacos, lo que lleva a inferir superficialmente que el remedio no está desplazando la unión de estos fármacos a dichas proteínas.

Aunque varios modelos farmacocinéticos han supuesto la entrada de la CQ al parásito por difusión simple, otros estudios han demostrado que la absorción parasitaria de CQ es saturable, una propiedad que es indicativa de la existencia de un transportador, dicho de otro modo “una proteína codificada específica del parásito que facilita la absorción de la CQ” (Sánchez, Wünsch, y Lanzer, 1997), como no se evidencio efecto antagónico alguno en la combinación RT-CQ en el modelo *in vitro* ni en el ensayo *in vivo*, se puede sospechar que el mecanismo de acción del RT sobre el parásito no implica de forma relevante este transportador. Por otra parte tenemos en cuenta que Jonker (2005)

menciona que la respuesta sinérgica se produce sólo en condiciones y en concentraciones específicas, por lo que la administración conjunta del RT y CQ pudo no dar sinergismo *in vivo* como si lo hizo *in vitro* posiblemente por la dosis utilizada de RT, ya que si las moléculas efectivas en este tuviesen la capacidad de ingresar al parásito por medio del mismo transportador de CQ y este fue saturado por el RT, el efecto de la CQ pudo no verse en su totalidad, por lo cual nos surge la hipótesis de si al combinar la CQ con una dosis menor de RT de la que se utilizó en el ensayo de combinación, podría darse el mismo sinergismo que se observó *in vitro*.

Por último contemplando el metabolismo de los xenobióticos y las interacciones que se pueden dar en esta fase, tenemos que el metabolismo de la CQ implica las enzimas CYP2C8, CYP3A4/5 (Kerb *et al.*, 2009; Guzman y Carmona-Fonseca, 2006), CYP1A2 y la CYP2D6 aunque esta última en un grado menor (Guzman y Carmona-Fonseca, 2006); la CQ es activa en su forma original pero la actividad de su metabolito principal N-desetil cloroquina es mayor (Guzman y Carmona-Fonseca, 2006). El AS, es rápidamente metabolizado para formar dihidroartemisinina por CYP2A6, CYP3A5 (Kerb *et al.*, 2009) y CYP3A4 (Kerb *et al.*, 2009; Guzman y Carmona-Fonseca, 2006); la dihidroartemisinina se inactiva rápidamente a α -dihydroartemisinin- β -glucurónido por las enzimas de fase II UGT1A9 y UGT2B7 (Kerb *et al.*, 2009), la dihidroartemisinina ha demostrado que induce la actividad CYP3A, por lo que la combinación de AS con otros fármacos que sean metabolizados por la última enzima antes mencionada podría resultar en el descenso de la concentración plasmática de dichos fármacos (ej. mefloquina) (Kerb *et al.*, 2009); ya que la combinación RT-AS no demostró antagonismo se puede sospechar que el/los metabolitos activos en el RT no son metabolizados mayormente por esta enzima y del mismo modo el RT parece no alterar significativamente las enzimas implicadas en el metabolismo del AS o de la CQ. Algunos compuestos polifenólicos como flavonoides, curcuminoides, elagitaninos parecen tener la capacidad de alterar la disposición de fármacos mediante la inhibición de la UGT (Roe *et al.*, 2016), como previamente se mencionó, Rodríguez (2015) reporta la presencia de flavonoides en el remedio tradicional de *Curarea Toxicofera* (Wedd.) Barneby & Krukoff, aunque por los resultados obtenidos en el ensayo de combinación RT-AS, se puede presumir que dichos flavonoides no interfirieron de manera relevante con la enzima UGT ya que no se observaron síntomas de toxicidad en los animales, relacionados con la acumulación de dihidroartemisinina en el periodo de administración.

En extractos de Goldenseal (*Hydrastis canadensis*) que son utilizados en dolencias gastrointestinales y en síntomas de resfriado (Junio *et al.*, 2011 citado en Wang Zhu, Munoz, Gurley, y Markowitz, 2015) se han identificado alcaloides como berberina y lahydrastina capaces de inhibir la CYP3A4/5 (Wang, 2015); como antes se describió esta es una enzima implicada en el metabolismo de los dos fármacos evaluados, lo que genera interrogantes sobre si los alcaloides en *Curarea Toxicofera* (Wedd.) Barneby & Krukoff, podrían ejercer una acción similar en esta enzima u en otras implicadas en el mismo metabolismo. Como ya hemos repetido, los resultados no permiten sospechar interacciones que generen anomalías en las concentraciones plasmáticas de los dos fármacos, sin embargo teniendo antecedentes como el de la *Hydrastis canadensis*, se debe profundizar en este aspecto con el fin de tener más argumentos para poder recomendar la combinación de RT junto con CQ o AS.

La complejidad de los sistemas biológicos plantea un desafío para el análisis de la interacción de diversas maneras. Las concentraciones de fármacos en el sitio de efecto no son fácilmente accesibles *in vivo* y requiere de la medición de la respuesta a los mismos relacionados con muestras de sangre para el modelado farmacocinético/farmacodinámico, (Jonker *et al.*, 2005), por lo cual los resultados obtenidos en ausencia de la profundización del proceso farmacocinético y farmacodinámico que sufre las sustancias en el animal íntegro limitan la caracterización real de las interacciones. El mecanismo de las interacciones sinérgicas y aditivas del remedio en combinación con CQ y AS escapa a los alcances de este estudio. La sinergia observada en la combinación *in vitro* del RT-CQ puede deberse a “la unión o a la acción directa en diferentes sitios del parásito” (Gathirwa *et al.*, 2008) o en diferentes etapas del ciclo del parásito.

Los resultados positivos de aditividad en los ensayos *in vivo* de las combinaciones RT-CQ y RT-AS no demostraron que alguno de los tratamientos solos o combinados tuviesen una acción curativa ya que en todos los grupos se observó mortalidad antes de los 15 días post infección, sin embargo la combinación de AS 1,25 mg/kg + RT 200mg/kg aumentó el promedio de supervivencia comparado con el control (vehículo) y con las sustancias solas a las misma dosis, sugiriendo que estos animales resistieron más tiempo debido a la administración de la combinación.

Adicionalmente se menciona que las interacciones entre medicamentos y entre medicamentos y productos naturales pueden ser una combinación de efectos agudos (de inhibición) y de efectos crónicos (de inducción) de enzimas metabólicas y/o transportadores. (Roe *et al.*, 2016), y ya que en los ensayos *in vivo* se planteó una administración corta (4 días) los efectos de la administración a largo plazo no pudieron ser observados.

Por otra parte el reporte de un estudio en el que se investigaron los extractos obtenidos por fraccionamiento fitoquímico de una sola planta (*Polyalthia longifolia* (Sonn)) tuvieron resultados opuestos cuando combinaban por separado los diferentes fracciones con CQ obteniendo desde efectos sinérgicos hasta antagónicos (Gbedema, Bayor, Annan y Wright, 2015). En el caso de esta investigación el RT siendo un extracto acuoso sin ningún fraccionamiento puede tener interacciones en sí mismo debido a la múltiple variedad de moléculas que lo pueden componer, por lo cual sería muy útil estudiar uno por uno los diferentes extractos posibles de la planta frente a la actividad antimalárica y antiplasmodial así como la interacción que ejercen con medicamentos de usos común en la enfermedad.

A pesar de que en nuestra investigación no se realizaron estudios de toxicidad, en el ensayo de DI_{50} para el RT se empleó una dosis alta de 800 mg /kg y en el ensayo de combinación RT-CQ se empleó una dosis aun mayor de 1037,3 mg/kg sin evidencia de signos de toxicidad aguda, lo que da una buena señal en cuanto a la seguridad de este. Sin embargo para completar los requerimientos que se deben cumplir para un uso terapéutico, es necesario implementar estudios de toxicidad y también calcular los índices de selectividad (citotoxicidad/actividad) (Adebayo y Kretti, 2011). Esto sumado a los estudios de farmacocinética y farmacodinamia de las interacciones podría darnos una base sólida para indicar el RT como un potencial extracto contra la malaria y con seguridad de ser administrado en conjunto con CQ y AS. A pesar de que el camino por recorrer para poder recomendar con toda seguridad el uso como antimalárico y el uso en combinación del remedio tradicional de *Curarea Toxicofera* (Wedd.) Barneby & Krukoff con medicamentos de uso común en la enfermedad, los resultados de esta investigación son promisorios y positivos para los anteriores usos mencionados, ya que el RT podría llegar a ser una alternativa para la profilaxis de la enfermedad y para el tratamiento de

episodios leves a un nivel preclínico, con lo cual se podría descongestionar los sistemas de salud convencionales permitiéndoles enfocarse en los casos más graves o complicados de la enfermedad.

5. Conclusiones y recomendaciones

5.1 Conclusiones

La cosmovisión que tienen las comunidades indígenas es una fuente rica de sabiduría, ya que dentro de esta se forman actitudes y costumbres frente a la vida, que pueden ser de utilidad y deber ser conservadas, más que preservadas en sí mismas, con lo cual se da continuidad a una de las prácticas más antiguas de la humanidad como es el uso de recursos naturales para la salud. En el presente estudio se contribuyó a la documentación del modo de empleo y a la validación mediante metodologías de investigación occidental del uso de un remedio tradicional basado en la cocción de la planta *Curarea Toxicofera* (Wedd). Barneby & Krukoff como tratamiento contra la malaria empleado por la comunidad indígena ciudad Hitoma, dando como resultado contundente el potencial antimalárico que tiene la preparación tradicional; Adicionalmente se tuvo la oportunidad de conocer usos y actitudes de la comunidad frente a la enfermedad y otros aspectos de la vida cotidiana, los cuales también se documentaron en el presente trabajo.

Los resultados de las combinaciones *in vitro* fueron positivas ya que el resultado obtenido en el modelo farmacológico de inhibición de la invasión y desarrollo de *P. falciparum* para la cepa FCR-3, reportó sinergismo para la combinación entre el remedio tradicional y cloroquina y aditividad entre el remedio tradicional y artesunato, generando importantes expectativas sobre estas combinaciones.

En los ensayos de combinación *in vivo* con el modelo de malaria murina “*Test de Peters*” cepa *P. berghei* ANKA, la interacción entre el remedio tradicional y artesunato fue aditividad, confirmando el resultado obtenido *in vitro* para dicha combinación, no fue así para la combinación del remedio tradicional y cloroquina, ya que en este modelo el resultado de la interacción fue aditividad a diferencia del resultado *in vitro* de sinergismo.

A pesar de lo anterior los resultados de actividad *in vivo* para las dos combinaciones son una respuesta positiva, haciendo evidente la posible utilidad a largo plazo de esta planta para el tratamiento de la malaria en combinación con los medicamentos cloroquina y artesunato.

5.2 Recomendaciones

Determinar los mecanismos de acción de *Curarea toxicofera* (Wedd). Barneby & Krukoff, y estadios sensibles frente a la infección por *Plasmodium*, lo que podría aportar información conducente a una combinación racional con fármacos.

Desarrollar estudios farmacocinéticos para *Curarea toxicofera* (Wedd). Barneby & Krukoff y para las combinaciones de este con cloroquina y artesunato, con el fin de determinar que absorción, distribución, metabolismo y eliminación tienen estos xenobióticos y que alteraciones en estas fases se dan por la combinación.

