

UNIVERSIDAD DE PANAMÁ
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES, EXACTAS Y TECNOLOGÍA
ESCUELA DE BIOLOGÍA

ESTUDIO DE ACTIVIDAD ANTIPLASMÓDICA DEL COMPUESTO
SHAO OUC-ZXQ-03 EN CULTIVOS IN VITRO

YUSSETH A. VILLARREAL G.

PANAMÁ, REPÚBLICA DE PANAMÁ
2024



UNIVERSIDAD DE PANAMÁ
Facultad de Ciencias Naturales, Exactas y Tecnología
Escuela de Biología
Dpto. de Microbiología y Parasitología
Proyecto de Graduación



Título:
ESTUDIO DE ACTIVIDAD ANTIPLASMÓDICA DEL COMPUESTO
SHAO OUC-ZXQ-03 EN CULTIVOS IN-VITRO

Por:
Yusseth A. Villarreal G.
8-910-1262

Asesores:
Nidia Sandoval, PhD
Asesor Principal
Nivia Ríos, Mgtr
Asesora
Fermín Mejía, Mgtr
Asesor

Asesor Externo:
Carmenza Spadafora, PhD
Lorena Coronado, PhD

Trabajo de graduación sometido a consideración por la Escuela de Biología, Facultad de Ciencias Exactas y Tecnología, como requisito parcial para optar por el título de Licenciada en Biología con orientación en Microbiología y Parasitología.

2024



TRIBUNAL EXAMINADOR

Título:

“ Estudio de Actividad Antiplasmódica del Compuesto SHAO OUC-ZXQ-03 en Cultivos *In Vitro* ”

Por:

YUSSETH A. VILLARREAL G.
8-910-1262

Trabajo de graduación sometido a consideración por la Escuela de Biología, Facultad de Ciencias Exactas y Tecnología, como requisito parcial para optar por el título de Licenciada en Biología con orientación en Microbiología y Parasitología.

Asesores:

Profa. Nidia Sandoval

Profa. Nivia Ríos

Prof. Fermín Mejía

A mi amado abuelo, Ismael Villarreal, quien sigue siendo la luz de mi vida. Este logro es un homenaje a la sabiduría, el amor y la orientación que compartiste conmigo a lo largo de tu vida.

-Yusseth Villarreal

Agradecimientos

Primeramente, agradezco a Dios por las oportunidades, lecciones y experiencias que me ha brindado a lo largo de esta etapa de mi vida, y por esas personas que ha puesto en mi camino para guiarme en los hasta en los momentos más difíciles.

A mis asesores Nidia Sandoval, Nivia Rios, Fermín Mejía por la guía y apoyo que me han brindado en este camino. Gracias por compartir su experiencia y conocimiento, han contribuido de manera significativa a mi desarrollo.

A la Dra. Carmenza Spadafora por su inquebrantable apoyo y comprensión. Aprecio profundamente que nunca haya dado la espalda ni cerrado las puertas, a pesar de las adversidades de la vida que llevaron a que mi presencia en los laboratorios fuera intermitente a lo largo de los años. Su compromiso en fomentar una mentalidad de aprendizaje continuo ha dejado una marca indeleble en mi desarrollo académico y personal. Agradezco enormemente la inspiración que me brinda para abrazar las posibilidades ilimitadas que surgen de una actitud de curiosidad y aprendizaje constante.

A Lic. Laura Pineda por su paciencia, dedicación, sabiduría y guía. Su apoyo ha sido fundamental en mi camino, especialmente en esos momentos desafiantes en los que fácilmente podría haberme rendido, pero nunca dejó de brindarme su apoyo incondicional.

A la Dra. Lorena Coronado por su apoyo inquebrantable y orientación. Ha sido consistentemente un faro de ayuda, siempre ofreciendo su colaboración incluso durante los fines de semana. Su compromiso para aclarar cualquier pregunta que tenía y guiarme en la dirección correcta ha sido invaluable.

A la Lic. Michelle Ng por su paciencia inmensurable, orientación y apoyo. Michelle, gracias no solo por los momentos en que nos enfocamos en experimentos, sino también por devolverme la alegría de mi yo más joven, cuando los libros eran parte integral de mi vida diaria. Tu aliento constante y mentoría no solo han mejorado mi comprensión científica, sino que también han revitalizado mi sentido de curiosidad y entusiasmo.

Al Dr. Ricardo Correa por su paciencia excepcional, orientación y por inculcarme la importancia de nunca dejar de aprender. Tu paciencia al guiarme a través de desafíos y tu énfasis en la búsqueda perpetua del conocimiento han sido invaluable.

A la Dra. Rosa de Leon por brindarme la invaluable oportunidad de trabajar con ratones y transmitirme la profunda importancia que tienen en el ámbito científico. Más allá del conocimiento adquirido, estoy especialmente agradecida por las lecciones sobre preservar nuestra humanidad al trabajar con estos seres vivos. Aprecio su paciencia al guiarme a través de las complejidades de trabajar con ratones, y su apoyo inquebrantable ha sido fundamental en mi crecimiento.

Al equipo de Laboratorio de Centro de Biología Celular y Molecular de Enfermedades - CBCMe, Ana patricia Valencia, Evelin Alaín, Jahiro Gómez, Betzaida Domínguez, Milixza Botacio, Carlos Chellaram, Patrick Padmore McCalla, Doriana Dorta, a la Dr. Nerea Escala y a Jafeth Carrasco por el apoyo inquebrantable y asistencia. Gracias por ayudarme siempre con mis experimentos y proporcionarme conocimientos valiosos. Su compromiso en fomentar un ambiente colaborativo y enriquecedor ha sido fundamental en mi trayectoria científica.

Al equipo del Bioterio por darme la oportunidad de expandir mi conocimiento, por su apoyo inigualable, sus enseñanzas y su sentido de compañerismos.

Al Instituto de Investigaciones Científicas y Servicios de Alta Tecnología de Panamá AIP (INDICASAT-AIP) un espacio invaluable que ha sido fundamental mi trayectoria científica. Las experiencias que obtuve entre tus paredes han sido verdaderamente transformadoras, dando forma a mi comprensión y aprecio por el área científica.

A mi familia, por siempre apoyarme a lo largo de mi trayectoria universitaria. Su constante aliento y confianza en mí han sido mis pilares de fuerza. Sus sacrificios, ya sean grandes o pequeños, han hecho posible que persiga mi educación con determinación y enfoque. Gracias por ser mi base, mi equipo de animadores y mi fuente de amor y motivación.

A mi hermana Gabriela Villarreal por su constante apoyo y aliento a lo largo de este proceso. Por su paciencia y palabras de motivación me han brindado la fortaleza necesaria para superar los desafíos y continuar adelante. No hay palabras para expresar su amor incondicional y su incansable dedicación. Este logro no hubiese sido posible sin tu apoyo. Gracias, Gaby, por ser mi inspiración y por estar siempre a mi lado. Este trabajo es tan tuyo como mío.

A mis amigos por ser mi sistema de apoyo inquebrantable a lo largo de mi trayectoria universitaria. Su aliento, camaradería y comprensión han hecho que cada paso de esta aventura educativa sea más significativo y placentero. Me siento realmente afortunada de tener amigos como ustedes, y estoy profundamente agradecida por los lazos que hemos forjado, haciendo de este capítulo de mi vida algo verdaderamente especial.

A mis profesores por su apoyo inquebrantable y orientación a lo largo de mi trayectoria universitaria. Su dedicación para impartir conocimientos, fomentar el pensamiento crítico y alentar la curiosidad intelectual ha dado forma de manera profunda a mi experiencia académica.

Por último, quiero expresar mi agradecimiento a la Universidad de Panamá por brindarme la increíble oportunidad de ser parte de esta prestigiosa institución y permitirme llevar a cabo mis estudios. Ha sido un entorno enriquecedor donde he podido crecer tanto académica como personalmente. El apoyo y los recursos proporcionados han desempeñado un papel crucial en mi trayectoria educativa, y estoy verdaderamente agradecida.

Índice General

Resumen.....	1
Abstract	2
Introducción	3
Capítulo I: Marco Teórico	6
1.1. Revisión Bibliográfica.....	7
1.1.1. Ciclo de Vida de <i>Plasmodium falciparum</i>	8
1.1.2. Síntomas.....	15
1.1.3. Tratamientos	18
1.2. Objetivos	23
1.2.1. Objetivo General	23
1.2.2. Objetivos Específicos.....	23
1.3. Hipótesis.....	24
1.3.1. Hipótesis de Investigación	24
1.3.2. Hipótesis Cuantitativas	24
Capítulo II: Marco Metodológico	25
2.1. Metodología	26
2.1.1. Cultivo <i>in vitro</i> de <i>Plasmodium falciparum</i>	26
2.1.2. Resuspensión del Compuesto SHAO OUC-ZXQ-03.....	26
2.1.3. Incorporación de Yoduro de Propidio	27

2.1.4. Hemólisis	29
2.1.5. Potencial de Membrana	31
2.1.6. Microscopía de Campo Claro	32
2.1.7. Prueba de Concentración Inhibitoria Media Máxima (IC ₅₀) en <i>P. falciparum</i>	34
2.1.8. Prueba <i>in vivo</i> de seguridad del compuesto SHAO OUC-ZXQ-03.....	35
Capítulo III: Resultados y Discusión de Resultados.....	38
3.1. Resultados y Discusión de Resultados	39
3.1.1. Incorporación de Yoduro de Propidio	39
3.1.2. Hemólisis	40
3.1.3. Potencial de Membrana	42
3.1.4. Microscopía de Campo Claro	43
3.1.5. Prueba de Concentración inhibitoria media máxima (IC ₅₀) en <i>Plasmodium falciparum</i>	45
3.1.6. Prueba <i>in vivo</i> de seguridad del compuesto SHAO OUC-ZXQ-03 en ratones C57BL/6	47
Capítulo IV: Conclusión y Recomendaciones	57
4.1. Conclusión.....	58
4.2. Recomendaciones.....	59
Referencias Bibliográficas	60
Anexos	73

Glosario.....	83
---------------	----

Índice de Figuras

Figura 1. Ciclo de Vida de <i>Plasmodium spp</i>	8
Figura 2. Ciclo Exo-eritrocítico del parásito de la Malaria.....	9
Figura 3. Invasión del eritrocito por el Merozoíto.	11
Figura 4. Ciclo Eritrocítico de <i>Plasmodium Spp</i>	12
Figura 5. Ciclo Esporogónico de la Malaria	14
Figura 6. Cultivo in vitro de <i>Plasmodium falciparum</i>	26
Figura 7. Resuspensión del Compuesto SHAO OUC-ZXQ-03.....	27
Figura 8. Esquema representativo del ensayo de Incorporación de Yoduro de Propidio.	28
Figura 9. Esquema del ensayo de Incorporación de Yoduro de Propidio.	29
Figura 10. Ensayo de Hemólisis.....	30
Figura 11. Esquema del Ensayo de Hemólisis.	30
Figura 12. Ensayo de Potencial de Membrana.....	31
Figura 13. Esquema del Ensayo de Potencial de Membrana.	32
Figura 14. Ensayo de Microscopía óptica.	33
Figura 15. Tinción. Ensayo de Microscopía de Campo Claro.	34
Figura 16. Prueba de Concentración inhibitoria media máxima en <i>Plasmodium falciparum</i> ...	34
Figura 17. Esquema de la Prueba de Concentración inhibitoria media máxima en <i>Plasmodium falciparum</i>	35
Figura 18. Ensayo de Incorporación de Yoduro de Propidio.....	39

Figura 19. Ensayo de Hemólisis.....	41
Figura 20. Ensayo de Potencial de Membrana.....	42
Figura 21. Ensayo de Microscopía de Campo Claro.....	45
Figura 22. Prueba de Concentración inhibitoria media máxima en Plasmodium falciparum...	47
Figura 23. Variación de Peso de los Ratones C57BL/6	50
Figura 24. Consumo de Agua y Alimentos de los ratones C57BL/6	51
Figura 25. Temperatura corporal de los ratones C57BL/6	53
Figura 26. Temperatura Ambiental y Humedad ambiental de los ratones C57BL/6	54
Figura 27. Evaluación macroscópica de los órganos Ratón C57BL/6	56

Índice de Tablas

Tabla 1. Prueba T-Student. Ensayo de Incorporación de Yoduro de Propidio	31
Tabla 2. Anova. Ensayo de Hemólisis	41
Tabla 3. Anova. Ensayo de Potencial de Membrana a las 3 horas y 6 horas.....	42