Realizar estudios de combinación con otros fármacos de uso común en la enfermedad.

Analizar la influencia que tiene la época de colecta en cuanto a la actividad antiplasmodial y antimalárica de la *Curarea toxicofera* (Wedd). Barneby & Krukoff.

Establecer índices de selectividad para *Curarea toxicofera* (Wedd). Barneby & Krukoff, mediante pruebas de toxicidad aguda y crónica por vía oral, que puedan proveer información sobre la seguridad en cuanto a su uso.

Realizar fraccionamientos bioguiados con el fin de determinar las fases en que se encuentran los metabolitos activos de *Curarea toxicofera* (Wedd). Barneby & Krukoff, con miras a el aislamiento de moléculas con propiedades específicas frente a *Plasmodium*.

A. Anexo 1: Procedimiento operativo estándar para el descongelamiento y mantenimiento de cultivo de *Plasmodium falciparum*

Garavito G. (2003) Estandarización de dos modelos de actividad antimalárica como herramienta para la evaluación farmacológica de sustancias o extractos de origen vegetal. Tesis M.Sc. Universidad Nacional de Colombia Departamento de Farmacia.

Para cultivar y mantener el *Plasmodium falciparum* se deben seguir cuidadosamente los siguientes pasos:

1. Equipos, Materiales y Reactivos

1.1. EQUIPOS

- Agitador Talboys
- Balanza analítica Shimadzu
- Bomba de vacío
- Cabina de flujo laminar de bioseguridad Tipo II
- Centrífuga
- Incubadora
- Microscopio Nikon

1.2. MATERIALES

- Cajas de cultivo estériles de 25 ml
- Tubos para centrífuga estériles de 15 ml y 50 mL
- Gradillas para tubos de 15 mL y 50 mL
- Micropipeta de 100 – 1000 μ L
- Micropipeta de 20 – 100 μ L

- Pipetas aforadas estériles de 2 mL, 5 mL, 10 mL y 25 mL
- Pipetas Pasteur estériles
- Puntas para micropipeta de 10, 200, 1000 μ L en racks
- Frascos de filtración de 500 mL con membrana de 0.22 μ m
- Frasco tipo schott estéril de 500 mL
- 3 Frascos tipo schott estériles de 50 mL
- Frascos para descarte de material
- Crioviales estériles

1.3. REACTIVOS

- Medio RPMI incompleto (RPMI) = Solo RPMI
- Medio RPMI base (bRPMI) = RPMI + bicarbonato
- Medio RPMI completo (cRPMI) = RPMI + bicarbonato + plasma
- Bicarbonato de sodio al 5%
- Sorbitol 5%
- Colorante Giemsa
- Pool de plasma (Según grupo sanguíneo que se requiera)
- Glóbulos rojos (Según grupo sanguíneo que se requiera)
- Hipoclorito de sodio al 5%

2. Preparación de medios de cultivo

2.1. Preparación de medio de cultivo base (bRPMI)

2.1.1. Para un litro de medio de cultivo base debe tomar:

- 2 g de glucosa disuelta en 50 mL de agua destilada
- 5.92 g de Hepes disuelto en 50 mL de agua destilada
- 50 mg de Hipoxantina disuelta en 75 mL de agua destilada CALIENTE
- 1 frasco de RPMI disuelto en 400 mL de agua destilada
- Se completa a 900 mL en probeta (el resto 100 mL corresponderán a plasma)
- Se filtra en frasco de filtración con membrana de 0.22 μ m que viene incluida.

- Realizar prueba de esterilidad colocando 3 mL de medio preparado en tubo de 15 mL.

2.2. Obtención de GR para descongelar el cultivo (GRN)

- 2.2.1. Tomar en tubo tapa azul (citrato) el volumen de sangre que se obtenga por venopunción, de un voluntario sano que no haya consumido ningún tipo de medicamento durante 3 semanas previas a la toma de la muestra; por voluntario debe tomar 4 tubos.
- 2.2.2. Pasar el contenido de los tubos de citrato a tubos de 50 mL con pipeta aforada de 10 mL.
- 2.2.3. Centrifugar 10 minutos a 1500 r.p.m.
- 2.2.4. Marcar el tubo hasta el nivel del sobrenadante.
- 2.2.5. Con pipeta de 10 mL tomar el plasma y procesar según apéndice 2.3.
- 2.2.6. Con pipeta pasteur tomar las células blancas y descartar.
- 2.2.7. Adicionar bRPMI al nivel donde estaba el plasma.
- 2.2.8. Centrifugar 5 minutos a 3000 r.p.m. y descartar sobrenadante.
- 2.2.9. Repetir paso 2.2.7 y 2.2.8.
- 2.2.10. Descartar sobrenadante.
- 2.2.11. Volver a centrifugar para retirar todo el medio de cultivo.
- 2.2.12. Dejar solo los GR empaquetados resuspendidos en iRPMI (RPMI + Bicarbonato) en proporción 1:1.

2.3. Preparación de plasma

- 2.3.1. Solicitar las bolsas (mínimo 2) al Hemocentro Distrital, aclarar que el plasma no venga ni lipémico ni hemolizado.
- 2.3.2. Descongelar las bolsas de plasma a temperatura ambiente o en baño maría a 37 °C.
- 2.3.3. Inactivar por 30 minutos a 56°C en baño de maría.
- 2.3.4. Una vez termine el tiempo, limpie muy bien las bolsas con alcohol al 70%.
- 2.3.5. Asegúrese de que TODO el material a utilizar dentro de la cabina esté LIMPIO Y ESTÉRIL.
- 2.3.6. En un frasco tipo schott estéril de 1000 mL deposite el contenido de las bolsas de plasma, no olvide mezclar muy bien.

- 2.3.7. Separar en alícuotas de 45 mL en falcon estéril.
- 2.3.8. Centrifugar a 13000 rpm por 20 minutos.
- 2.3.9. Una vez centrifugado recupere el sobrenadante, si el sobrenadante presenta una capa grasosa retírela primero antes de pasarla a un tubo falcon estéril.
- 2.3.10. Llevar a congelador -20°C (Stock)
- 2.3.11. Una vez utilice un falcon del congelador de -20°C, manténgalo en refrigeración a 4°C hasta agotarlo.
- 2.3.12. Si no tiene plasma del hemocentro realice el mismo procedimiento con el plasma que obtiene de los pacientes.

2.4. Descongelación del cultivo

- 2.4.1. Revisar en el mapa de congelación, cual vial va a retirar el congelador de -135°C
- 2.4.2. Tomar el criovial del congelador de -135°C y sosténgalo en la mano con el fin de darle temperatura de 37°C por 5 minutos o hasta que se descongele completamente.
- 2.4.3. En cabina de flujo laminar adicionar en el mismo criovial gota a gota 100 µL de **NaCl 12%**, mezclar cada vez que se adicione una gota, siempre sosteniendo el tubo en la mano para mantener la temperatura.
- 2.4.4. Mantener en la mano por 5 minutos en reposo total.
- 2.4.5. Pasar con micropipeta de 1000 el contenido a un tubo de 50 mL
- 2.4.6. Adicionar 5 mL de **NaCl 1.6%** estéril gota a gota, agitando suavemente.
- 2.4.7. Centrifugar a 2600 rpm por 5 minutos y retirar sobrenadante con pipeta pasteur de vidrio.
- 2.4.8. Adicionar 5mL de **iRPMI** y agitar suavemente mientras lo adiciona.
- 2.4.9. Centrifugar a 2600 rpm por 5 minutos y retirar sobrenadante con pipeta pasteur.
- 2.4.10. Resuspender el pellet en 10 mL de medio **cRPMI**
- 2.4.11. Adicionar 300 µL de GRN.
- 2.4.12. Pasar a una caja de cultivo de 25 mL cerrar la caja y llevar a incubadora a 37°C con balance de gases y una vez en la incubadora destapar la caja hasta donde lo permite el tope de la misma.

- 2.4.13. Dejar por dos días sin revisar la parasitemia por medio frotis y coloración por giemsa.

2.5. Revisión de parasitemia del cultivo

- 2.5.1. Transferir la caja de cultivo a cabina de flujo laminar.
- 2.5.2. Agitar suavemente la caja con el fin de desprender los GR que están sedimentados.
- 2.5.3. Destapar la caja y retirar 500 μ L pasándolos a tubos de 1.5mL.
- 2.5.4. Devolver la caja a la incubadora.
- 2.5.5. Tomar el tubo de 1.5mL y llevar a centrifugar por 2 minutos a 2000 rpm
- 2.5.6. Del pellet tomar 5 μ L para realizar el frotis.
- 2.5.7. Realizar coloración Giemsa (apéndice 2.6)
- 2.5.8. Observar estadios y calcular parasitemia.

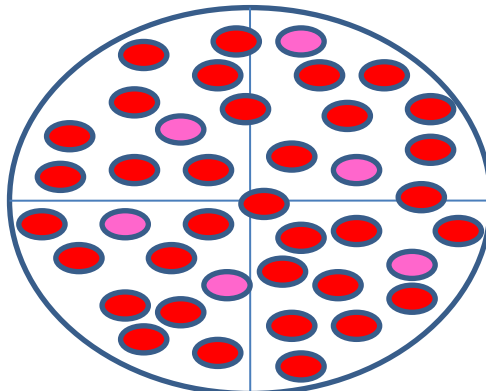
2.6. Coloración de los frotis con Giemsa

- 2.6.1. Fijar el extendido adicionando metanol suficiente para cubrir todo el frotis.
- 2.6.2. Descartar el metanol y dejar que se seque completamente a temperatura ambiente o con secador.
- 2.6.3. Preparar solución de Giemsa 1:9 (1 de colorante por 9 de buffer de Giemsa).
- 2.6.4. Adicionar la solución de Giemsa sobre la placa y dejar por 10 minutos.
- 2.6.5. Lavar con agua potable.
- 2.6.6. Secar.
- 2.6.7. Observar al microscopio con objetivo de inmersión 100X.

2.7. Cálculo del porcentaje de parasitemia

- 2.7.1. Calcular el porcentaje de parasitemia leyendo los campos necesarios.
- 2.7.2. Cada campo debe contener entre 30 y 300 GR que estén dispuestos de manera homogénea y no superpuestos, esto con el fin de obtener un recuento de 1.000 glóbulos rojos totales.
- 2.7.3. Una vez tenga escogido el campo separa el cuatro cuadrantes y en uno de ellos haga el recuento de GR

- 2.7.4. Posteriormente realice el recuento de GR parasitados en todo el campo (4 cuadrantes)



- 2.7.5. % parasitemia = $(GRP / GRN * 4) * 100$
- 2.7.6. Ejemplo, si el campo de la parte superior izquierda fuese su campo los GR rojos son sus GRN y los GR rosados son sus GRP, entonces
- 2.7.7. % parasitemia = $(6 / 9 * 4) * 100 = 16.6\%$
- 2.7.8. No olvide anotar los estadios y el porcentaje de estos con respecto en la muestra

2.8. Cambio y mantenimiento del cultivo

- 2.8.1. Atemperar el medio de cultivo en incubadora a 37°C.
- 2.8.2. Atemperar los GR y el suero colocándolos en la cabina de flujo laminar
- 2.8.3. Transferir cuidadosamente la caja de cultivo a cabina de flujo laminar, con el fin de que no se desprendan los GR sedimentados. si la caja se agita durante este proceso debe dejarse estabilizar unos 30 minutos.
- 2.8.4. Descartar el medio de cultivo de la parte superior con pipeta pasteur.
- 2.8.5. Adicionar medio **cRPMI**, recordando que cada caja debe quedar con 10 mL.
- 2.8.6. Homogenizar y dependiendo de la parasitemia y hematocrito adicionar GRN y/o ampliar el cultivo según apéndice 2.9.
- 2.8.7. Recuerde que el cultivo inicia con 20% de plasma, usted debe llevarlo gradualmente al 10% de plasma (20 – 15 -10% plasma).