Índice de Anexos

Anexo 1. Incorporación de Yoduro de Propidio	73
Cuadro 1. Ensayo #1 de Incorporación de Yoduro de Propidio.....	73
Cuadro 2. Ensayo #2 de Incorporación de Yoduro de Propidio.....	73
Anexo 2. Microscopía	74
Cuadro 3. Ensayo #1 de Microscopía.....	74
Cuadro 4. Ensayo #2 de Microscopía.....	74
Cuadro 5. Ensayo #3 de Microscopía.....	75
Anexo 3. Potencial de Membrana	76
Cuadro 6. Ensayo #1 Potencial de Membrana.....	76
Cuadro 7. Ensayo #2 Potencial de Membrana.....	76
Anexo 4. Hemólisis	77
Cuadro 8. Ensayo #1 Hemólisis	77
Cuadro 9. Ensayo #2 Hemólisis	77
Cuadro 10. Ensayo #3 Hemólisis	77
Anexo 5. Prueba <i>In-vivo</i> de seguridad del compuesto SHAO OUC-ZXQ-03.....	78
Cuadro 11. Prueba <i>In-vivo</i> de seguridad del compuesto SHAO OUC-ZXQ-03 Día #1	78
Cuadro 12. Prueba <i>In-vivo</i> de seguridad del compuesto SHAO OUC-ZXQ-03 Día #2	78
Cuadro 13. Prueba <i>In-vivo</i> de seguridad del compuesto SHAO OUC-ZXQ-03 Día #3	79

Cuadro 14. Prueba In-vivo de seguridad del compuesto SHAO OUC-ZXQ-03 Día #4.....	79
Cuadro 15. Prueba In-vivo de seguridad del compuesto SHAO OUC-ZXQ-03 Día #5.....	80
Cuadro 16. Prueba In-vivo de seguridad del compuesto SHAO OUC-ZXQ-03 Día #6.....	80
Cuadro 17. Prueba In-vivo de seguridad del compuesto SHAO OUC-ZXQ-03 Día #7	81
Cuadro 18. Prueba In-vivo de seguridad del compuesto SHAO OUC-ZXQ-03 Día #8.....	81
Cuadro 19. Prueba In-vivo de seguridad del compuesto SHAO OUC-ZXQ-03 Día #9.....	82
Cuadro 20. Prueba In-vivo de seguridad del compuesto SHAO OUC-ZXQ-03 Día #10.....	82

Resumen

La malaria, ocasionada por *Plasmodium falciparum* es una de las enfermedades con mayor índice de mortalidad en el mundo. Según nuevas investigaciones, este ha presentado resistencia ante medicamentos por lo que ha incentivado la búsqueda de nuevos tratamientos. El compuesto SHAO OUC-ZXQ-03, derivado de metabolitos secundarios aislados en el hongo *Cochliobolus lunatus*, ha mostrado ser un inhibidor ante el parásito. En esta investigación se buscó evaluar la actividad inhibitoria del compuesto en cultivos *in vitro* e *in vivo* de *Plasmodium falciparum*. Para esto, se realizaron ensayos de microscopía, incorporación de yoduro de propidio (IP), hemólisis y potencial de membrana en cultivos *in vitro* de *Plasmodium falciparum* (iRBC). Para los ensayos se tomó en cuenta el doble de la concentración inhibitoria media máxima (IC50) de 1.84 μM , siendo este 4 μM . En el ensayo de microscopía no se observó inhibición en los cultivos iRBC por parte del compuesto. No obstante, en las pruebas incorporación de IP, confirmado por el ensayo de hemólisis, se observó daños en la membrana. Mientras que, en los ensayos de potencial de membrana, se exhibía una hiperpolarización de la membrana, iniciando una muerte celular. A pesar del compuesto presentar inhibición ante los previos ensayos, este no se observó en el ensayo de microscopía; por lo tanto, se realizó una última prueba de IC50 para validar lo observado en la literatura. Esta indicó que el IC50 no se encontraba en 1.84 μM , sino en 12.48 μM . Dicho incremento pudo ser ocasionado al resuspender el compuesto liofilizado. Indicando así que, el compuesto puede llegar a ser funcional e inhibir cultivos de iRBC. En síntesis, es recomendable realizar una prueba de IC50 antes de iniciar los ensayos.

Palabras Claves: *Plasmodium Falciparum*, Actividad Antiplasmodial, Malaria

Abstract

Malaria, caused by *Plasmodium falciparum* is one of the diseases with the highest mortality rate in the world. According to new research, it has shown resistance to medications, which has encouraged the search for new treatments. The SHAO OUC-ZXQ-03 compound, derived from secondary metabolites isolated in the fungus *Cochliobolus lunatus*, has been shown to be an inhibitor against the parasite. This research sought to evaluate the inhibitory activity of the compound in *in vitro* and *in vivo* cultures of *Plasmodium falciparum* for this the following tests were performed: microscopy, incorporation propidium iodide (PI), hemolysis, membrane potential in *in vitro* cultures of *Plasmodium falciparum* (iRBC). For the assays, twice the half-maximal inhibitory concentration (IC₅₀) of 1.84 μ M was considered, this being 4 μ M. In the microscopy assay, no inhibition was observed in the iRBC cultures with the compound. However, in the IP incorporation tests, confirmed by the hemolysis test, damage to the membrane was verified. While, in membrane potential assay, a hyperpolarization of the membrane was exhibited, initiating cell death. Although the compound presents inhibition in the previous tests, this will not be observed in the microscopy test; Therefore, a final IC₅₀ test was performed to validate what was observed in the literature. This indicated that the IC₅₀ was not at 1.84 μ M, but at 12.48 μ M. This increase could have been caused by resuspending the lyophilized compound. Thus, indicating that the compound can become functional and inhibit iRBC cultures. In summary, it is advisable to perform an IC₅₀ test before starting the tests.

Keywords: *Plasmodium Falciparum*, Antiplasmodial Activity, Malaria

Introducción

La malaria, infección parasítica causada por *Plasmodium falciparum*, es una de las más antiguas y dispersas parasitosis a nivel mundial. Esta se presenta en forma de fiebres periódicas mortales, como también esplenomegalia, en escritos egipcios y chinos que datan de los años 2700 a.C. Sin embargo, en la actualidad, este se encuentra mayormente presente en latitudes subtropicales como África y Brasil (Suh, Kain, & Keystone, 2004; García, 2010). Esto se atribuye a que los países con problemas económicos no tienen los medios, ni recursos suficientes, para poder contrarrestar los vectores que transmiten el *Plasmodium falciparum* o las infecciones que ocasiona el mismo (WHO, 2005).

Según los estudios moleculares realizados en la investigación de "Múltiples Introducciones Independientes de *Plasmodium falciparum* en América del Sur", la presencia de *P. falciparum* se presenta luego de la migración europea a América y la trata transatlántica de esclavos africanos (Yalcindag et al., 2011). La introducción del parásito de la malaria se presenta alrededor del año 1560 por medio de la acción de vectores; conclusión obtenida luego del análisis de marcadores genéticos, por medio de marcadores microsatélites, trazables a un loci proveniente de África. Esto se sugiere a raíz de la data molecular obtenida, en donde se indica que la especie europea, ya extinta, de *P. vivax*, puede haberse introducido varias veces, hace menos de 500 años, durante esta forzada reubicación de esclavos africanos (Griffing et al., 2015).

Tras años de contrarrestar el parásito se da la primera campaña masiva contra la malaria en Brasil, en donde, se estima la muerte de 10,000 personas parasitadas. Es en la década de los 30 que se presenta la llegada de botes provenientes de África conteniendo la especie de *Anopheles*

arabiensis, vector de la malaria. Es a raíz de esta llegada que se observa un aumento de casos, ocasionando que el 20 % de la población brasileña presentara parasitosis (Carlos et al., 2019). Esto lleva a la Fundación Rockefeller a presentar la segunda campaña que, hasta el momento, es considerada una de las campañas más efectivas en contra de los vectores africanos, permitiendo la eliminación del mosquito en tan solo dos años (Killeen et al., 2002).

A pesar de ser una de las campañas más exitosas, no se logró erradicar por completo el parásito de la malaria. Es de esta manera en que se presenta una tercera campaña, mediante el uso del dicloro-difenil-tricloroetano (DDT), como control del mosquito y cloroquina como control del parásito (Carlos et al., 2019); sin embargo, el DDT fue eliminado como control de vector debido a los efectos secundarios que ocasionó en la población como vómitos, temblores o temblores y convulsiones (EPA, 2022; CDC, 2021).

Como antes mencionado, el constante movimiento poblacional a lo largo de los años ha llevado al aumento de la parasitosis en la población (Carlos et al., 2019). Dicho esto, para poder crear un programa de erradicación de malaria se debe tomar en cuenta el movimiento poblacional más con el advenimiento de las nuevas tecnologías de transporte (Tatem & Smith, 2010). Esto es necesario mencionarlo ya que este movimiento poblacional ha ocasionado que, el parásito de la malaria *Plasmodium falciparum*, cuente con una reserva genética que permite su mutación o la aparición de nuevos linajes de la especie (Rodrigues et al., 2018). Esto explica la resistencia que presenta la malaria ante los medicamentos como la cloroquina, los cuales se presentan a raíz de múltiples mutaciones en el transportador resistente de cloroquina de *Plasmodium falciparum* (PfCRT) (Wellems & Plowe, 2001). Cabe destacar que la resistencia al tratamiento, no solo se presenta en Brasil sino también en otros países afectados por el parásito como, por ejemplo, el Sureste de Asia. En la República del Congo, entre las fronteras de Tailandia y Camboia, se ha

comenzado a evaluar la eficiencia del tratamiento con Artemisinina en pacientes que presentan *P. falciparum*, los cuales tuvieron resultados desalentadores (Ashley et al., 2014). Debido a esto se ha tomado en cuenta la genética de los organismos para tener una mejor comprensión de esta resistencia. Se han estudiado algunas modificaciones en el gen Kelch13 del cromosoma 13 de *P. falciparum*, con la finalidad de saber si existe relación entre dicho gen y la resistencia al tratamiento con Artemisinina. Afortunadamente, esta variación genética no está presente globalmente, pero sigue la inquietud de que la misma va en aumento (Sibley, 2015).

De esta manera, en colaboración con el Instituto de Investigaciones Científicas y Servicios de Alta Tecnología (INDICASAT) y La universidad de Panamá (UP), se buscó evaluar la actividad antiplasmodial del compuesto SHAO OUC-ZXQ-03, compuesto que ha presentado reducción de la parasitemia en presencia del parásito de la malaria, *Plasmodium falciparum*.

Capítulo I: Marco Teórico

1.1. Revisión Bibliográfica

Plasmodium spp, pertenece al Filo *Apicomplexa*, Orden *Haemosporida* y Familia *Plasmodiida*, con más de 200 especies descritas. Es un género de parásitos unicelulares que infectan a vertebrados e insectos, mientras que algunos principalmente infectan a los humanos (Sato, 2021).

Entre las especies de *Plasmodium* spp, reportadas podemos mencionar al *P. vivax*, *P. ovale*, *P. malariae*, *P. falciparum* y *P. knowlesi* (WHO, 2022; CDC, 2023), las cuales son transmitidas a través de la picadura del mosquito *Anopheles* (vector) hembra que han sido previamente infectados con sangre humana afectada; a excepción del *P.knowlesi*, que puede infectar a monos macacos, encontrados en el sureste Asia, para luego infectar al humano por medio de dicho vector (Ramasamy, 2014).

Su ciclo de vida implica el desarrollo en un insecto huésped que se alimenta de sangre, que luego inyecta los parásitos en un huésped vertebrado durante una ingesta de sangre y, por lo general, se desarrollan en el hígado antes de ingresar al torrente sanguíneo e infectar los glóbulos rojos, lo que provoca la enfermedad de la malaria (Sato, 2021).

Esta enfermedad puede llegar a presentar una sintomatología leve como escalofríos, debilidad, sudoración, fiebre, dolor de cabeza, entre otros, potencialmente pueden ser considerados como síntomas virales. Sin embargo, de no ser tratado apropiadamente, este puede desarrollarse en una enfermedad grave con síntomas como la anemia severa, insuficiencia renal e insuficiencia multisistémica. Como consecuencia, podría hasta ocasionar la muerte. Según el "World Malaria Report 2022", solo en el año 2021 se reportaron un total de 247 millones de casos donde 619 mil de ellos resultaron en defunciones (WHO, 2022; Garcia, 2010).

1.1.1. Ciclo de Vida de *Plasmodium falciparum*

La malaria cuenta con dos fases en su ciclo de vida. La primera se lleva a cabo dentro de su vector *Anopheles* spp, (mosquito). En esta se presentará el ciclo esporogónico en donde el parásito de la malaria madura y se vuelve infeccioso. En la segunda fase presentada en su hospedador (el humano) cuenta con el ciclo exo-eritrocítico, en donde el esporozoíto, inyectado por el mosquito, entra al hígado e infecta sus células para su reproducción, ruptura y liberación con destino al sistema sanguíneo; y cuenta con el ciclo eritrocítico en donde el esquizonte liberado entra al eritrocito y se reproduce de manera sexual y asexual. El ciclo se repite una vez un mosquito hembra se alimenta de un hospedador parasitado e ingeste su estadio sexual (CDC, 2020).

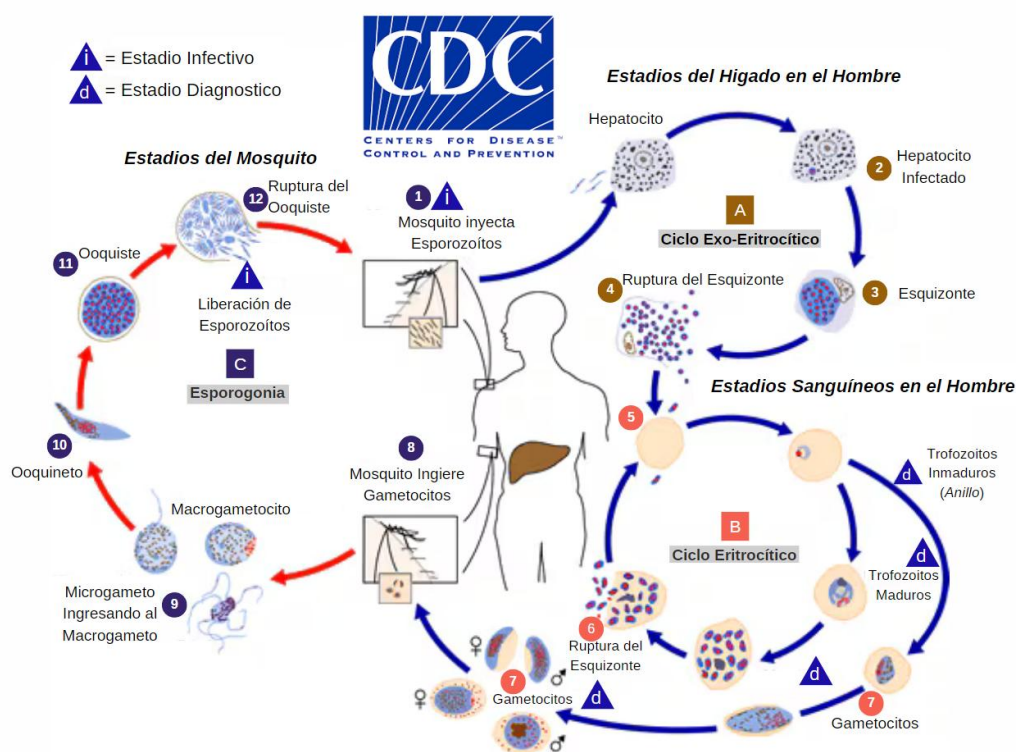


Figura 1. Ciclo de Vida de *Plasmodium* spp. El esquema A. muestra el ciclo exo-eritrocítico que se lleva a cabo en el hígado, luego del hospedador ser infectado por un mosquito, donde el parásito infecta

las células del hospedador para su reproducción, hasta su ruptura y liberación del estadio de esquizonte. En el *esquema B*, muestra el ciclo eritrocítico, llevado a cabo en la sangre del hospedador, donde este sigue su infección por reproducción sexual o asexual. El *esquema C*, muestra el ciclo esporogónico donde el mosquito (vector), por medio de picadura, toma al parásito donde este pasa de ser un parásito sin la capacidad de infectar a ser infectivo (CDC, 2020).

1.1.1.1. Ciclo Exo-eritrocítico

Como se muestra en el ciclo de vida de *Plasmodium* spp, (Figura 1) el ciclo exo-eritrocítico, también conocido como fase de tejido, inicia una vez el esporozoíto es inyectado al hospedador. Dentro del vector infectado el esporozoíto se dirige a las glándulas salivares del mismo. Es aquí donde el mosquito produce un anticoagulante que utiliza al momento de alimentarse de sangre. Es por este medio que el esporozoíto utiliza como transporte el anticoagulante para entrar al hospedador mientras que el vector se alimenta. Según Renu Tuteja en su investigación "Malaria", al esporozoíto ser inyectado, este se mantiene en la misma ubicación por un par de horas antes de su movimiento (Tuteja, 2007; Autino et al., 2012).

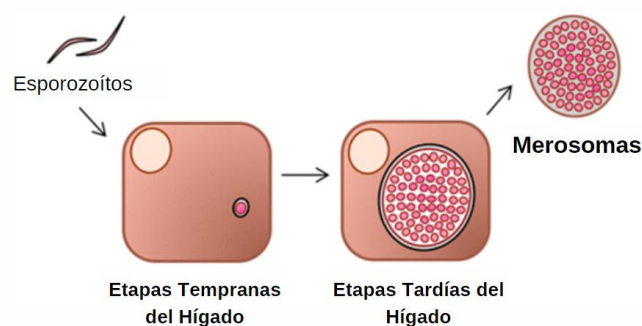


Figura 2. Ciclo Exo-eritrocítico del parásito de la Malaria. Se observa el esporozoíto entrando a la célula hepática donde se reproducirá asexualmente. La célula hepática en su estadio tardío libera los merozoides, que contienen merozoítos, permitiendo su fácil y seguro movimiento hacia el torrente sanguíneo (Shears et al, 2019).

Una vez en el sistema del hospedador, el esporozoíto se dirige al hígado donde penetrará las células hepáticas del mismo (Figura 2). Dentro de estas células se dará inicio a su reproducción asexual de replicación, estadio también conocido como esquizonte. Esta reproducción del parásito podría durar entre 9 a 16 días, sin embargo, el hospedador no presentará ningún tipo de sintomatología en este momento (Tuteja, 2007; CDC, 2020).

Cada esquizonte podrá reproducir entre 8 a 24 merozoítos, los cuales serán liberados al torrente sanguíneo una vez fuera de las células hepáticas. Para poder facilitar el movimiento de dicho estadio al torrente, la célula hepática libera una vesícula conocida como merosoma. Este funciona como una especie de protección y transporte para los merozoítos. Al entrar al torrente sanguíneo los merozoítos son liberados para comenzar a infectar los eritrocitos, dando inicio al ciclo eritrocítico (Tuteja, 2007; CDC, 2020; Shears et al., 2019).

Cabe resaltar que esta fase de tejido o ciclo exo-eritrocítico puede variar entre las especies de *Plasmodium*. Esta fase en *P. ovale* puede tomar de 9 a 17 días, en *P. malariae* de 15 a 30 días, *P. vivax* de 8 a 27 días, mientras que en *P. falciparum* puede tomar de 8 a 25 días (Tuteja, 2007).

1.1.1.2. Ciclo Eritrocítico

El ciclo eritrocítico, conocido de esta manera por llevarse a cabo en los eritrocitos del hospedador, da inicio una vez los merozoítos son liberados al torrente sanguíneo. Es aquí donde se inicia una secuencia de etapas que contribuirán a la invasión del eritrocito.

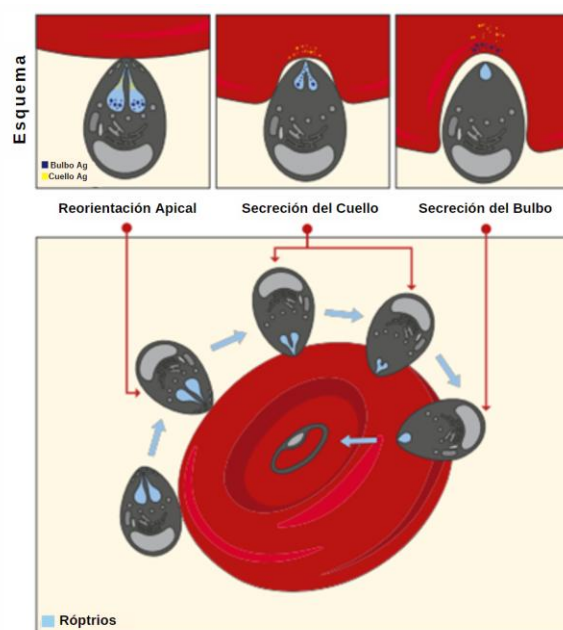


Figura 3. Invasión del Eritrocito por el Merozoíto. El merozoíto inicia su reconocimiento de la membrana del eritrocito (unión reversible). Al reconocerlo este se reorienta posicionando su extremo apical hacia dicha membrana para librar sustancias de los micronemas y orgánulos róptrios que facilitarían su ingreso (unión irreversible), lo cual lleva a la formación de la vacuola parasitófora. Al posicionarse comienza la unión de del merozoíto con la membrana del eritrocito. Este último comienza una invaginación alrededor del merozoíto, mientras este comienza la eliminación de su cubierta superficial. Una vez dentro se sella la vacuola parasitófora y la membrana del eritrocito, y este comienza su reproducción asexual (Liffner et al., 2021).

El merozoíto inicia su invasión por medio del reconocimiento inicial de la membrana del eritrocito (Figura 3). A este punto, dicha unión puede ser reversible. Una vez reconocida, el merozoíto inicia su rotación hasta que su extremo apical se encuentre directamente posicionado hacia la membrana de la célula huésped. Una vez en esta posición no será posible que la unión sea reversible (Chitnis, 2001; Miller et al., 2002).

Dentro del complejo apical del merozoíto se encuentran dos organelos que ayudarán a la penetración del eritrocito: El orgánulo roptrio, compuesto por dos róptrios y entre estos el micronema. Al merozoíto estar posicionado frente a la membrana de la célula huésped, dentro

de su zona apical, los róptrios empiezan a asistir a su unión a la membrana del eritrocito. No se conoce con certeza cómo funciona su unión, pero se cree que estos podrían estar usando los receptores snap, también conocidos como SNAREs. Estos son marcadores que se encargan de identificar una membrana celular e interactuar con ella para su fusión. A su vez, los róptrios, comienzan a darle una forma de cuello de botella al merozoíto para su fácil unión (Liffner et al., 2021).

El micronema, a su vez, secuestra los receptores de la membrana del eritrocito y los libera en altas concentraciones en el extremo apical estimulando la célula huésped el ingreso del merozoíto. Esta estimulación atribuye a la formación de una invaginación del eritrocito, conocido como la vacuola parasitófora. Es durante la inserción a la célula que el merozoíto remueve su capa superficial y, una vez dentro, se libera la vacuola parasitófora y la membrana del eritrocito para sellar los espacios de ingreso. Es de esta manera en que se inicia la reproducción asexual del *Plasmodium* spp, (Tuteja, 2007).

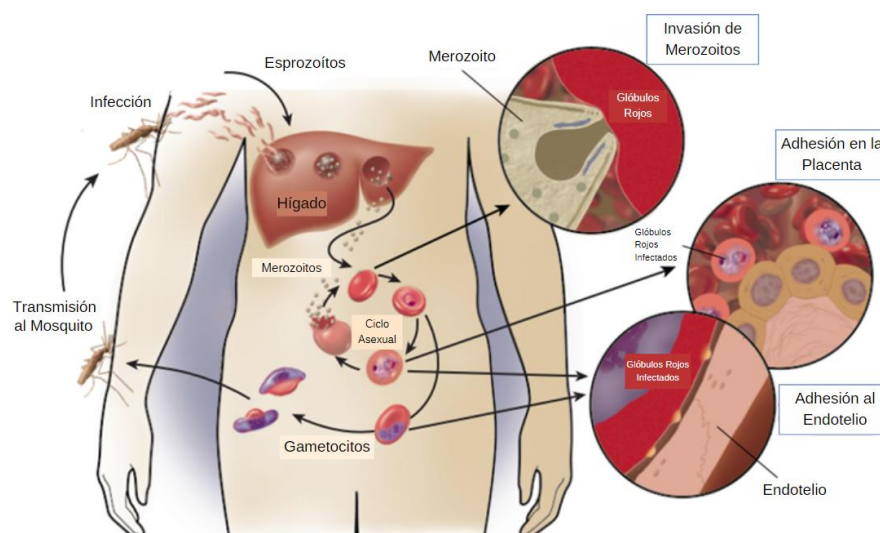


Figura 4. Ciclo Eritrocítico de *Plasmodium* Spp, enfocada en el Ciclo Eritrocítico. Se puede observar la liberación del merozoíto del hígado al torrente sanguíneo, la invasión del eritrocito y, una vez dentro

de la célula, su ciclo asexual. Este inicia como anillo, pasa a ser un trofozoíto, que luego será un esquizonte que por último liberará merozoítos, comenzando nuevamente su ciclo o madurando a gametocitos para seguir con su ciclo de vida (Miller et al., 2002).