2.9. Ampliación de cultivo

- 2.9.1. Atemperar el medio de cultivo colocándolos en incubadora a 37°C.
- 2.9.2. Atemperar los GRN y el plasma, en la cabina de flujo laminar.
- 2.9.3. Tomar la caja de cultivo de la incubadora y colocarla en la cabina de seguridad.
- 2.9.4. Agitar suavemente la caja con el fin de que se levanten los GR que están sedimentados.
- 2.9.5. Con el porcentaje de parasitemia utilice la fórmula $V1 \cdot C1 = V2 \cdot C2$ esto dependiendo la concentración a la cual desee y necesite dejar el cultivo.
- 2.9.6. Tomar la cantidad de cultivo que necesite y adicionar medio de cultivo para completar 10 mL, adicionar GR sanos para que el hematocrito se mantenga, agitar suavemente
- 2.9.7. Llevar a incubadora.

2.10. Sincronización del cultivo

- 2.10.1. Sincronizar con una parasitemia mayor a 4% en estadio de anillos y un pellet cercano de 0.5 mL.
- 2.10.2. Transferir la caja de cultivo a cabina de flujo laminar.
- 2.10.3. Transferir el contenido de la caja aun tubo estéril de 15 mL.
- 2.10.4. Centrifugar a 2600 rpm por 5 minutos y retirar sobrenadante con pipeta.
- 2.10.5. Adicionar 9 partes de sorbitol 5%, homogenizar e incubar a 37°C por 10 minutos.
- 2.10.6. Centrifugar a 2600 rpm por 5 minutos y retirar sobrenadante con pipeta pasteur.
- 2.10.7. Adicionar 5 mL de **bRPMI**, homogenizar
- 2.10.8. Centrifugar a 2600 rpm por 5 minutos y retirar sobrenadante con pipeta.
- 2.10.9. Adicionar medio **cRPMI** suficiente para que el hematocrito quede a 5%.
- 2.10.10. Pasar a una caja de cultivo de 25 mL cerrar la caja y llevar a incubadora a 37°C con y una vez en la incubadora destapar un poco la caja.
- 2.10.11. Revisar a las 48 horas.

2.11. Congelación del cultivo

- 2.11.1. Cuando tenga un cultivo con predominio de anillos y una parasitemia superior al 10%

- 2.11.2. Transferir la caja de cultivo a cabina de flujo laminar.
- 2.11.3. Transferir el contenido de la caja a un tubo estéril de 15 mL
- 2.11.4. Centrifugar a 2600rpm por 5 minutos y retirar sobrenadante con pipeta pasteur.
- 2.11.5. Retirar la capa de GR de color negra.
- 2.11.6. Adicionar solución criopreservante 1:4 (1 de pellet : 4 de criopreservante)
- 2.11.7. Adicionar la solución gota a gota, agitando suavemente
- 2.11.8. Servir de 1000 μ L en tubos de criopreservación estériles
- 2.11.9. Pasar a Nitrógeno líquido o a freezer de -135°C .

Preparación de las soluciones de NaCl 12%

1. Para preparar la solución de **NaCl 12%**: Pesar 12 g de NaCl y disolver en 100 mL de agua destilada.

Preparación de las soluciones de NaCl 1.6%








2. Para preparar la solución de **NaCl 1.6%**: Pesar 1.6 g de NaCl y disolver en 100 ml de agua destilada.

Preparación de la solución de sorbitol al 5%

3. Para preparar la solución de sorbitol al 5%: pesar 5g de sorbitol y diluirlos en 100 mL de agua destilada estéril y filtrar con pirinola de 0.22 μm .

Preparación de la solución criopreservante:

Mezclar 28 ml de glicerol + 3.024 g de sorbitol + 0.65 g de cloruro de sodio + 72 ml de agua destilada y filtrar en pirinola de 0.22 μm .

	Muestra en diferentes concentraciones; pozos para lectura por microscopia
	Muestra en diferentes concentraciones; pozos para lectura por fluorometría
	Control de crecimiento en placa lectura por microscopia
	Control de crecimiento en placa lectura por fluorometría
	GRS: Glóbulos rojos sanos (Blanco fluorometría)
	Borde de agua
	Cloroquina 1 µg/ml (Cárdenas., 2011)

4. Procedimiento

2.1 Preparación de las soluciones de trabajo

Las concentraciones a ensayar se obtienen por dilución seriada las cuales pueden ser preparadas en eppendorf estériles.

- 4.1.1. Marque 3 tubos falcon de 15 mil. (A, B, C)
- 4.1.2. **Tubo A:** Pesar 20mg de extracto y diluir en 1mL de vehículo (RPMI).
(concentración final 20000µg/ml). Filtrar bajo flujo laminar con poro 0.22.
- 4.1.3. **Tubo B.** Adicione 900 µl de RPMI y agregue 100 µl de la solución anterior,
homogenice (2000µg/ml)
- 4.1.4. **Tubo C.** Adicione 1800µl de cRPMI y agregue 200µl de la solución
anterior, homogenice (200 µg/ml).
- 4.1.5. Rotular ocho tubos cónicos de 1.5ml como sigue:
Tubo N° 1: 200µg/ml (Solución madre)
Tubo N° 2: 100µg/ml
Tubo N° 3: 50µg/ml
Tubo N° 4: 25µg/ml
Tubo N° 5: 12,5µg/ml
Tubo N° 6: 6,25µg/ml
Tubo N° 7: 3,125µg/ml
Tubo N°8: 1,56 µg/ml
- 4.1.6. Del tubo C transfiera 1500 µl al **tubo N°1** (solución madre)
- 4.1.7. A cada uno de los tubos desde el **N°2** hasta el **N°8** adicione 750 µl de
cRPMI.

La concentración en placa
queda ajustada a la mitad de lo
rotulado en el tubo.

- 4.1.8. Realizar diluciones seriadas a partir del **tubo N°1**, tomando en cada caso 750 μ l del tubo anterior homogenizando con el cRPMI agregado anteriormente. (cambie de punta cada vez que sirva).

4.2. Siembra de la placa para evaluación de extractos vegetales

- 4.2.1. Colocar 100 μ l de cada una de las diluciones en todos los pozos de las letras B a G del número 2 al 9 según distribución en placa.
- 4.2.2. Colocar 100 μ l de la suspensión de glóbulos rojos parasitados ajustada al 2% (**apéndice 6**), en todos los pozos de las letras B a G del número 2 al 9.
- 4.2.3. Colocar 100 μ l de RPMI + 100 μ l de la suspensión de glóbulos rojos parasitados (**apéndice 6**), en todos los pozos de la columna 10 como control de crecimiento.
- 4.2.4. Colocar 100 μ l de cRPMI + 100 μ l de CQ (Solución C - Apéndice 3), en los pozos B11, C11 Y D11 como control positivo.
- 4.2.5. Adicionar 200 μ l de glóbulos rojos sanos con hematocrito al 2% en los pozos E11, F11 y G11.
- 4.2.6. Homogenizar toda la placa por agitación durante 60seg.
- 4.2.7. Tapar las placas, llevar a incubadora con balance de gases N₂, O₂ y CO₂
- 4.2.8. Incubar a 37°C por 48 horas.

5. Preparación de Patrón (Cloroquina)

- 5.1. Solución inicial: Preparar en agua destilada una solución 1 mg/mL (Pesar 10 mg y disolver en 10 mL), Solución A (1000 μ g/mL)
- 5.2. En cabina de flujo realizar las siguientes diluciones:
 - 5.2.1. Tomar 100 μ L de solución A y disolver en 900 μ L de cRPMI (Solución B) (100 μ g/mL)
 - 5.2.2. Tomar 10 μ L de solución B y disolver en 990 μ L de cRPMI (Solución C). (1 μ g/mL)
 - 5.2.3. Transfiera 100 μ l de la solución C, a la placa de 96 pozos según corresponda.

6. Determinación de la densidad parasitaria

6.1. Microscopia

- 6.1.1. Retirar cuidadosamente de uno de los pozos control de crecimiento (B10 a G10) el medio sobrenadante.
- 6.1.2. Realizar el frotis del pellet, evaluar la parasitemia y los estadios del cultivo
- 6.1.3. Verificar que el cultivo se encuentra en estadios jóvenes y la parasitemia es considerablemente superior a la inicial.
- 6.1.4. Realizar los frotis de los pozos destinados a determinación por microscopia.
- 6.1.5. Fijar el frotis con metanol
- 6.1.6. Realizar coloración de Giemsa

6.2. Determinación por fluorometría

- 6.2.1. Centrifugar la placa de 96 pozos a 2000rpm x 5min
- 6.2.2. Descartar el sobrenadante y re suspender el pellet en 150µl de PBS 1X
- 6.2.3. Repita pasos 4.4.1 y 4.4.2
- 6.2.4. Transferir 100µl de cada pozo a una placa de 96 pozos negra.
- 6.2.5. Agregar 100µl de SYBR 2X en buffer de lisis, mezclar para garantizar hemolisis completa.
- 6.2.6. Incubar a temperatura ambiente por 2 horas en la oscuridad
- 6.2.7. Leer en el fluorómetro (Excitación 485nm y emisión 538nm)

7. Cálculo de parasitemia

7.1. Calculo de la parasitemia por microscopia

- 7.1.1. Realizar conteo de glóbulos rojos parasitados y no parasitados por el método visual (1000 glóbulos rojos totales)

7.1.2. Realizar cálculo de parasitemia y porcentaje de inhibición de acuerdo a las ecuaciones

$$\% \text{ Parasitemia} = (\text{Glóbulos rojos parasitados} / \text{glóbulos rojos totales}) * 100$$

7.1.3. Cálculo del porcentaje de inhibición

$$\% \text{ de Inhibición} = ((\text{parasitemia de blanco} - \text{Parasitemia de muestra}) / \text{parasitemia de blanco}) * 100$$

8. Ajuste de hematocrito y parasitemia para montaje en placa

8.1. Tome una muestra de la caja de cultivo a emplear y realice determinación de parasitemia por conteo microscópico.

8.2. En la orden de trabajo anexa a este protocolo (Hoja de Excel), digite en la celda G45 el valor determinado

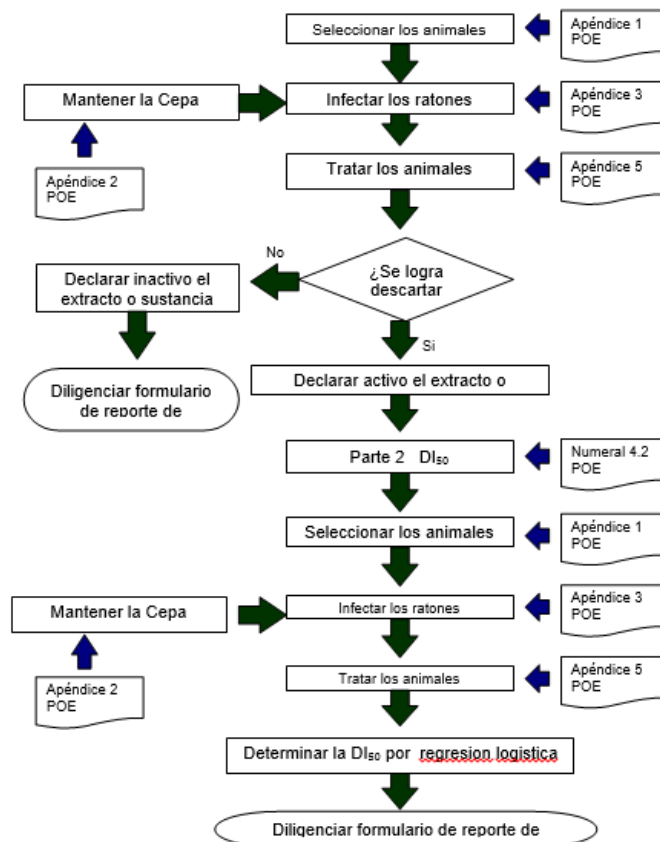
8.3. La hoja de cálculo arroja la cantidad en μl de GRP a emplear (Celda G49) y la cantidad de GRS a emplear (G50).

Prepare lo anterior en cRPMI según corresponda (Celda D50), para lo cual el hematocrito en placa quedará ajustado al 2,5%.

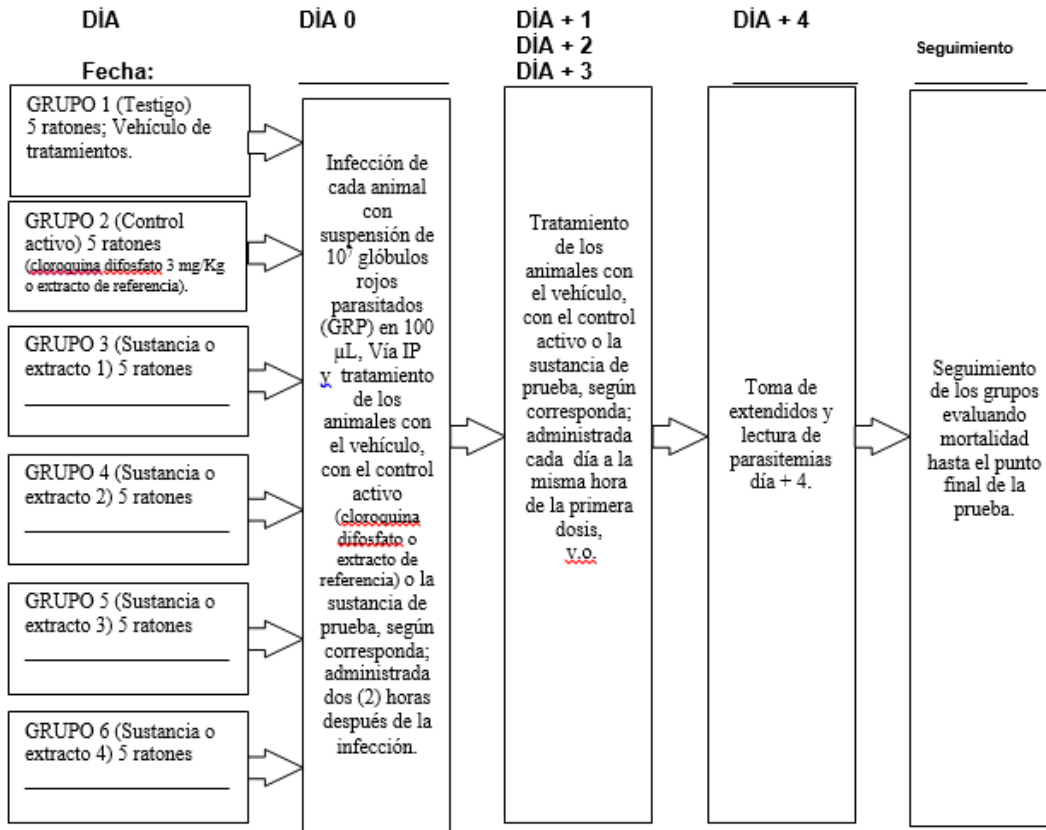
C. Anexo 3: Procedimiento operativo estándar para el desarrollo de la prueba supresiva de 4 días (Test de Peters) de actividad antimalárica

GARAVITO G. (2003) Estandarización de dos modelos de actividad antimalárica como herramientas para la evaluación farmacológica de sustancias o extractos de origen vegetal. Tesis de M.Sc., Universidad Nacional de Colombia, Departamento de Farmacia

DIAGRAMA DE FLUJO



El ensayo estándar, de acuerdo con la capacidad instalada, comprende la evaluación de cuatro sustancias o extractos, un grupo testigo con el vehículo de las sustancias y un grupo control tratado con cloroquina difosfato según el siguiente diseño 1.



- Los tratamientos son asignados al azar a cada grupo de 5 ratones
- Los ratones son mantenidos en cajas (5 animales por caja) (Apéndice 1) y permanecen durante la prueba con agua y alimento *ad libitum*.

1.0 Selección de los animales

El día de la infección se seleccionan 30 ratones del mismo género sanos tipo ICR de cuatro semanas de edad, con peso 20±2 g y se asignan por peso a seis grupos.

Se asignan al azar los tratamientos a cada uno de los grupos de animales seleccionados según lo establecido en el Apéndice 1.

Colocar los animales en 6 jaulas, completamente identificadas, con alimento y agua *ad libitum*.

FECHA: _____ No. ANIMALES SELECCIONADOS: _____ DÍA NACIMIENTO:

Coloque Las etiquetas de las cajas de origen de los animales:

2.0 Infección de los ratones

2.1 Preparación del inoculo

La cepa es mantenida mediante repiques sucesivos en ratones, El DÍA - 4 (4 días previo a la prueba) debe realizarse el último repique con la cepa de *Plasmodium berghei*, de manera que el DÍA 0, de inicio del ensayo, presente una parasitemia aproximadamente del 50 % (ver Apéndice 2)

FECHA DE ÚLTIMA INFECCIÓN: _____ CÓDIGO LOTE SEMILLA:

2.2 Cálculo para preparar la suspensión de Glóbulos Rojos Parasitados (GRP) para infectar los ratones.

Evalúe la parasitemia de los ratones donadores infectados mediante extendido y coloración (Apéndice 3), de manera que se obtenga el porcentaje de parasitemia.

Con el porcentaje de parasitemia obtenido, seleccione el ratón donador y la cantidad de sangre a tomar de este lo mismo que las diluciones necesarias, diligencie el formato del Apéndice 4. ESTOS CÁLCULOS SE ENCUENTRAN PROGRAMADOS EN LA ORDEN DE TRABAJO; HOJA DE MICROSOFT EXCEL® ANEXA A ESTE PROCEDIMIENTO.

2.3 Inoculación de los animales

Con la suspensión de GRP preparada en 2.2, proceda a infectar los ratones mediante la inoculación por vía intraperitoneal (IP) de 100 μ L de la suspensión a cada animal. Tanto la inoculación como el tratamiento administrado a los animales debe ser realizado por personal previamente entrenado en estos procedimientos.

3.0 Tratamiento de los Animales

3.1 Cálculo para preparar la dosis de administración de las sustancias o extractos para el tratamiento de los ratones infectados.

Se deben preparar soluciones o suspensiones que vehiculicen las sustancias o extractos a evaluar, el cálculo debe permitir obtener la cantidad suficiente para la administración de 100 μ L cada día durante un periodo de cuatro días. Ver Apéndice 5. ESTOS CÁLCULOS SE ENCUENTRAN PROGRAMADOS EN LA ORDEN DE TRABAJO; HOJA DE MICROSOFT EXCEL[®] ANEXA A ESTE PROCEDIMIENTO.

3.2 Administración del tratamiento

Dos horas después de la infección administre la primera dosis del tratamiento preparado en 3.1 por vía oral (p.o.)

Administre durante tres días más la dosis del tratamiento a cada animal a la misma hora de la primera dosis.

4.0 Evaluación de la prueba

4.1 Determinación del Porcentaje de Inhibición

El DÍA + 4, de desarrollo de la prueba se procede a la toma de extendidos de sangre, de cada uno de los ratones y coloración (ver Apéndice 3) para su posterior conteo óptico y

obtención del porcentaje de inhibición, para cada sustancia o extracto, de acuerdo con la siguiente formula:

$$\% \text{ inhibición} = \frac{\text{Parasitemia Grupo Testigo (vehículo)} - \text{Parasitemia Grupo Control Activo}}{\text{Parasitemia Grupo Testigo (vehículo)}}$$

4.2 Punto final de la prueba y Evaluación de posible efecto curativo.

El punto final de la prueba establece el momento de eutanasia, que se relaciona con la inhabilidad del animal para proveer más información dentro del estudio y con el fin de prevenir un mayor sufrimiento. Se hace observación, dos veces al día de los animales, posterior al DÍA + 4, estableciendo un balance, costo ético – beneficio para la prueba (entre síntomas de sufrimiento y el posible efecto curativo). Se programa inmediatamente la eutanasia de los ejemplares cuando estos evidencien síntomas indicativos de afección del SNC o cuando exista un marcado e irreversible deterioro del animal.

En ausencia de las condiciones anteriores se prosigue con el mantenimiento de los animales evaluando la supervivencia, considerando para aquellos animales que sobrevivan más de 35 días (con evaluaciones posteriores de parasitemia cada 7 días) hacer sangrado e infección de nuevos ratones con esa sangre; si los nuevos animales no desarrollan la enfermedad dentro de 21 días se considera un efecto curativo.