En la célula huésped, el parásito inicia su primera etapa en su ciclo asexual el trofozoíto temprano, conocido como "anillo" por su morfología. A través de su desarrollo a un trofozoíto maduro, este es acompañado por un alto metabolismo que incluye glucólisis de altas cantidades de glucosa, ingesta de citoplasma de la célula huésped y proteólisis de la hemoglobina (Miller et al., 2002; Tuteja, 2007).

Una característica que presenta *Plasmodium* spp, es que este no cuenta con la capacidad de degradar el subproducto hemo, generado por la proteólisis de la hemoglobina durante su desarrollo, debido a este ser tóxico para él. Es de esta manera en que, durante el proceso de degradación de la hemoglobina, este polimeriza el subproducto dando como resultado la hemozoína (pigmento palúdico), sustancia almacenada en la vacuola alimentaria (Guzmán et al., 1994).

Por último, al completar su desarrollo, el trofozoíto lleva a cabo una división nuclear iniciando su última etapa conocida como "esquizonte". Es en esta división que se forman los merozoítos encontrados dentro del esquizonte. Una vez maduros, la célula se rompe y una parte de los merozoítos será liberada al torrente sanguíneo para infectar glóbulos rojos no infectados y otra parte se diferenciará en microgametocito (macho) o macrogametocito (hembra) para seguir el ciclo en su vector. Dicho ciclo de infección podría tomar 48 horas, sin embargo, la aparición de los gametocitos puede demorar de 10 a 12 días (Miller et al., 2002).

Es necesario mencionar que, en el estadio de anillo, la célula podrá seguir suspendida en el torrente sanguíneo. Sin embargo, al iniciar su estadio de trofozoíto y esquizonte este se adhiere

al endotelio o en la placenta, en casos de embarazo, como se ve reflejado en el ciclo de vida de *Plasmodium* spp, (Figura 4). Esto se debe a que el parásito se asegura que, a lo largo de su desarrollo, la célula huésped no se vea mayormente afectada por agentes exteriores debido a la fragilidad durante este tiempo (Miller et al., 2002).

1.1.1.3. Ciclo Esporogónico

El ciclo esporogónico, también conocido como ciclo sexual por la fase en que se encuentra el parásito, da inicio una vez el vector (el mosquito *Anopheles*) se alimenta de un huésped parasitado, como se muestra en la Figura 5.

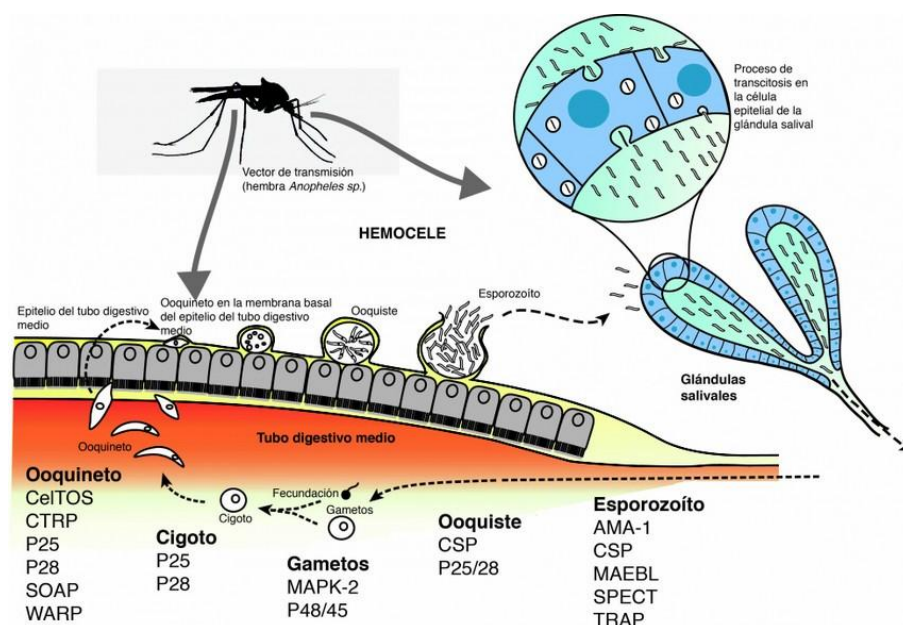


Figura 5. Ciclo Esporogónico de la Malaria. El mosquito *Anopheles*, al alimentarse del huésped infectado, ingiere el gametocito de *Plasmodium* spp, los cuales llegan al intestino del vector. En el intestino es pasa por una serie de cambios morfológicos para luego, los gametos, fusionarse entre sí y formar un cigoto, que luego se transformara en un oocineto. Este último produce los esporozoítos que migraran a las células salivares para su inserción a un nuevo huésped (Spencer et al., 2016).

Los microgametocitos y macrogametocitos ingresan al *Anopheles* hembra, por medio del esófago, hasta llegar al intestino medio donde inician su ciclo de vida sexual. Es luego de esta ingesta en que los gametocitos inician la formación de gametos por medio de gametogénesis. Dicha fertilización permitirá la formación de un cigoto, el cual ejecutará una meiosis para llevar a cabo una recombinación genética y un cambio morfológico. Este cambio morfológico permite la diferenciación de un cigoto, que presenta una forma redonda, a un ooquinetto que presenta una forma elongada (Aly et al., 2009).

El ooquinetto cuenta con una serie de orgánulos secretores conocidos como micronemas. Estos orgánulos están directamente involucrados en la motilidad del parásito. Este permite su movimiento a través de capa de matriz peritrófica, capa que encapsula la sangre ingerida, y el epitelio del intestino medio del mosquito para poder llegar al lado basal del epitelio. Este recorrido es conocido como recorrido celular, fenómeno llamado de esta manera por su semejanza con los esporozoítos a través de los hepatocitos del huésped parasitado. El ooquinetto inicia su movimiento a través de las células epiteliales del vector hasta llegar al lado basal del epitelio, donde se adhieren a la pared del intestino. Esto finaliza su migración e inicia su formación como un ooquiste. Dicho estadio luego se desarrolla en los esporozoítos, los cuales migraran a las glándulas salivares del vector, cerrando de esta manera el ciclo de vida de *Plasmodium falciparum* (Aly et al., 2009).

1.1.2. Síntomas

Al verse afectado el individuo, luego de la picadura del mosquito *Anopheles*, este inicia su periodo de incubación que puede tomar de 7 a 30 días dependiendo de la especie de parásito que

es inyectado. Por lo general el periodo de incubación de *P. falciparum* es menor al periodo de incubación de *P. malariae*, el cual tiende a ser mucho más largo (CDC, 2022).

Según la CDC, los síntomas se pueden ver separados en 3 etapas diferentes, que pueden durar entre 6 a 10 horas. No obstante, existe la posibilidad del individuo infectado presentar una combinación de los síntomas que se mencionaran a continuación (CDC, 2022).

- **Etapá Fría.** Esta etapa puede durar entre 15 a 60 min y se caracteriza por ser una etapa donde el individuo sentirá frío. Es en esta etapa en que presentará síntomas de escalofríos y de baja temperatura (Crutcher et al., 1996; CDC, 2022).
- **Etapá caliente.** La siguiente etapa que presenta puede durar entre 2 a 6 horas y se caracteriza por el individuo presentar una fiebre que puede llegar a 41 °C. En esta etapa el individuo infectado podrá presentar, además de fiebre, dolores de cabeza, vómito y en ciertos casos presentará piel seca. En el caso de los niños podrían hasta presentar convulsiones (Crutcher et al., 1996; CDC, 2022).
- **Etapá de Sudoración.** Esta es la tercera y última etapa que puede durar de 2 a 4 horas. Esta se caracteriza por la fiebre bajar de manera abrupta, lo que ocasiona que el individuo comience a sudar. Es normal que a esta altura el individuo infectado también presente cansancio (Crutcher et al., 1996; CDC, 2022).

Este ciclo de etapas es conocido como "Fiebre Malarial". Se conoce de esta manera por el crecimiento del esquizonte en el individuo infectado, sin embargo, puede variar su periodo dependiendo de la especie que infecte. En otras palabras, *P. vivax* y *P. ovale* son conocidos por

presentar una fiebre terciana o "malaria terciana", ya que su esquizonte madura cada 48 horas. En cambio *P. malariae* presenta una fiebre cuartana o "malaria cuartana" por su esquizonte madurar a las 72 horas, mientras que *P. falciparum* debería presentarlo cada 48 horas, pero su ciclo tiende a ser irregular. Es necesario mencionar que en ausencia de este ciclo no descarta la presencia del *Plasmodium* en el individuo (Crutcher et al., 1996).

De la infección persistir esta puede transformarse en malaria severa. Esto es indicativo de que la infección ha ocasionado complicaciones en los órganos del individuo como también en su metabolismo. Según la CDC, algunos de estos síntomas podrían ser (CDC, 2022):

- **Malaria Cerebral.** Complicación que ocasiona convulsiones, epilepsia, pérdida de su sistema cognitivo y afectaciones neurológicas. En el peor de los casos, el paciente podría quedar en coma (Idro et al., 2010).
- **Anemia.** Ocasionada por la constante hemólisis, dirigida por la reproducción del parásito. En el caso de los individuos infectados por *Plasmodium falciparum*, este puede llegar a ocasionar en ellos anemia severa en ellos (CDC, 2022).
- **Hemoglobinuria.** Hemoglobina en la orina, también ocasionada por la hemólisis preexistente provocada por el parásito. Sin embargo, también se puede ver generada por anemia y la insuficiencia renal, síntomas ocasionados por la enfermedad (Ajetunmobi et al., 2012).
- **Síndrome de Dificultad Respiratoria Aguda (SDRA).** Este síntoma es ocasionado por la alta afectación de los pulmones donde se presenta una inflamación pulmonar y desarrolla una degradación de la membrana capilares alveolares, membrana que permite el traspaso

de gases entre el alveolo y el capilar pulmonar. Debido a esta afectación se da la infiltración de microhemorragias, leucocitos y edema vasogénico en los pulmones (Vandermosten, et al., 2018)

- **Coagulopatía.** Esto se refiere a la anormalidad en la coagulación de la sangre. La coagulación intravascular diseminada (CID) mejor describe este síntoma. En otras palabras, debido de la hemostasis estar fuera de control el individuo comienza a coagular la sangre más de lo normal, lo que ocasiona isquemia, o simplemente no coagula la sangre lo que facilita su desangrado de cortarse (Angchaisuksiri, 2014).
- **Hipotensión.** Esto indica que el individuo presenta baja presión arterial, provocado por el colapso cardiovascular (CDC, 2022).
- **Afectación aguda del hígado.** Este síntoma severo presente en individuos infectados con la enfermedad se debe a la reinfección del mismo. Estas complicaciones podrían provocar disfunción hepática, lesiones renales, hepatomegalia, etc. (Silva et al., 2017).
- **Hiperparasitemia.** Se considera una hiperparasitemia si el individuo infectado, presenta más del 5% de los glóbulos rojos infectados (CDC, 2022).
- **Acidosis metabólica.** Consiste en el individuo infectado no cuenta con la capacidad de eliminar correctamente las sustancias tóxicas del cuerpo, por medio de los riñones, por lo que ocasiona la alta cantidad de líquidos ácidos corporales. Esto a su vez, está acompañado por vómitos, diarreas, etc. (Burger & Schaller, 2023).

1.1.3. Tratamientos

En la actualidad, la CDC ha probado una serie de tratamientos para contrarrestar el parásito de la malaria. Dependiendo de la evaluación médica de cada individuo, el tratamiento puede variar. Para aquellos individuos que presenten un paludismo no complicado se puede

utilizar los siguientes tipos de tratamientos: El tratamiento a base de arteméter-lumefantrina, que es considerada un tratamiento de fácil acceso y de amplio uso incluyendo a pacientes pediátricos; el tratamiento de sulfato de quinina que puede ser administrado de vía oral, ya sea solo o con otros medicamentos, y debe ser tomado por un periodo de 5 a 7 días. Por último, el tratamiento a base de mefloquina el cual debe ser ingerido por sí solo y mayormente utilizado para casos especiales como lo son las reacciones neuropsiquiátricas (CDC, 2024).

Para los casos más graves y avanzados contamos con el tratamiento de artesunato intravenoso. Este debe ser aplicado inmediatamente de manera intravenosa al paciente presente alguno de los siguientes síntomas: inconsciencia, estado de coma, shock, baja hemoglobina, problemas de dificultad respiratoria lesiones renales, etc. Si bien es cierto, este tratamiento deber ser aplicado de manera inmediata, sin embargo, muchas veces solo se encontrarán disponible de manera oral. El tratamiento puede ser iniciado oralmente si el paciente puede sostener el medicamento, pero una vez esté disponible el tratamiento por intravenosa este debe ser aplicado (CDC, 2024).

Por último, las mujeres embarazadas pueden seguir el mismo tratamiento que el resto de los pacientes. Para los casos severos deben ser tratadas de inmediato con artesunato intravenoso. Mientras que para aquellos casos que no sean severos pueden utilizar arteméter-lumefantrina, mefloquina o sulfato de quinina, pero deben seguir su tratamiento completo de 7 días sin falta. De otra manera el parásito podría crear una resistencia ante el antipalúdico (CDC, 2024).

1.1.3.1. Resistencia a los Tratamientos y Nuevas Investigaciones

En recientes hallazgos, el parásito de la malaria, ha comenzado a presentar no solo resistencia ante medicamentos, sino también su vector presenta resistencia ante insecticidas. En

vista de la creciente problemática, la comunidad científica ha considerado la búsqueda de antipalúdicos a base de los productos naturales por su eficacia, seguridad, menor costo y viabilidad; igualmente contemplando que los productos antimaláricos más eficientes (cloroquina y artemisinina) fueron obtenidos de productos naturales (Uzor et al., 2020).

Se ha reportado que el resurgimiento de la malaria por parte *P. falciparum* y la resistencia ante los antipalúdicos se debe a la interacción que presenta en relación con las comunidades humanas, vectores infectados y el ecosistema. Es decir, el movimiento poblacional facilita la propagación de vectores. A esto se le suma el cambio climático que, en presencia de humedad y los cambios en la temperatura, incide directamente en la facilitación del crecimiento del vector reduciendo la mortalidad de los insectos y aumentando la propagación de la malaria. Dicho esto, investigadores han evaluado una serie de productos naturales con la capacidad de contrarrestar al parásito *P. falciparum* incluyendo plantas y hongos de distintas especies, catalogándolas en base a su extracción, su capacidad antiplasmodial y toxicidad, e información adicional de investigaciones realizadas utilizando dichos agentes naturales, esto con el fin de facilitar la búsqueda de nuevos compuestos antimaláricos (Grazia et al., 2020).

Ante la evaluación de productos naturales, una de las clases más eficientes en presencia de resistencia malarial, se encuentran los policétidos. Según recientes investigaciones, se observaron por tres décadas la capacidad metabólica y actividad biológica de dichos hongos. Fue durante los años 2007 al 2016 en que se registraron una amplia gama de metabolitos secundarios, aislados de productos provenientes del hongo, determinando que dichos metabolitos presentaban una actividad antimicrobial ante diversos organismos (Hussain et al., 2017). Estos estudios propulsaron a futuras investigaciones donde, en el año 2019, se presenta el "Policétidos Fúngicos: Diversidad Química y sus Efectos Citotóxicos" describiendo la

citotoxicidad de distintos tipos de metabolitos secundarios aislados de los policétidos (quinonas, xantonas, versixantonas, perilenquinonas, chaetoglobosinas, citocalasanos, benzofuranonas y c-lactonas) y la capacidad antimicrobial que estos pueden presentar (citotóxica, antibacterial, antifúngica, antiparasítica e inmunosupresora) (Hussain et al., 2019).

Simultáneamente se realizaron estudios a base de metabolitos secundarios obtenidos de los policétidos, las lactonas de ácido resorcílico. En esta investigación se logró extraer, del hongo *Cochliobolus lunatus*, 3 nuevos grupos de Lactonas de ácido resorcílico de 14 miembros (RAL14, por sus siglas en inglés). Dichos metabolitos presentaron una nueva capacidad de actuar como *antifouling* o antiincrustante (evita el crecimiento de organismos subacuáticos, y facilita su desprendimiento en superficies sumergidas), actividad detectada por primera vez en esta especie, como también actividades antibacteriales y citotóxicas (Shao et al., 2011).

Siguiendo la caracterización de estos nuevos 3 compuestos, se realiza una esquematización estructural, como también una evaluación antiparasitaria y citotóxica de lactonas de ácido resorcílico obtenidas (grupo de policétidos 1-6) y los derivados semisintetizados de estas (grupo de derivados 11-27); con el fin de evaluar su actividad *in vitro* ante los parásitos de *P. falciparum*, *Leishmania donovani* y *Trypanosoma cruzi*. Dicha investigación da como resultado que el derivado 11, también conocido como SHAO OUC-ZXQ-03, presenta resultados prometedores, en donde el IC₅₀ fue de 1.84 μ M (Zhang et al., 2017), indicando una alta actividad antiplasmodica. La más alta dentro de los compuestos probados.

Como se plantea en la "Evaluación de las Actividades Antiplasmodiales y Antipalúdicas de Extractos de Semillas de Soja (*Glycine max*) en Cultivos de Parásitos de *P. falciparum* y Ratones Infectados con *P. berghei*" (Nyandwaro et al., 2020), es importante evaluar el compuesto de manera *in vitro* e *in vivo* para así observar la capacidad del compuesto no solo en

un cultivo sino su desarrollo en un organismo vivo. Este estudio determina la capacidad del producto natural obtenido de *Glycine max* dando resultados alta actividad antiplasmódica en cultivos de *P. falciparum* y ratones infectados con *P. Berghei*, parásito que solo infecta a ratones y ocasiona los mismos síntomas que su homólogo en humanos *P. falciparum* (Nyandwaro et al., 2020).

En el “Estudios de Farmacología de Seguridad para Productos Farmacéuticos Humanos S7a” donde se menciona lo necesario para llevar a cabo una prueba de seguridad *in vivo* bajo la presencia de un posible fármaco. Es decir, indicando de esta manera la forma más apropiada de manejar el estudio para observar los efectos que podría tener dicha sustancia en un organismo vivo y los efectos que se podrían encontrar (ICH, 2000).

1.2. Objetivos

1.2.1. Objetivo General

- Evaluar la actividad inhibitoria del compuesto SHAO OUC-ZXQ-03 en cultivos *in vitro* e *in vivo* de *Plasmodium falciparum*.

1.2.2. Objetivos Específicos

- Realizar cultivos *in vitro* de *Plasmodium falciparum*.
- Ejecutar ensayos de susceptibilidad con el compuesto SHAO OUC-ZXQ-03 en cultivo *in vitro* de *Plasmodium falciparum*.
- Evaluar los cambios biológicos en *Plasmodium falciparum* ante el compuesto SHAO OUC-ZXQ-03.
- Realizar pruebas seguridad del compuesto SHAO OUC-ZXQ-03 en ratones C57BL/6 .

1.3. Hipótesis

1.3.1. Hipótesis de Investigación

Hi. Se encuentra una variación de supervivencia al comparar diferentes muestras de *Plasmodium falciparum* con o sin la aplicación del compuesto SHAO OUC- ZXQ-03 sobre las muestras analizadas.

1.3.2. Hipótesis Cuantitativas

H0. No habrá cambio en la supervivencia del parásito *Plasmodium falciparum*, al aplicar el compuesto SHAO OUC-ZXQ-03 sobre las muestras analizadas.

Ha. Habrá una disminución en la supervivencia del parásito de la malaria, *Plasmodium falciparum*, al aplicar el compuesto SHAO OUC-ZXQ-03 sobre las muestras analizadas.

Capítulo II: Materiales y Métodos

2.1. Metodología

2.1.1. Cultivo *in vitro* de *Plasmodium falciparum*

Para preparar el cultivo, se siguió el protocolo de Métodos en la Investigación de la Malaria (Moll, et al., 2013) el cual consiste en descongelar las cepas del parásito *Plasmodium falciparum*, suplementado con sangre fresca 0+. Esta sangre pasó por tres lavados con medio de cultivo RPMI 1640 modificado. Esta modificación consistió en la adición de buffer 25 mM de HEPES, 25 mM bicarbonato de sodio, 25 μ L de sulfato de gentamicina y 10% del plasma humano (Schuster, 2002). Seguido, el cultivo fue incubado a 37 °C y se agregó una mezcla de gases de 5% de CO₂, 5% de O₂ y 90% de nitrógeno. Adicionalmente, una vez por semana, se agregó 2% de hematocrito al cultivo. Al alcanzarse el 1% de la parasitemia, se consideró que ya se mantenían en las condiciones aceptables para los siguientes ensayos (figura 6) (Pardave et al., 1997).

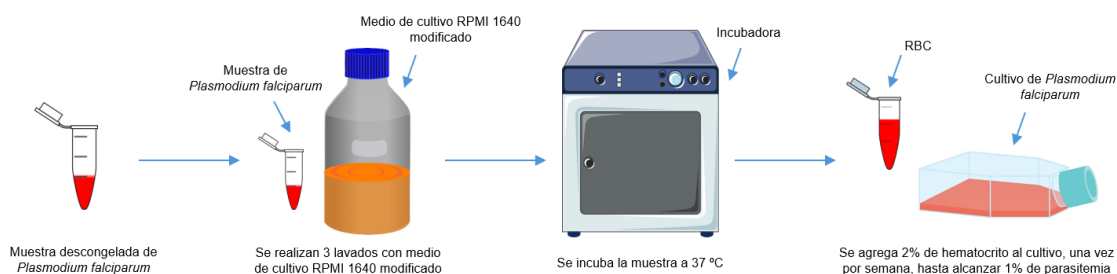


Figura 6. Cultivo *in vitro* de *Plasmodium falciparum*. Representación esquemática del cultivo donde se descongela la muestra del parásito, para luego ser lavado 3 veces con RPMI e incubado a 37 °C. Donde se revisa y se agrega 2% de hematocrito por semana hasta alcanzar un 1% de parasitemia.

2.1.2. Resuspensión del Compuesto SHAO OUC-ZXQ-03

Para llevar a cabo los siguientes ensayos se utilizaron muestras del compuesto SHAO OUC-ZXQ-03 liofilizadas, diluidas en DMSO. El IC₅₀ de dicho compuesto es de 1.84 μ M

(Zhang et al., 2017), sin embargo, para poder observar la inhibición completa de los parásitos se buscó utilizar el doble de este, redondeándolo a una concentración de 4 μM . Para llegar a esta concentración se diluyó 1 μg de la muestra liofilizada y se diluyó en 250 μL de DMSO y de esta se realizó una dilución seriada hasta llegar a los 4 μM en un plato de 96 pocillos. Tomando así, de la última dilución, 2.7 μL que fueron diluidos en el pocillo de 200 μL de muestra para que estuviese en una concentración de 4 μM como se muestra en la figura 7 (Shao et al., 2011).