4.3 Riesgo Biológico

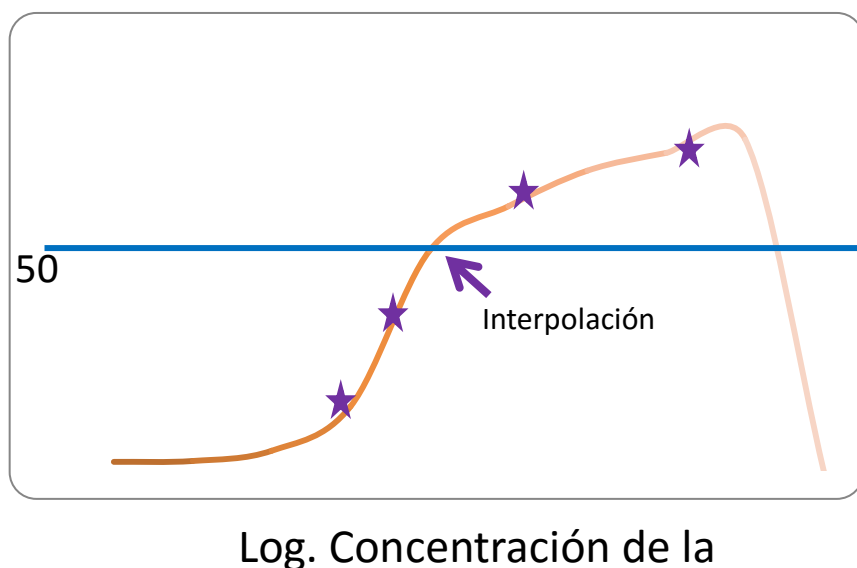
Se tendrán en cuenta las recomendaciones internacionales acerca del uso ético de animales así como lo establecido en la Resolución 008430 de 1993 del Ministerio de Salud, capítulo sexto, la cual hace referencia al uso de animales vivos en experimentos de investigación en Colombia y así como también el estatuto nacional de protección de los animales (ley 84 de 1989). De igual forma, se seguirán las normas establecidas por el Bioterio de Farmacia de la Universidad Nacional de Colombia en cuanto al manejo y disposición de material biológico. Los protocolos experimentales empleados en este proyecto cuentan con el aval del comité de ética de la Facultad de Ciencias. Se busca causar el mínimo sufrimiento posible a los animales teniendo en cuenta un punto final adecuado para los fines experimentales evitando al máximo el malestar generado

inevitablemente por la infección así mismo se busca utilizar el menor número de animales por grupo de tratamiento.

4.4 Determinación de la DI_{50}

Esta determinación se hace solo para aquellos extractos o sustancias que presentan un porcentaje de inhibición de la parasitemia superior al 50 % (a una dosis de extractos crudos = 400 mg/Kg., fracciones = 100 mg/Kg) en el ensayo de evaluación inicial y por lo tanto requiere el desarrollo del protocolo señalado como diseño 1

La DI_{50} de una sustancia o extracto se determina a través de un modelo de regresión logística dosis-respuesta.



4.2.1 Parámetros de calidad de la Interpolación

Para la obtención de la DI_{50} de cada extracto o sustancia se deben obtener mínimo cuatro (4) puntos (ubicados entre el 20 y el 80 % de la respuesta) cada uno de los cuales representa el promedio de la respuesta del grupo tratado a una dosis dada.

5.0 Equipos, Materiales y Reactivos

5.1 EQUIPOS

1. Balanza electrónica Shimadzu BP 221S
2. Microscopio Olympus CH2

5.2 MATERIALES

1. Jaulas de mantenimiento de los animales
2. Jeringas de 1 mL y 5 mL
3. Láminas para microscopio
4. Placa de icopor recubierto de papel aluminio
5. Cámara de anestesia
6. Guantes desechables
7. Algodón
8. Tubos de vidrio
9. Tubos de congelación

5.3 REACTIVOS

1. Cloroquina difosfato Boehringer Mannheim GmbH
2. Glóbulos Rojos Parasitados (Lote Semilla)
3. Agua destilada
4. Dimetil sulfoxido DMSO 99.5 % Sigma
5. Metanol p.a. Merck
6. Solución Salina Normal SSN.
7. Solución madre colorante Giemsa
8. Aceite de inmersión Albor

9. Heparina sódica 25000 U / 5 mL o 5000 U / 5 mL
10. Éter o Cloroformo Merck
11. Alcohol desinfectante

6.0 Bibliografía

1. E. Deharo, Ph Gutret, V. Muñoz y M. Sauvain, "TÉCNICAS DE LABORATORIO PARA LA SELECCIÓN DE SUSTANCIAS ANTIMALÁRICAS", Primera Edición, La Paz Bolivia, Junio 2.000 ISBN 99905-0-050-9.
2. Oto Zak & Merle A. Sande, "animal models of infection", Academic Press, 1999.
3. Close, Banister. recomendaciones para la eutanasia de los animales de experimentación, 1986
4. Concepts in animal welfare, euthanasia module 20, WSPA and Bristol University 2003
5. David Morton, Humane endpoint in animal experimentation for biomedical research. Laboratorio animals limited. Birmingham.UK
6. Ley 84 de 1989. Por la cual se adopta el estatuto nacional de protección de los animales y se crean unas contravenciones y se regula lo referente a su procedimiento y competencia. Capítulo IV. el congreso de Colombia. Bogotá. . 27 diciembre 1989
7. Resolución N° 008430 de 1993. Título V: LA INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA CON ANIMALES. Artículo 87. 4 de octubre de 1993 Colombia
8. UNESCO, Declaración Universal de los Derechos de los Animales. 1978

D. Anexo 4 : Plegable socialización de resultados previos con la comunidad

Estudios farmacológicos

Se realizaron ensayos para estudiar la capacidad de los remedios de inhibir (*in vitro*) la invasión y el desarrollo del parásito (*Plasmodium falciparum*) dentro de los eritrocitos; también se realizaron ensayos donde se utilizaron ratones de laboratorio infectados, que fueron tratados con los remedios.

Planta a partir de la que se preparo el remedio.	Ensayo <i>in vitro</i> frente a <i>Plasmodium falciparum</i> C ₅₀ (µg/ml).	Ensayo <i>in vivo</i> frente a <i>Plasmodium</i> de ratones % de la inhibición de la parasitemia
Costillo	>50 (poco activo)	1% (poco activo)
Bejuco de Llaño	3,02 +/-1 (Activo)	88% (Activo)
Aiño	36,95 +/-5 (Poco activo)	3% (poco activo)
Cloroquina (control)	0,04 +/- 0,006	93%

CONCLUSIÓN

La información suministrada corresponde al conocimiento de la familia de *Hitoma Saffama*, quienes muestran prevención de trabajar en proyectos de investigación

"muchos llegan y se van y nosotros nunca nos enteramos de que pasó, si sirvió o no, y muchos han logrado cosas y a nosotros no nos cuentan".

La familia posee conocimientos del concepto de salud y de la malaria.

Los anteriores resultados permiten proponer la planta Bejuco de Llaño como activa bajo las condiciones de ensayo estudiadas.

AGRADECIMIENTOS

El grupo de investigación FaMeTra agradece a la comunidad Ciudad Hitoma, al abuelo José y a la abuela Rosa, por la confianza depositada y las enseñanzas tan valiosas. Por lo anterior presentamos esta información con el fin de retornar a la comunidad los resultados encontrados en el trabajo realizado.

Agradecemos al profesor Pablo A. Palacios de la Sede Leticia de la Universidad Nacional de Colombia por el apoyo local a este proyecto.

También queremos agradecer a la Dirección de Investigación sede Bogotá de la Universidad Nacional de Colombia, que financió el desarrollo de este trabajo.

Bibliografía Universidad Nacional de Colombia Tesis Maestría en Ciencias Farmacéuticas "Evaluación de la actividad antimalárica de preparaciones tradicionales obtenidas de dos especies promisorias usadas por una comunidad en zona endémica y profundización en el estudio de su actividad farmacológica" Paola Andrea Cardenas Cuadros.

EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMALÁRICA DE PREPARACIONES TRADICIONALES USADAS POR UNA COMUNIDAD EN ZONAS ENDÉMICAS Y PROFUNDIZACIÓN EN EL ESTUDIO DE SU ACTIVIDAD FARMACOLÓGICA. GRUPO DE INVESTIGACIÓN FARMACOLOGÍA DE LA MEDICINA TRADICIONAL Y POPULAR FAMETRA

GIOVANNY GARAVITO GARDENAS



La malaria es una infección causada por un parásito del género *Plasmodium spp.* y transmitida de humano a humano por la picadura de la hembra del mosquito *Anopheles* infectado.



SÍNTOMAS:

Son escalofríos, fiebre, sudoración, dolor de cabeza, vómito, dolor muscular, entre otros y se presentan cada 48 a 72 horas. Los primeros síntomas aparecen de 10 días a 4 semanas después de la picadura.

OBJETIVO DE LA INVESTIGACIÓN:

Estudiar la actividad antimalárica de tres remedios tradicionales, a base de las plantas, empleados por la comunidad.



PROCEDIMIENTO Y RESULTADOS:

La comunidad

La comunidad fue contactada por intermedio del profesor Pablo Palacios de la Sede de Leticia de la Universidad Nacional de Colombia, se les explicó el proyecto y se obtuvo consentimiento informado por parte del médico tradicional quien preparó los remedios que posteriormente fueron congelados y transportados a Bogotá para su estudio. El abuelo José Octavio García o *Hitoma Saffama* (Luz del Sol) es el médico tradicional de la comunidad y cacique en lo que se refiere a rituales, creencias y tradiciones de su cultura.



Concepto de salud y conocimiento de la enfermedad

El concepto de salud es muy importante para la familia "nosotros comemos mucho ají, por eso tenemos sangre caliente que hace que no enfermemos", para ellos la enfermedad es consecuencia de la falta de buena alimentación o debilidad espiritual. La familia conoce la malaria "es cuando pica el mosquito", identifican al vector de transmisión "es el que se para derecho y tiene las puntas de las patitas y de las alas blancas"; la enfermedad la describen como "es un calor que da como aquí (en el pecho), como en el estomago, es muy caliente, hace sudar frío y seco, el sudor pasa y la piel

queda seca, se siente mucho frío, la persona se mueve continuamente y de forma desesperada, la persona se vuelve amarilla, y la cabeza pesa, no come." Diferencian distintas clases de "calentura", unas pueden ser causadas por querer hacer mal "algún espíritu que quiere hacer daño", pero la de la malaria es diferente "es más caliente, en las noches es más y no es seguida, es intermitente".

Tratamiento de la enfermedad:

La familia reporta no usar ningún tipo de "medicinas de blancos" porque "son venenos que nos matan", comentan tener su propia farmacia "la selva", su aproximación terapéutica es dual, remedios y oración "esa es nuestra diferencia con los blancos, nosotros tratamos el bichito con los remedios, pero también espiritual que es lo más importante, toca fortalecer el espíritu". Los remedios son amargos "cuando el agua es amarga es mejor, mientras más amargo mejor", se preparan generalmente en decocciones lo cual concentra el remedio "la sal de la planta" que logran obtener a través de la oración que acompaña el proceso desde la colecta de las plantas.

La dosis de remedio de cada paciente depende de cuánto lleva con la enfermedad, el tratamiento se da al final de la tarde "cuando el mosquito pica" y en las mañanas, en pacientes con mucho tiempo con la enfermedad el tratamiento puede ser cada tres o cuatro horas.

Los remedios estudiados fueron preparados a partir de tres plantas, el costillo (corteza), el aiño (raíz) y el bejuco de llaño.

E. Anexo 5: Consentimiento informado previo

L



Consentimiento fundamentado previo

Título del proyecto:

Actividad antimalárica de un remedio tradicional usado por una comunidad en zona endémica, profundización en interacciones consecuencia de su empleo en combinación con medicamentos para tratar la enfermedad.

Lo invitamos a participar como informante voluntario en el proyecto de investigación realizado por el Departamento de Farmacia de la Universidad Nacional de Colombia.