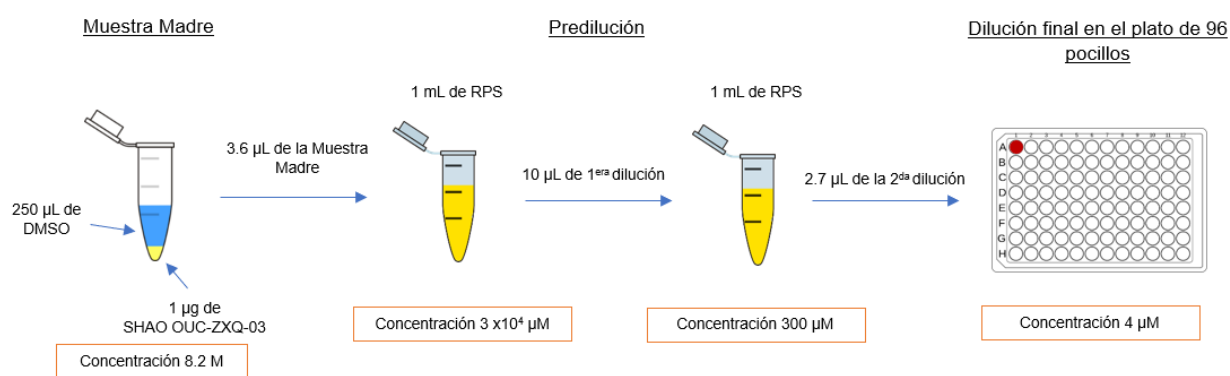


Figura 7. Resuspensión del Compuesto SHAO OUC-ZXQ-03. En esta figura se muestra las diluciones llevadas a cabo para poder diluir una muestra concentrada de 1 μg equivalente 8.2 M del compuesto SHAO OUC-ZXQ-03. Esta muestra madre liofilizada se diluyó en 250 μL de DMSO. De esta muestra madre se tomó 3.6 μL y se diluyó en 996.4 μL de RPS; para luego tomar de esta primera dilución 10 μL y diluirla en 990 μL de RPS. Por último, se tomó de la segunda dilución 2.7 μL para completar los 200 μL de muestra final, dando así una concentración final de 4 μM .

2.1.3. Incorporación de Yoduro de Propidio

Para observar la muerte celular de los eritrocitos, se utilizó la incorporación del yoduro de Propidio (IP), el cual ingresa por los daños ocasionados a la membrana celular y emitía fluorescencia (Coronado et al., 2021). Este ensayo se basó en agregar 200 μL de diversas muestras a un plato de 96 pocillos por triplicado. Las muestras incluían: 200 μL de eritrocitos infectados con *P. falciparum* (iRBC) al 2% de parasitemia sin la presencia del compuesto

(control negativo); 200 μ L de eritrocitos sin infectar (RBC), calentados a 80 $^{\circ}$ C por 20 min para ocasionar daños en la célula (control positivo); 200 μ L de iRBC calentados a 80 $^{\circ}$ C por 20 min; 200 μ L de iRBC con el compuesto; 200 μ L de RBC con el compuesto; y 200 μ L de RBC sin el compuesto, como se muestra en la figura 8 (Coronado et al., 2021).

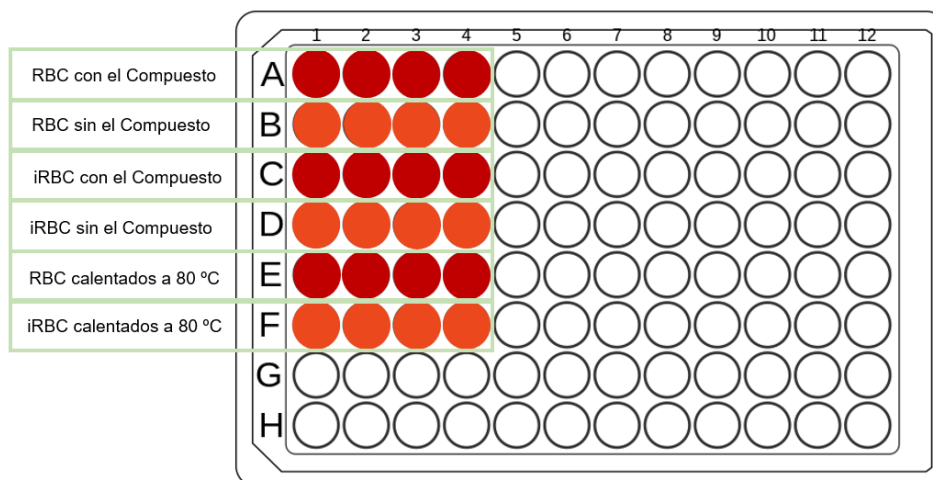


Figura 8. Esquema del Ensayo de Incorporación de Yoduro de Propidio. Esta figura presenta el posicionamiento de las muestras del ensayo de incorporación de yoduro de propidio. En la fila A se agregaron las muestras de RBC con el compuesto SHAO OUC-ZXQ-03. En la fila B se encuentran las muestras de RBC sin el compuesto. En la fila C se agregaron las muestras de iRBC por el parásito, con el compuesto SHAO OUC-ZXQ-03. En la fila D se encuentran las muestras de iRBC por el parásito, sin el compuesto. Por último, tenemos la fila E y F que cuentan con las muestras de RBC calentados a 80 $^{\circ}$ C e iRBC calentados a 80 $^{\circ}$ C, respectivamente.

Las muestras se incubaron a 37 $^{\circ}$ C durante 3 horas. Una vez culminada la incubación, se agregó 2 μ L del yoduro de propidio a cada muestra. Este se homogeneizó y se dejó reaccionar por 15 min a temperatura ambiente, en un lugar oscuro. Finalmente, el plato fue leído en un fluorómetro utilizando filtro de excitación de 485 nm y filtro de emisión de 645 nm. Una vez obtenido los

resultados se realizó un análisis estadístico mediante la prueba estadística T-Student, figura 9 (Torres-Mendoza et al., 2018).

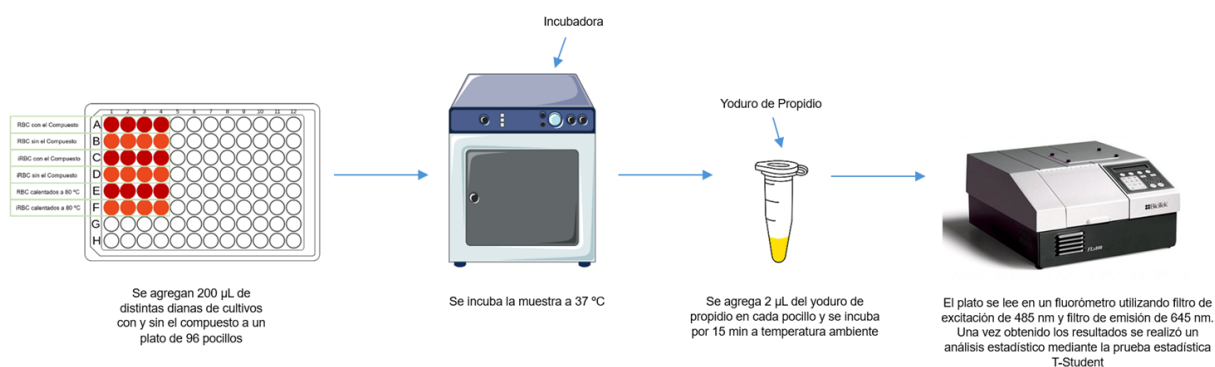


Figura 9. Esquema del Ensayo de Incorporación de Yoduro de Propidio. Esta figura presenta el posicionamiento de las muestras del ensayo de incorporación de yoduro de propidio. Una vez estas son posadas en el plato de 96 pocillos, estas son incubadas a 37 °C durante 3 horas. Una vez culminado este tiempo, se agrega 2 µL yoduro de propidio y se incuban por 15 min a temperatura ambiente. Este es luego leído por el fluorómetro utilizando filtros de excitación de 485 nm y una emisión de 645 nm. Los resultados fueron leídos bajo el T-Student.

2.1.4. Hemólisis

El ensayo de hemólisis permite observar la presencia de daños en las células. Para este fin se siguió el protocolo descrito por Coronado y colaboradores (Coronado et al., 2021), el cual consistió en utilizar un plato de 96 pocillos que contaban con 200 µL de las siguientes muestras, por triplicado: 200 µL de iRBC con el compuesto; 200 µL de iRBC sin el compuesto; el control negativo, 200 µL de RBC con el compuesto; 200 µL de RBC sin el compuesto; el control positivo, que contenía 20 µL de Tritón X-100 (compuesto químico que lisa las células) al 0.1% añadido en 200 µL de RPMI de RBC; y 20 µL de Tritón X-100 al 0.1% añadido en 200 µL de RPMI de iRBC (Figura 10).

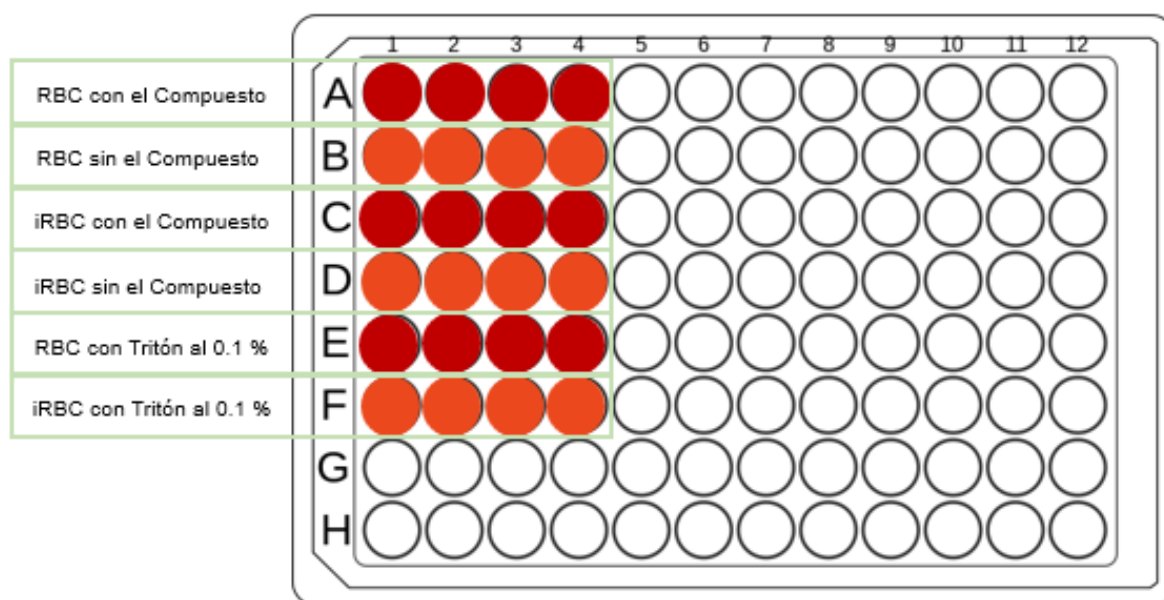


Figura 10. Ensayo de Hemólisis. En la fila A se agregaron las muestras de RBC con el compuesto SHAO OUC-ZXQ-03. En la fila B se encuentran las muestras de RBC sin infectar sin el compuesto. En la fila C se agregaron las muestras de iRBC con el compuesto SHAO OUC-ZXQ-03. En la fila D se encuentran las muestras de iRBC por el parásito, sin el compuesto. Por último, tenemos la fila E y F que cuentan con las muestras de RBC con Tritón al 0.1 % e iRBC con Tritón al 0.1 %, respectivamente.

Una vez preparados los pocillos, la placa se incubó a 37 °C durante 24 horas. Luego de esta incubación, se realizó una espectrofotometría para medir la absorbancia a 415 nm y analizar los datos. Una vez obtenido los resultados se realizó un análisis estadístico mediante la prueba Anova, figura 11 (Torres-Mendoza et al., 2018).

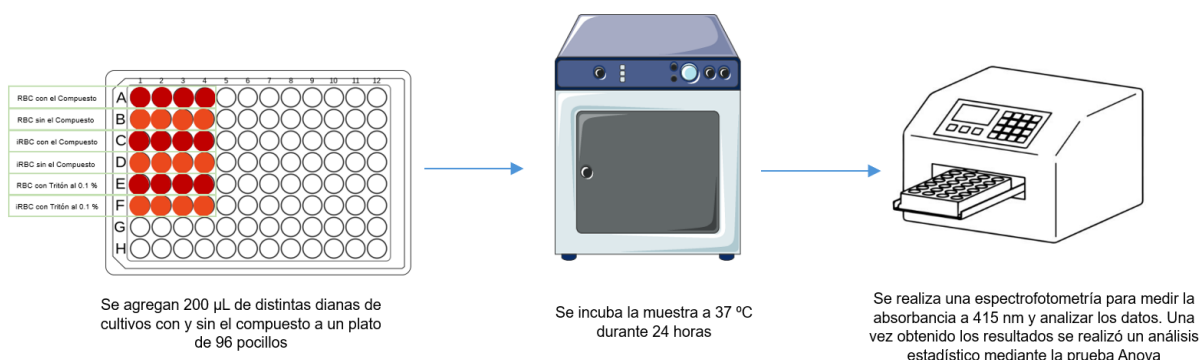


Figura 12. Ensayo de Potencial de Membrana. Esta figura presenta el posicionamiento de las muestras a las 3 y 6 horas del ensayo. En la fila A se agregaron las muestras de RBC sin teñir. En la fila B se agregaron las muestras de RBC sin el compuesto. En la fila C se agregaron las muestras de RBC sin infectar con el compuesto. En la fila D se agregaron las muestras de iRBC sin el compuesto. En la fila E se agregaron las muestras de iRBC con el compuesto. Por último, tenemos la fila F y G que cuentan con las muestras de RBC teñidos y con CCP, e iRBC teñidos y con CCP, respectivamente.

Una vez agregadas las muestras, se incubó el plato a 37 °C durante 20 min en la oscuridad; para luego ser teñidas con DiOC6, a excepción de las muestras que no requieren ser teñidas. Por último, se lavaron las muestras y se resuspendieron en 200 µL de PBS (solución salina tamponada con fosfato) para ser analizadas en un fluorómetro, utilizando un filtro de excitación de 485 nm y un filtro de emisión de 528 nm. Una vez obtenido los resultados se realizó un análisis estadístico mediante la prueba Anova, figura 13 (Coronado et al., 2021).

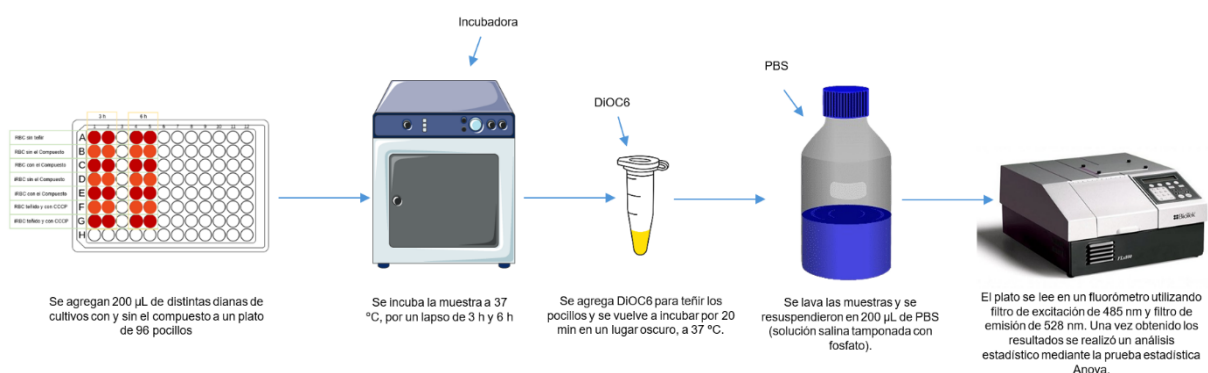


Figura 13. Esquema del Ensayo de Potencial de Membrana. Esta figura presenta el posicionamiento de las muestras del ensayo de hemolisis. Una vez estas son posadas en el plato de 96 pocillos, estas son incubadas a 37 °C durante 3 y 6 horas. Este luego es teñido utilizando el Kit de Thermo Fisher y se incubaba por 20 min a 37 °C, para luego ser lavado con PBS. Este es luego leído por el fluorómetro utilizando filtros de excitación de 485 nm y una emisión de 528nm. Los resultados fueron leídos bajo el Anova.

2.1.6. Microscopía de Campo Claro

Para observar los cambios morfológicos e inhibitorios, ocasionados por la presencia y ausencia del compuesto SHAO OUC-ZXQ-03 en cultivos de *Plasmodium falciparum*, se utilizó

el ensayo de microscopía óptica. Este consistió en agregar, en un plato de 96 pocillos, 200 μL de iRBC con el compuesto y 200 μL de iRBC sin el compuesto, 200 μL de RBC con el compuesto y 200 μL de RBC sin el compuesto. Para luego ser visualizado en el microscopio a 100x a las 0 h y 24 h. Visualizar figura 14 (WHO, 2010).

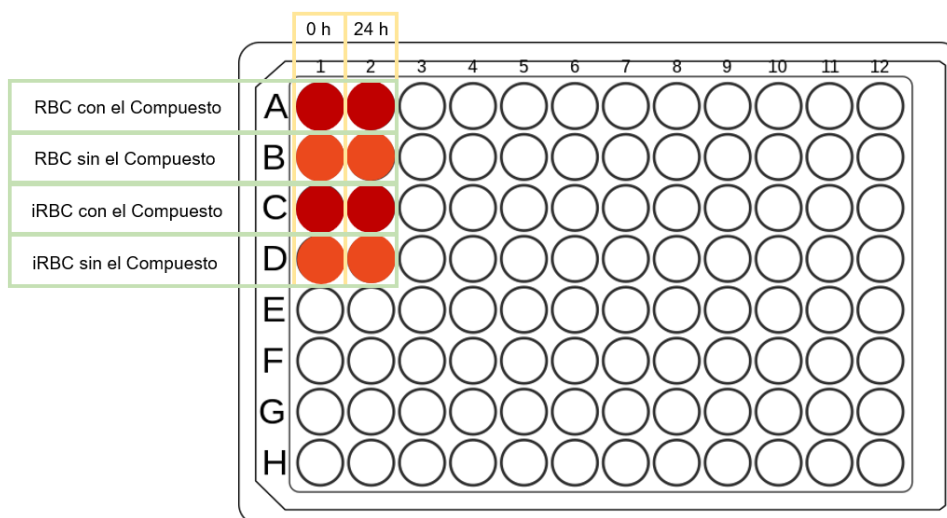


Figura 14. Ensayo de Microscopía óptica. Esta figura presenta el posicionamiento de las muestras a las 0 y 24 horas del ensayo. En la fila A se agregaron las muestras de RBC con el compuesto SHAO OUC-ZXQ-03. En la fila B se encuentran las muestras de RBC sin el compuesto. Por último, tenemos la fila C y D que cuentan con las muestras de iRBC con y sin compuesto, respectivamente.

Una vez agregadas, se obtuvo 10 μL de cada muestra para su observación bajo el microscopio a las 0 h. Para la tinción de esta alícuota, se siguió la metodología del “Microscopía Básica de Malaria” de la Organización Mundial de la Salud, como se muestra en la imagen 15. En donde, la sangre fue colocada en un portaobjeto y ser sumergida en metanol para luego dejarla secar. Una vez seca, se cubrió la superficie de la placa con Giemsa por lapso de 8 a 10 min, para luego ser lavada con agua y secada en una plancha. Por último, se colocó la placa en el microscopio donde se agregó aceite de inmersión para su visualización y conteo utilizando la formula:

$$\left(\frac{\text{Total de Anillos} + \text{Total de trofozoitos} + \text{Total de Esquizontes}}{\text{Total de eritrocitos}} \right) \times 100 = \% \text{ de Parasitemía del Cultivo}$$

Este proceso se repitió al culminar las 24 h de incubación de las muestras (WHO, 2010).

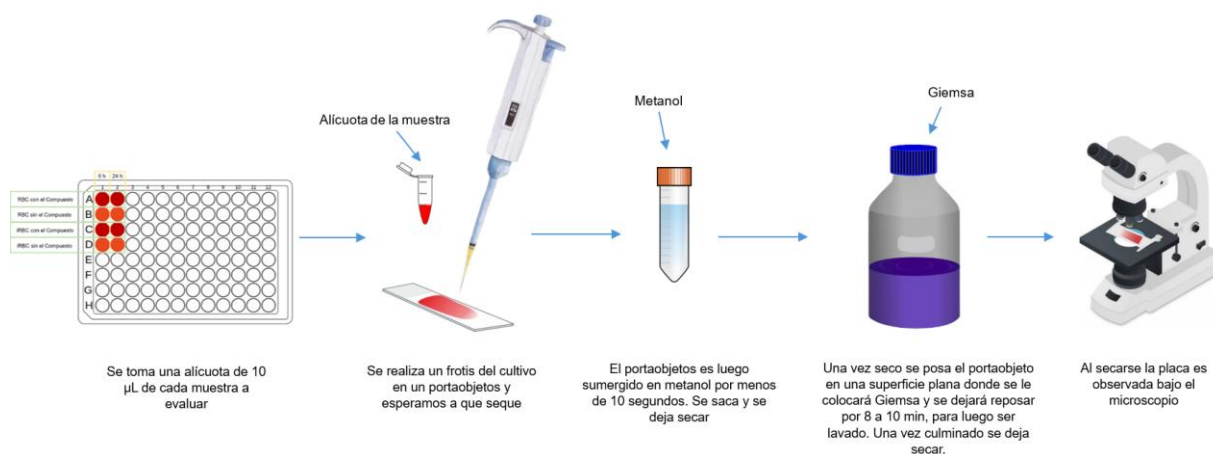


Figura 15. Tinción. Ensayo de Microscopía óptica. Se siguió la metodología del “Microscopía Básica de Malaria” de la Organización Mundial de la Salud. Donde se toma la muestra y se realiza un frotis en un portaobjeto. Este luego será sumergido en metanol para sellar la muestra y se le colocará Giemsa por unos 8 a 10 min para su tinción, para luego ser observado.

2.1.7. Prueba de Concentración Inhibitoria Media Máxima (IC50) en *P. falciparum*

Para obtener el IC50 del compuesto SHAO OUC-ZXQ-03 se agregó, en un plato de 96 pocillos como se muestra en la figura 16, iRBC y RBC con el compuesto, para su incubación a 37 °C por 48 horas.

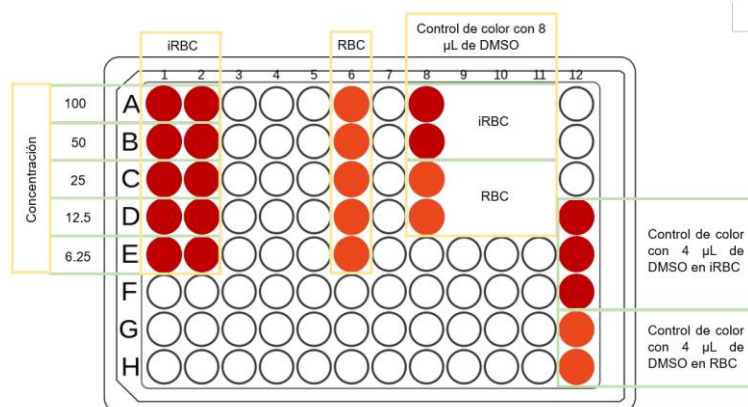


Figura 16. Prueba de Concentración Inhibitoria Media Máxima en *Plasmodium falciparum*. En la fila A, B, C, D, E y F de las columnas 1 y 2, podemos encontrar muestras de iRBC bajo distintas concentraciones del compuesto. Se observa lo mismo en la columna 6, sin embargo, este solo contiene RBC. En la fila A, B, C y D de la columna 8 encontramos los controles de color con 8 μ L de DMSO. A y B conteniendo iRBC, mientras que C y D contienen RBC. Por último, las filas D, E y F de la columna 12 contenían controles de color con 4 μ L de DMSO en iRBC, mientras que las filas G y H tenían color con 4 μ L de DMSO en RBC.

Una vez culminado el tiempo de incubación, se añadió a cada pocillo 35 μ L de un coctel que contenía agua destilada, Tritón, buffer TE y Pico Green (tinción); y se volvió a incubar a 37 °C por 30 minutos. El plato luego fue sacado de la incubadora, leído por un fluorómetro y los resultados fueron analizados mediante el "Data Análisis Wizard de Excel 2000", figura 17 (Coronado et al., 2021).

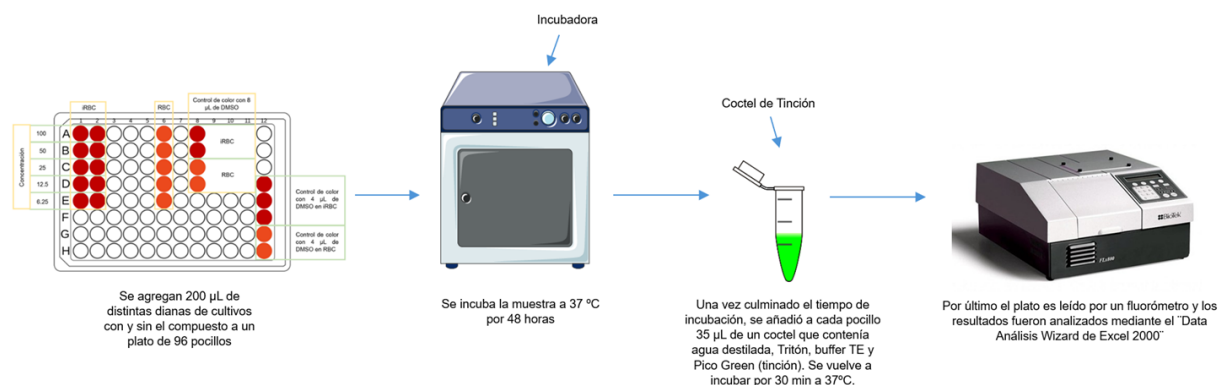


Figura 17. Esquema de la Prueba de Concentración Inhibitoria Media Máxima en *Plasmodium falciparum*. Esquema de la prueba de IC50, donde luego de colocar RBC y iRBC en el plato de 96 pocillos con distintas concentraciones del compuesto. Este es incubado por 48 horas a 37 °C, para luego ser teñido y nuevamente incubado por 30 min a 37 °C. Por último se lee el plato con un fluorómetro y los resultados fueron analizados mediante el "Data Análisis Wizard de Excel 2000".