El objetivo general de esta investigación es obtener información sobre la preparación de los remedios tradicionales obtenidas de dos plantas usadas para el tratamiento de la malaria, con el fin de valorar experimentalmente el efecto de su uso combinado con medicamentos de uso común en la enfermedad y determinar las ventajas o desventajas que dichas combinaciones conllevan.

Su participación será voluntaria, comunicándonos la información sobre los remedios y las plantas utilizadas en la enfermedad

La información que le solicitemos incluirá indicarnos que parte de la planta utiliza, los métodos de preparación y forma de uso. La entrevista y preparación de los remedios podrá ser grabada si está de acuerdo con ello, el material audiovisual será empleado internamente y únicamente por los investigadores.

Usted presenció las explicaciones completas de los derechos de consulta previa y consentimiento libre previo e informado; basados en documentos públicos sobre consulta previa del Ministerio del Interior y de Justicia y de la cartilla "tejiendo derechos" de la Organización Nacional Indígena de Colombia – ONIC, en los cuales queda descrita la posición que tiene nuestro grupo de investigación, también fue precisa la explicación sobre la participación justa y equitativa de los beneficios que se deriven de la información obtenida dentro del proyecto siguiendo el Protocolo de Nagoya sobre Acceso y Participación en los Beneficios. descrita la posición que tiene nuestro grupo de investigación.

1

UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA SEDE BOGOTÁ, FACULTAD DE CIENCIAS, DEPARTAMENTO DE FARMACIAGRUPO DE INVESTIGACIÓN FAMETRA 2/3

También se le explicó a profundidad el objetivo del estudio, los integrantes del grupo de investigación, la metodología y los aspectos sociales, ambientales, culturales y económicos que el proyecto promueve en la comunidad.

Usted decidirá voluntariamente participar en esta investigación. En la publicación o presentación de resultados de investigación su identidad se mantendrá confidencial, esto significa que su nombre, dirección, fecha de nacimiento u otra información que lo pueda identificar no será dada a nadie sin su autorización.

Informante.

HE LEÍDO Y/O ESCUCHADO LO DESCRITO EN LAS PRESENTACIONES Y EN EL PRESENTE DOCUMENTO Y HE TENIDO LA OPORTUNIDAD DE HACER LAS PREGUNTAS PERTINENTES.

Al firmar este documento, acepto participar voluntariamente en la investigación en los términos estipulados.

Nombre de la comunidad: Ciudad Hitoma Km. 7

Nombre del líder o representante: José Otavio Pareja (Hitoma)

Firma 

CC 4963489

Hemos informado de buena voluntad todos los aspectos científicos, éticos y legales vigentes relacionados con la investigación en la siguiente fecha:

Día 30 Mes Agosto Año 2013



Yinneth Victoria Rodríguez N.
C.C. 53.167.559
Estudiante Maestría Ciencias - Farmacología



Giovanny Garavito C.
C.C. 19.420.648
Profesor Asociado
Investigador Principal

F. Anexo 6: Fragmento de la respuesta ante el radicado de consulta previa frente al Ministerio del Interior



suscribieron el documento denominado: "**Consentimiento Fundamentado Previo**", de fecha 30 de agosto de 2013, por parte de José Octavio García, identificado con la Cédula de Ciudadanía No. 4.963.489, en su calidad de Representante y Líder de la comunidad: Ciudad Hitoma (Huitoto) del kilómetro 7, en donde se afirma que:

"He leído y/o escuchado lo descrito en las presentaciones y en el presente documento y he tenido la oportunidad de hacer las preguntas pertinentes", para la realización del proyecto: "ACTIVIDAD ANTIMALÁRICA DE UN REMEDIO TRADICIONAL USADO POR UNA COMUNIDAD EN ZONA ENDÉMICA, PROFUNDIZACIÓN EN INTERACCIONES CONSECUENCIA DE SU EMPLEO EN COMBINACIÓN CON MEDICAMENTOS PARA TRATAR LA ENFERMEDAD".

Por lo anterior, tratándose de un proyecto de investigación, de carácter científico, que busca realizar una actividad antimalárica de un remedio tradicional usado por una comunidad en zona endémica, profundización en interacciones consecuencia de su empleo en combinación con medicamentos para tratar la enfermedad, entendemos que en la ejecución de dichas actividades no existirán afectaciones, entendiéndose por éstas la intromisión que genera un menoscabo al entorno cultural de las comunidades étnicas, a la integridad de su territorio, a la afectación negativa de sus proyectos de vida o de sus actividades como comunidad y a los hechos que atenten contra su existencia.

Consecuentemente con lo expuesto y teniendo en cuenta los conceptos legales y jurisprudenciales sobre el tema de consulta previa y afectación, esta Dirección considera que para el proyecto "**ACTIVIDAD ANTIMALÁRICA DE UN REMEDIO TRADICIONAL USADO POR UNA COMUNIDAD EN ZONA ENDÉMICA, PROFUNDIZACIÓN EN INTERACCIONES CONSECUENCIA DE SU EMPLEO EN COMBINACIÓN CON MEDICAMENTOS PARA TRATAR LA ENFERMEDAD**", identificado con las coordenadas antes mencionadas, no es necesario adelantar proceso de certificación y por consiguiente tampoco requiere de la consulta previa, teniendo en cuenta que este proyecto responde a una actividad científica, en el cual no hay una afectación directa a sujetos colectivos, susceptibles de derechos constitucionalmente protegidos, entendida dicha afectación directa como una intromisión intolerable a su calidad de vida y costumbres.

Cordialmente,


ÁLVARO ECHEVERRY LONDOÑO
Director Consulta Previa

Elaboró: Andrés Montoya
Revisión: Luis Fernando Bora

TRD_2500_03_03
EXTMIG-0047659

Sede: correspondencia Edificio Camargo Calle 12B No. 8-38
Computador: 2427400 - Sitio web: www.mininterior.gov.co
Servicio al Ciudadano: servicioalciudadano@mininterior.gov.co - Línea gratuita 018000910403
Bogotá, D.C. - Colombia - Sur América

G. Anexo 7: Clasificación taxonómica


UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA
SEDE BOGOTÁ
FACULTAD DE CIENCIAS
INSTITUTO DE CIENCIAS NATURALES
HERBARIO NACIONAL COLOMBIANO (COL)

COL - 221
Bogotá D.C., 16 de octubre de 2013

Señores
Giovanny Garavito
Ciudad

Asunto: Identificación Taxonómica muestras

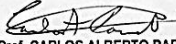
Cordial Saludo,

Me permito dar respuesta a su solicitud referente a la identificación taxonómica de la(s) muestra(s) botánica(s):

Nombre	FAMILIA	No. COL	Colector	No de Colecta	Determinó
<i>Ambelania cf. duckei</i> Markgr.	APOCYNACEAE	570483	Victoria Rodríguez & José García	1	A. Jara/2013
<i>Abuta grandifolia</i> (Mart.) Sandwith	MENISPERMACEAE	570484	Victoria Rodríguez & José García	3	A. Jara/2013
<i>Abuta grandifolia</i> (Mart.) Sandwith	MENISPERMACEAE	570485	Victoria Rodríguez & José García	4	A. Jara/2013
<i>Curaterea toxicifera</i> (Wedd.) Barneby & Krukoff	MENISPERMACEAE	570486	Victoria Rodríguez & José García	2	A. Jara/2013

Esta certificación no es válida para trámites ante el INVIMA o el ICA. El (Los) pliego(s) testigo(s) quedará(n) como muestra permanente en nuestro herbario.

Cordialmente,


Prof. CARLOS ALBERTO PARRA
Administrador General
Herbario Nacional Colombiano -COL
E-mail: herbacol_fcbog@unal.edu.co

Copa Achua COL
Thomson Páez

ciencia, tecnología e innovación para el país

Carrera 30 No. 45-03, INSTITUTO DE CIENCIAS NATURALES,
"HERBARIO NACIONAL COLOMBIANO (COL)" Edificio 425- 2º piso, Oficina 222
Commutador: (57-1) 316 5000 Ext. 11538 - 11518 Fax: 11538
Correo electrónico: herbacol_fcbog@unal.edu.co
Bogotá, Colombia, Sur América

Bibliografía

- Adebayo, J. O. y Kretti, A. U. (2011). Potential antimalarials from Nigerian plants: A review. *Journal of Ethnopharmacology*, 133(2), 289-302. doi: 10.1016/j.jep.2010.11.024.
- Adebolagun, O. M., Emikpe, B. O., Woranola, I. O. y Ogunremi, Y. (2014). Synergistic effect of aqueous extract of *Telfaria occidentalis* on the biological activities of artesunate in *Plasmodium berghei* infected mice. *African Health Sciences*, 14(1), 111 – 118.
- Alto Comisionado de las Naciones Unidas para los Refugiados ACNUR. (2011). *Comunidades Indígenas en Colombia*. Consultado el 15 de enero de 2011. Recuperado de <http://www.acnur.org/t3/>
- Aminake, M.N y Pradel, G. (2013). Antimalarial drugs resistance in *Plasmodium falciparum* and the current strategies to overcome them. En Méndez-Villas A (Ed.), *Microbial pathogens and strategies for combating them: science, technology and education vol1*. (269 – 282). España: Formatex Research Center.
- Arias, M. (2015). Estandarización de un método fluorométrico para la determinación de la densidad parasitaria por *plasmodium* en modelos farmacológicos de malaria *in vivo* e *in vitro* (tesis de maestría). Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, Colombia.
- Arnou, B., Montigny, C., Morth, J. P., Nissen, P., Jaxel, C., Moller, J. V. y Maire, M. (2011). The *Plasmodium falciparum* Ca(2+)-ATPase PfATP6: insensitive to artemisinin, but a potential drug target. *Biochemical Society Transactions*, 39(3), 823-831. doi: 10.1042/BST0390823.
- Autino, B., Corbett, Y., Castelli, F. y Taramelli, D. (2012). Pathogenesis of Malaria in Tissues and Blood. *Mediterranean Journal of Hematology and Infectious Diseases*, 4(1), doi: 10.4084/MJHID.2012.061
- Bisset NG. (1992). War and hunting poisons of the New World. Part 1. Notes on the early history of curare. *Journal Ethnopharmacology*, 36, 1-26.
- Blair, S., Lacharme, L., Carmona, J. y Tobón, A. (2001). Resistencia de *Plasmodium falciparum* a tres fármacos antimaláricos en Turbo (Antioquia, Colombia), 1998. *Revista Panamericana de Salud Pública*, 9(1), 23-29.

- Bourdy, G., Willcox, M.L., Ginsburg, H., Rasoanaivo, Ph., Graz, B, y Deharo, E. (2007). Ethnopharmacology and malaria: New hypothetical leads or old efficient antimalarials? *International Journal for Parasitology*, 38(1), 33 – 41.
- Cárdenas, P. (2011). *Evaluación de la actividad antimalárica de preparaciones tradicionales obtenidas de dos especies promisorias usadas por una comunidad en zona endémica y profundización en el estudio de su actividad farmacológica* (tesis de maestría). Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, Colombia.
- Chenniappan, K y Kadarkarai, M. (2010). In vitro antimalarial activity of traditionally used Western Ghats plants from India and their interactions with chloroquine against Chloroquine-resistant *Plasmodium falciparum*. *Parasitology Research* 107, 1351–1364. doi 10.1007/s00436-010-2005-9
- Chinwe, U., Obinna, E., Ebele, E. y Chukwuemeka, U. (2010). Antimalarial activity of *Ageratum conyzoides* in combination with chloroquine and artesunate. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, 3(12), 943 – 47. doi:10.1016/S1995-7645(11)60005-9
- Co, E. M., Denuff, R. A., Reinbold, D. D., Waters, N. C. y Johnson, J. D. (2009). Assessment of Malaria In Vitro Drug Combination Screening and Mixed-Strain Infections Using the Malaria Sybr Green I-Based Fluorescence Assay. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 53(6), 2557 -63. doi: 10.1128/AAC.01370-08.
- Cruz Roja Española. (2009). Malaria el reto de los Pobres. Documento para medios de comunicación Abril de 2009. Consultado 7 junio 2013. Recuperado de http://reliefweb.int/sites/reliefweb.int/files/resources/872BB00908C173E4C125759F0033CB78-Informe_completo.pdf.
- de Andrade-Neto, V. F., Pohlit, A. M., Pinto, A. C., Silva, E. C., Nogueira, K. L., Melo, M. R., ... Vieira, P. P. (2007). In vitro inhibition of *Plasmodium falciparum* by substances isolated from Amazonian antimalarial plants. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 102(3), 359 – 65.
- de la Hoz, F. (2013). 25 de abril día mundial contra la malaria. Consultado el 8 junio 2013. Recuperado de <http://www.ins.gov.co/Noticias/Paginas/25-de-Abril-Dia-mundial-de-la-malaria.aspx#.UeAccG0biWI>.
- de Pilla, F., Botelho, A. C., Assunção, A., de Paula, R., Fagundes, E., Valverde, A., ... Ursine, A. (2008). Synthesis, Antimalarial Activity, and Intracellular Targets of MEFAS, a New Hybrid Compound Derived from Mefloquine and Artesunate. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 52(11), 3868 – 3874. doi: 10.1128/AAC.00510-08

- Deharo, E., Gautret, P., Muñoz, V. y Sauvain, M. (2000). *Técnicas de laboratorio para la selección de sustancias antimaláricas*. La Paz, Bolivia: CYTED.
- Departamento Administrativo Nacional de Estadística DANE. (2007). *Colombia una nación multicultural*. Consultado el 22 de octubre de 2015. Recuperado de http://www.dane.gov.co/files/censo2005/etnia/sys/colombia_nacion.pdf
- Duque, M. (Julio de 1998). Sistemas tradicionales de salud en comunidades indígenas colombianas. Conferencia llevada a cabo en el 4th General Conference of the Federation for International Cooperation of Health Services and Systems Research Centers (FICOSSER), Cuernavaca, México.
- Economic and Social Council Chamber. (2009). *Panel Discussion on the Contribution of Traditional Medicine to the Realization of International Development Objectives related to Global Public Health*. Recuperado de <http://www.un.org/en>
- Fasinu, P., Bouic, P y Rosenkran, B. (2012). An overview of the evidence and mechanisms of herb–drug interactions. *Frontiers in Pharmacology* (3) 69, 1-19. doi 10.3389/fphar.2012.00069
- Ferreiros, M. F. (Sin fecha). *Modulación de la actividad de la glicoproteína P por los cannabinoides*. Universidad de Buenos Aires, Buenos Aires, Argentina.
- Gallup, J. y Sachs, J. (2001). The economic burden of malaria. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 64(1-2), 85-96.
- Garavito, G. (2003). *Estandarización de dos modelos de actividad antimalárica como herramientas para la evaluación farmacológica de sustancias o extractos de origen vegetal* (tesis de maestría). Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, Colombia.
- Garavito, G. (2007). *Etude Pharmacologique expérimentale de l'activité antipaludique d'un composé de synthèse: le chlorure de methylthioninium* (tesis de doctorado). Universidad de Toulouse, Toulouse, Francia.
- Garavito, G., Bertani, S., Quiliano, M., Aldana, I. y Deharo E. (2012). The in vivo antimalarial activity of methylene blue combined with pyrimethamine, chloroquine and quinine. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 107(6), 820 – 823.
- Gathirwa, J. W., Rukunga, G. M., Njagi, E. N. M., Omar, S. A., Mwitari, P. G. y Guantai, A. N.,...Ndiege, I. O. (2008). The *in vitro* anti-plasmodial and *in vivo* anti-malarial efficacy of combinations of some medicinal plants used traditionally for treatment of malaria by the Meru community in Kenya. *Journal of Ethnopharmacology*, 115(2), 223 – 31.

- Gbedema, S. Y., Bayor, M. T., Annan, C. y Wright, C.W. (2015). Clerodane diterpenes from *Polyalthia longifolia* (Sonn) Thw. var. pendula: Potential antimalarial agents for drug resistant *Plasmodium falciparum* infection. *Journal of Ethnopharmacology*, 169, 176-182. doi: 10.1016/j.jep.2015.04.014.
- Graz, B., Kitua, A. Y. y Malebo, H. M. (2011). To what extent can traditional medicine contribute a complementary or alternative solution to malaria control programmes?. *Malaria Journal*, 10 (1), 1 – 7. doi: 10.1186/1475-2875-10-S1-S6
- Guetzoyan, L., Ramiandrasoa, F., Dorizon, H., Desprez, C., Bridoux, A., Rogier, C.,...Perrée-Fauvet, M. (2007). In vitro efficiency of new acridyl derivatives against *Plasmodium falciparum*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 15(9), 3278 – 89. doi:10.1016/j.bmc.2007.02.022
- Guzman, V. y Carmona-Fonseca. (2006). El citocromo P-450 y la respuesta terapéutica a los antimaláricos. *Revista Panamericana de Salud Pública*, 19(1), 9-22.
- Hay, S., Guerra, A., Tatem, A., Noor, A. y Snow, R. (2004). The global distribution and population at risk of malaria: past, present, and future. *The Lancet Infectious Diseases*, 4(6), 327-336. doi: 10.1016/S1473-3099(04)01043-6
- Hayeshi, R., Masimirembwa, C., Mukanganyama, S. y Ungell, A. L. (2006). The potential inhibitory effect of antiparasitic drugs and natural products on P-glycoprotein mediated efflux. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 29(1), 70 – 81.
- Heinrich, M. y Jäger, A. (Eds). (2015). *Ethnopharmacology*. Oxford, UK: Editorial John Wiley & Sons Ltd.
- Herbario Universidad de Panamá. (2015). *C. toxicofera* (Wedd.) Barneby & Krukoff. Consultado el 15 de noviembre de 2015. Recuperado de <http://herbario.up.ac.pa/Herbario/herb/vasculares/view/species/3464>
- Instituto de Ciencias Naturales ICN-Universidad Nacional de Colombia. (2009). COL000243608 - *Curarea toxicofera* (Wedd.) Barneby & Krukoff – Menispermaceae. Consultado el 10 marzo de 2016. Recuperado de <http://www.biovirtual.unal.edu.co/ICN>
- Instituto Nacional de Salud INS. (2016a). *Boletín Epidemiológico Semanal número 06*. Consultado el 18 de febrero de 2016. Recuperado de <http://www.ins.gov.co/>
- Instituto Nacional de Salud INS. (2016b). *Malaria*. Consultado el 1 de febrero de 2016. Recuperado de <http://www.ins.gov.co/temas-de-interes/paginas/malaria.aspx>
- Iwatsuki, M., Takada, S., Mori, M., Ishiyama, A., Namatame, M., Nishihara-Tsukashima, A.,...Omura, S.(2011). In vitro and in vivo antimalarial activity of puberulic acid and

- its new analogs, viticolins A–C, produced by *Penicillium* sp. FKI-4410. *The Journal of Antibiotics*, 64(2), 183 -188. doi: 10.1038/ja.2010.124.
- Jiang GF. (1992). In vitro development of sodium artesunate resistance in *Plasmodium falciparum*. *Zhongguo Ji Sheng Chong Xue Yu Ji Sheng Chong Bing Za Zhi*, 10(1). 37-9.
- Jonker, D. M., Visser, S. A., van der Graaf, P. H., Voskuly, R. A. y Danhof, M. (2005). Towards a mechanism-based analysis of pharmacodynamic drug–drug interactions in vivo. *Pharmacology & Therapeutics*, 106(1), 1-18. doi:10.1016/j.pharmthera.2004.10.014
- Kerb, R., Fux, R., Mörike, K., Kremsner, P. G., Gil, J. P., Gleiter, C. H. y Schwab, M. (2009). Pharmacogenetics of antimalarial drugs: effect on metabolism and transport. *The Lancet Infectious Diseases*, 9(12), 760 – 74.
- Kim, HS. (2005). Do not put too much value on conventional medicines. *Journal of Ethnopharmacology*, 100 (1-2), 37- 79.
- Lin, G. (2014). Beneficial herb–drug interaction in combinational therapy of herbal medicine with drug. *European Journal of Integrative Medicine*, 6, 697.
- Madaleno, I. M. (2007). Etno-farmacología en Iberoamérica, una alternativa a la globalización de las prácticas de cura. *Cuadernos Geográficos de la Universidad de Granada*, 2(41),61-95.
- Matthews, H., Usman-Idris, M., Khan, F., Read, M. y Nirmalan, N. (2013). Drug repositioning as a route to anti-malarial drug discovery: preliminary investigation of the in vitro anti-malarial efficacy of emetine dihydrochloride hydrate. *Malaria Journal*, 12(1), 359. doi: 10.1186/1475-2875-12-359.
- Menachery, M. D. (1996). Chapter Three The Alkaloids of South American Menispermaceae. *Alkaloids: Chemical and Biological Perspectives*, 11, 269 – 302. doi:10.1016/S0735-8210(96)80007-0
- Mendoza, A., Pérez-Silanes, S., Quiliano, M., Pabón, A., Galiano, S., González, G.,...Deharo, E. (2011). Aryl piperazine and pyrrolidine as antimalarial agents. Synthesis and investigation of structure–activity relationships. *Experimental Parasitology*, 128(2), 97-103. doi: 10.1016/j.exppara.2011.02.025.
- Meunier, Y. A. (2014). *Tropical Diseases: a practical guide for medical practioners and students*. New York, US: Oxford University Press.
- Ministerio de Salud y Protección Social MINSALUD. (2010). *Guía de atención clínica de malaria 2010*. Consultado el 10 de agosto de 2015. Recuperado de <http://www.acin.org/new/>

- Ministerio de Salud y Protección Social MINSALUD. (Sin fecha). *Gestión para la vigilancia entomológica y control de la transmisión de malaria*. Consultado el 7 de agosto de 2015. Recuperado de <http://www.paho.org/hq/>
- Ministerio del Interior y de Justicia República de Colombia (2009). *La Consulta Previa a Grupos Étnicos en Colombia, Compendio de Legislación, Jurisprudencia y Documentos de Estudio*. Tomo I y II Bogotá D.C. Colombia. 151-155; 636-639.
- Mishra, K., Chakraborty, D., Pal, A. y Dey, N. (2010). *Plasmodium falciparum: In vitro* interaction of quassin and neo-quassin with artesunate, a hemisuccinate derivative of artemisinin. *Experimental Parasitology*, 124(4), 421 – 7. doi:10.1016/j.exppara.2009.12.007.
- Molyneaux, C. A., Krugliak, M., Ginsburg, H. y Chibale, K. (2005). Arylpiperazines displaying preferential potency against chloroquine-resistant strains of the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Biochemical Pharmacology*, 71(1-2), 61 -8. doi:10.1016/j.bcp.2005.10.023
- Muregi, F. Chhabra, S., Njagi, E., Lang'at-Thoruwa, C., Njue, W., Orago, A., Omar S y Ndiege, I. (2004). Anti-plasmodial Activity of Some Kenyan Medicinal Plant Extracts Singly and in Combination with Chloroquine. *Phytotherapy Research*. 18, 379–384. doi 10.1001/ptr.1439
- Muregi, F. W., Ishih, A., Miyase, T., Suzuki, T., Kino, H., Amano, T.,... Terada, M. (2007). Antimalarial activity of methanolic extracts from plants used in Kenyan ethnomedicine and their interactions with chloroquine (CQ) against a CQ-tolerant rodent parasite, in mice. *Journal of Ethnopharmacology*, 111(1), 190 – 195. doi:10.1016/j.jep.2006.11.009
- Muregi, F., Ishih. A., Miyase, A., Suzuki, T., Kino, H., Amano, T., Mkoji, G., Terada, M., (2007). Antimalarial activity of methanolic extracts from plants used in Kenyan ethnomedicine and their interactions with chloroquine (CQ) against a CQ-tolerant rodent parasite, in mice. *Journal of Ethnopharmacology* 111, 190–195. doi:10.1016/j.jep.2006.11.009
- Ocloo, A., Okpattah, W., Quasie, O., Sakyiamah, M., y Okine, L. (2014). Concurrent administration of aqueous extract of *Cryptolepis sanguinolenta* reduces the effectiveness of Artesunate against *Plasmodium berghei* in Rats. *Journal of Applied Pharmaceutical Science* 4 (03), 024-028. doi 10.7324/JAPS.2014.40306
- Ocloo, A., Okpattah, W., Quasie, O., Sakyiamah, M. M. Okine, L. (2014). Concurrent administration of aqueous extract of *Cryptolepis sanguinolenta* reduces the effectiveness of Artesunate against *Plasmodium berghei* in Rats. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 4(3), 24-28. doi: 10.7324/JAPS.2014.40306

- Organización de las Naciones Unidas para la Educación, la Ciencia y la Cultura UNESCO. (2011). *A Consultancy Study on Cultural Rights in The Gambia*. Consultado el 25 de agosto de 2015. Recuperado de <http://en.unesco.org>
- Organización Mundial de la Propiedad Intelectual OMPI (Sin fecha). Bases de datos y registros en Internet de los conocimientos tradicionales y los recursos genéticos. Consultado el 3 de mayo de 2016. Recuperado de <http://www.wipo.int/>
- Organización Mundial de la Propiedad Intelectual OMPI. (2013). *La propiedad intelectual y los conocimientos médicos tradicionales* (Reseña número 6). Recuperado de <http://www.wipo.int/>
- Organización Mundial de la Salud OMS. (1995). *Drugs used in Parasitic Diseases* (Second Edition). Recuperado de <http://www.who.int/es/>
- Organización Mundial de la Salud OMS. (2006). *Salud pública innovación y derechos de propiedad intelectual*. Recuperado de <http://www.who.int/en>
- Organización Mundial de la Salud OMS. (2011). World malaria report 2011. Recuperado de <http://www.who.int/>
- Organización Mundial de la Salud OMS. (2014). *Paludismo – Resistencia a los medicamentos antipalúdicos*. Consultado el 1 de febrero de 2016. Recuperado de http://www.who.int/malaria/areas/drug_resistance/overview/es/
- Organización Mundial de la Salud OMS. (2015a). *Paludismo – Farmacorresistencia y contención*. Consultado el 12 de noviembre de 2015. Recuperado de http://www.who.int/malaria/areas/drug_resistance/es/
- Organización Mundial de la Salud OMS. (2015b). *Paludismo – Tratamiento del paludismo: panorama general*. Consultado el 13 de noviembre de 2015. Recuperado de <http://www.who.int/malaria/areas/treatment/overview/es/>
- Organización Mundial de la Salud OMS. (2015c). *World Malaria Report 2015*. Recuperado de <http://www.who.int/en/>
- Organización nacional indígena de Colombia ONIC. (Sin fecha). Pueblos indígenas. Organización nacional indígena de Colombia. Consultado el 14 de junio de 2013. Recuperado de <http://cms.onic.org.co/pueblos-indigenas/>
- Organización Panamericana de la Salud OPS. (2011). *Malaria en las Américas Reporte 2011*. Recuperado de <http://www.paho.org/hq/>
- Organización Panamericana de la Salud OPS. (2013). Situación de la Malaria en la Región de las Américas, 2000-2013. Recuperado de <http://www.paho.org/hq/>

- Orjuela, P., González, I. y Osorio, L. (2004). Terapia combinada como estrategia en la prevención de la resistencia a los antimaláricos. *Biomédica* 24, 423-3.
- Padilla, J., Uribe, G., Araújo, R., Narváez, P. y Valencia, S. (2011). Epidemiology and control of malaria in Colombia. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 106(1), 114-122.
- Poveda, G., Estrada, O. A., Morales J. E., Hernandez, O. O., Galeano, A. y Osorio, S. (2011). Integrating knowledge and management regarding the climate–malaria linkages in Colombia. *Current Opinion in Environmental Sustainability* 3(6), 448 – 460.
- Pradines, B., Alibert-Franco, S., Houdoin, C., Mosnier, J., Santelli-Rouvier, C., Papa, V.,...Parzy, D. (2002). In vitro reversal of chloroquine resistance in *Plasmodium falciparum* with dihydroethanoanthracene derivatives. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 66(6), 661-6.
- Rasoanaivo, P., Wright C. W., Willcox, M. L. y Gilbert, B. (2011). Whole plant extracts versus single compounds for the treatment of malaria: synergy and positive interactions. *Malaria Journal*, 10. doi: 10.1186/1475-2875-10-S1-S4.
- Rodríguez, M. A., Gálvez, M., Macías, M., Pérez, G. y Gómez, C. (2009). Drogas antimalarías: mecanismos de acción y de resistencia. En Rocha, R., Lozano, P. y Martínez, Y (Eds.), *Temas Selectos de Microbiología*. Puebla, México: Publicado por Benemérita Universidad Autónoma de Puebla.
- Rodríguez, Z. (2015). *Evaluación comparativa de la actividad antimalárica de un remedio tradicional frente a un extracto primario; profundización del estudio de su actividad farmacológica* (tesis de maestría). Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, Colombia.
- Roe, A. L., Paine, M. F., Gurley, B. J., Brouwer, K. R., Jordan, S. y Griffiths, J. C. (2016). Assessing Natural Product-Drug Interactions: An End-to-End Safety Framework. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 76, 1- 6. doi:10.1016/j.yrtph.2016.01.004.
- Sanchez, C. P., Wünsch, S. y Lanzer, M. (1997). Identification of a chloroquine importer in *Plasmodium falciparum*. Differences in import kinetics are genetically linked with the chloroquine-resistant phenotype. *The Journal of Biological Chemistry*, 272(5), 2652 -8.
- Secretaría del Convenio sobre Diversidad Biológica. (2011). Protocolo de NAGOYA, sobre el acceso y participación de beneficios. Naciones Unidas. Recuperado de <http://www.un.org/>

- Shao, X., Ai, N., Xu, D. y Fan, X. (2016). Exploring the interaction between *Salvia miltiorrhiza* and human serum albumin: Insights from herb–drug interaction reports, computational analysis and experimental studies. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 161, 1 – 7. doi:10.1016/j.saa.2016.02.015.
- Snyder, C., Chollet, J., Santo-Tomas, J., Scheurer, C. y Wittlin, S. (2007). *In vitro* and *in vivo* interaction of synthetic peroxide RBx11160 (OZ277) with piperazine in *Plasmodium* models. *Experimental Parasitology*, 115(3), 296 – 300.
- Teng, W., Kiat, H., Suwanarusk, R. y Koh, H. (2016). *Malaria An Overview y Research on Medicinal Plants for Malaria*. En Hardman, R. (Ed.), *Medicinal plants and malaria* (1-6; 49-108), Boca Raton, US: Editorial Taylor & Francis Group.
- The Plant List. (2013). *Curarea toxicifera* (Wedd.) Barneby & Krukoff. Consultado el 10 de marzo 2016. Recuperado de <http://www.theplantlist.org/>
- Trager, & Jensen. (1976). Human malaria parasites in continuous culture. *Science*, 673 – 675
- Universidad Nacional de Colombia. (2013). Propuesta de política para la protección de los sistemas de conocimiento tradicional asociados a la biodiversidad colombiana. (Claves para el debate público No 57). Recuperado de <http://unal.edu.co/>
- Venkataramanan, R., Komoroski, B. y Strom, S. (2006). *In vitro* and *in vivo* assessment of herb drug interactions. *Life Sciences*, 78(18), 2105 – 2115.
- Vivas, L., Rattray, L., Stewart, L. B., Robinson B. L., Fungmann, B., Haynes, R. K.,... Croft, S. L. (2007). Antimalarial efficacy and drug interactions of the novel semi-synthetic endoperoxide artemisone *in vitro* and *in vivo*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 59(4), 658 – 665. doi:10.1093/jac/dkl563
- Waako, P., Smith, P., Folb, P. (2005). *In vitro* interactions of *Aspilia Africana* a traditional antimalarial medicinal plant, with artemisinin against *Plasmodium falciparum*. *Journal of Ethnopharmacology*, 102(1), 262–268. doi:10.1016/j.jep.2005.06.021
- Wang, X., Zhu, H. J., Munoz, J., Gurley, B. J. y Markowitz, J. S. (2015). An *ex vivo* approach to botanical-drug interactions: a proof of concept study. *Journal of Ethnopharmacology* 163, 149 – 56. doi: 10.1016/j.jep.2015.01.021.
- Wiersema, J. y León, B. (2013). *World Economic Plants: A Standard Reference* (Second Edition). Boca Raton, US: CRC Press.
- Wu, X., Ma, J., Ye, Y. y Lin, G. (2015). Transporter modulation by Chinese herbal medicines and itsmediated pharmacokinetic herb–drug interactions. *Journal of Chromatography B*. doi: 10.1016/j.jchromb.2015.11.024.

- Zhou, G., Minakawa, N., Githeko, A. y Yan, G. (2004). Association between climate variability and malaria epidemics in the East African highlands, PNAS 101(8), 2375-2380.
- Zofou, D., Tene, M., Tane, P. y Titanji, V. P. (2012). Antimalarial drug interactions of compounds isolated from *Kigelia africana* (Bignoniaceae) and their synergism with artemether, against the multidrug-resistant W2mef *Plasmodium falciparum* strain. Parasitology Research, 110(2), 539-44. doi: 10.1007/s00436-011-2519-9.