2.1.8. Prueba *In Vivo* de Seguridad del Compuesto SHAO OUC-ZXQ-03

En cumplimiento con los principios de la bioética, se elaboró un protocolo para el estudio de seguridad del compuesto SHAO OUC-ZXQ-03 en ratones C57BL/6, con el fin de observar los efectos que este puede presentar en pruebas *in vivo*. Este protocolo fue presentado al CICUA

y recibió su aprobación bajo el código CICUA-21-003 antes de iniciar la metodología descrita a continuación.

Para la prueba de seguridad se utilizaron un total de 12 ratones C57BL/6 en donde se separaron siguiendo la metodología utilizada en "Evaluación de las Actividades Antiplasmodiales y Antipalúdicas de Extractos de Semillas de Soja (*Glycine max*) en Cultivos de Parásitos de *P. falciparum* y ratones Infectados con *P. berghei* " (Nyandwaro et al., 2020) con algunas modificaciones, donde se evaluó una dosis de 200 mg/Kg de peso. A seis de ellos se les agregó el compuesto que consistía en el compuesto diluido en DMSO y aceite de canola (tratamiento); mientras que los otros seis se les agregó el control que presentaba DMSO 1 % y aceite de canola (vehículo) siguiendo la formula:

$$\frac{\text{Peso del Raton} + 1 \text{ ml de inyectado}}{\text{Concentración}} = \text{volumen final del compuesto} .$$

Para restringir el movimiento del ratón se posicionó al animal sobre una superficie plana para poder sujetar su cuello, de manera firme. Una vez sujetado, se tomó la cola posicionándola entre los dedos, esto permitió tener un mejor agarre impidiendo así que el animal se lastime al momento de la administración del compuesto. Una vez restringido, se colocó boca arriba para inyectar el compuesto, en base al peso del ratón, de manera intraperitoneal (Machholz et al., 2012).

Del ratón presentar algún tipo de anomalía en su comportamiento como signos clínicos de distrés o enfermedad (temblores y/o parálisis y Sangramiento u orina descolorida), prontamente luego de la aplicación de la sustancia se le aplicó punto final humanitario por anestesia inhalatoria (isoflurano 100 %). El punto final humanitario se aplicó para evitar cualquier dolor o sufrimiento que se le pueda causar al ratón a raíz de este procedimiento (Turner et al., 2011).

La evaluación se realizó durante 10 días a todos los ratones involucrados en el ensayo (tratamiento y vehículo) y consistió en realizar: el pesaje de los animales todos los días; se anotaron todos los días el peso del alimento y el consumo de agua; se evaluaron signos clínicos todos los días: cambio del pelaje (erizamiento), color de las mucosas, presencia de diarrea, actividad motora: inquietud, respiración rápida, coma, hipertermia; y anotar cualquier otro signo que indique presencia de toxicidad (Derebe et al., 2021; AVMA, 2020).

A los animales que sobrevivieron pasados los 14 días se les aplicó punto final experimental. Los animales se anestesiaron usando anestesia inhalatoria (isoflurano 100 %) en envase de vidrio. Nos basamos en la metodología "Eutanasia en Ratones de Laboratorio: Muerte Rápida y Bienestar Animal" (Felizardo De Brito et al., 2020)., con algunas modificaciones, en donde se colocaron un algodón empapado con el anestésico en un tubo sin tapa, para evitar el contacto directo del anestésico con el animal dentro del envase. El algodón se dejó durante 5 a 10 minutos para que el envase se impregnase del anestésico y luego de este tiempo se colocaron los animales uno por uno en el envase de vidrio (Felizardo De Brito et al., 2020). Cuando el animal no presentaba ningún tipo de movimiento, se retiró del envase y se determinó si este presentaba con algún reflejo mediante pinchazo podal. En caso de que no existiera reflejo se procedía a abrir la cavidad torácica para realizar observación macroscópica de órganos (RARC, 2021).

El punto final humanitario, se aplicó en el caso de que los animales presentasen signos clínicos de distrés o enfermedad (Rápida pérdida de peso en pocos días 15 - 20 %), pérdida de pelo en áreas extensas de pelaje, diarreas prolongadas o lesiones que interfirieran en el comer adecuado, signos de temblores y/o parálisis y sangramiento u orina descolorida.), en cuyo caso el animal se sacrificó con exceso de anestésico inhalatorio (isoflurano 100 %) (AVMA, 2020).

Capítulo III: Resultados y Discusión

3.1. Resultados y Discusión de Resultados

3.1.1. Incorporación de Yoduro de Propidio

En el ensayo de incorporación de yoduro de propidio, se evaluó el daño en la membrana celular de eritrocitos midiendo la intensidad de fluorescencia (MFI) en distintas muestras. Como se observa en la figura 18, los iRBC con el compuesto (tratados) presentan un aumento mayor al porcentaje de fluorescencia en las muestras de RBC sin el compuesto (sin tratar). Estos resultados sugieren que el tratamiento causa un daño moderado en la membrana celular (Torres-Mendoza et al., 2018).

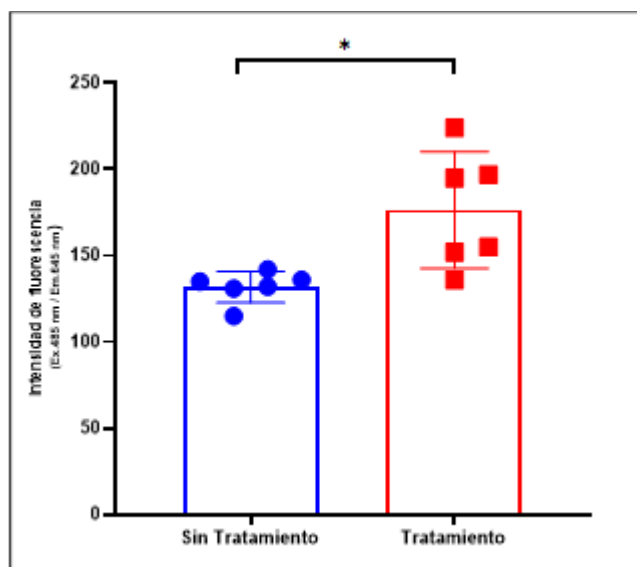


Figura 18. Ensayo de Incorporación de Yoduro de Propidio. Integridad de la membrana en muestras de tratamiento (iRBC con el compuesto) y las muestras sin el tratamiento (RBC sin el compuesto).

Como se hace mención en la investigación realizada por Maciel et al., (2008), en el ensayo hubo una actividad hemolítica en la muestra de tratados, indicando que el compuesto está actuando como disruptor ante la membrana del iRBC, más no en el RBC. Esto puede verse atribuido a

que los iRBC presentan cambios morfológicos inducidos por el parásito en la membrana de su hospedador (Hall et al., 1997; Torrez-Mendoza et al., 2018).

Esto se puede confirmar en la tabla 1, donde se realizó la prueba estadística T-Student, para confirmar que estos datos son significativos ante la presencia del compuesto. Donde nuestro T- Student dio 0.01 y el valor p, siendo considerado significativo debajo de un valor de 0.05, dio como resultando de 0.01. Indicando así que el compuesto está ocasionando un daño en la membrana (Coronado et al., 2021).

Tabla 1. Prueba T-Student. Ensayo de Incorporación de Yoduro de Propidio					
<i>Grupos</i>	<i>Valores</i>	<i>Promedio</i>	<i>Valor - P</i>	<i>Resumen de Valor P</i>	<i>Valor - P</i>
Sin Tratamiento	6	131.8	0.0108	*	Significativo
Tratamiento	6	176.5			

Nota: Factor significativo entre los grupos de tratamiento con los de sin tratamiento, en el ensayo de Incorporación de Yoduro de Propidio.

3.1.2. Hemólisis

En el ensayo de hemólisis, se evaluó el impacto del compuesto SHAO OUC-ZXQ-03 en la integridad de la membrana de eritrocitos. Estos resultados mostraron que los RBC sin el compuesto mantuvieron su integridad con un bajo porcentaje de hemólisis. Sin embargo, los iRBC con el compuesto presentaron un aumento en el porcentaje de hemólisis, aproximadamente el 20 %, indicando un efecto leve de hemólisis del compuesto sobre la membrana celular (ver figura 19).

Nota: Factor significativo entre los grupos de Sin Tratamiento, tratamiento y el control positivo, en el ensayo de Hemólisis.

3.1.3. Potencial de Membrana de la Mitocondria

En este ensayo se evaluó el efecto de un tratamiento específico sobre el potencial de membrana de eritrocitos en comparación con controles sin tratamiento (RBC sin compuesto) y con el disruptor de membrana mitocondrial CCCP como se muestra en la figura 20. Al evaluar el potencial de membrana a las 3 y 6 horas, los iRBC con el compuesto (tratamiento) mostraron un aumento en el potencial de membrana, superando el 100 % del control. Lo que indica una posible hiperpolarización de la membrana celular. Los eritrocitos sin tratamiento mantuvieron un nivel cercano al 100 % del control, mientras que los tratados con CCCP mostraron una reducción del potencial de membrana.

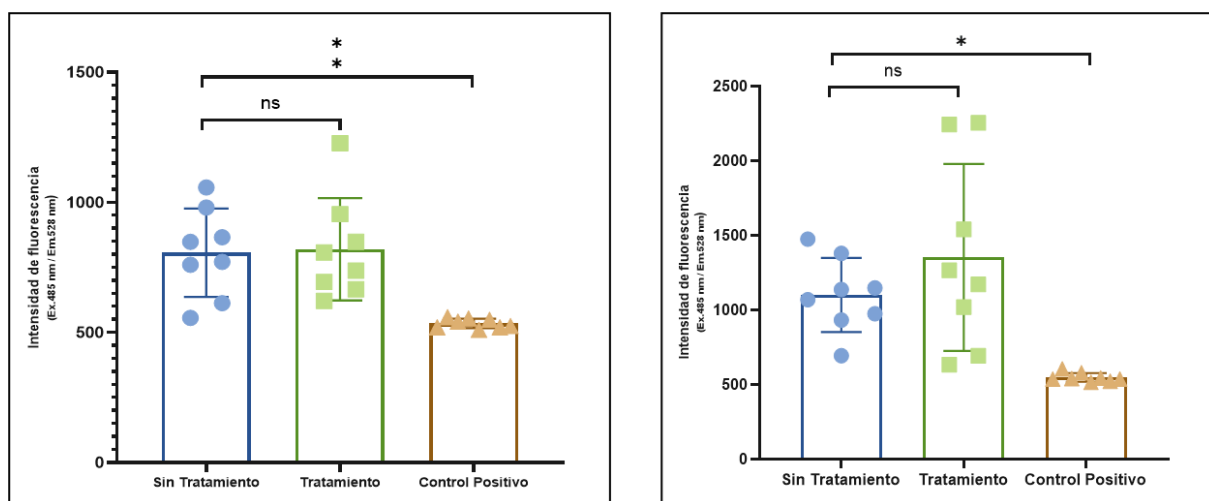


Figura 20. Ensayo de Potencial de Membrana. Cambios en el potencial de la membrana mitocondrial a las 3 h y 6 h con muestras de tratamiento (iRBC con el compuesto), muestras sin el tratamiento (RBC sin el compuesto) y el disruptor CCCP.

Como se menciona en la investigación realizada por Allen y Kirk (2004), los resultados sugieren que el tratamiento es efectivo en mantener o incluso hiperpolarizar el potencial de membrana mitocondrial de los parásitos en comparación con los controles negativos y positivos. Esto se confirma al observar el aumento del porcentaje de potencial de la membrana de las 3 horas a las 6 horas. Simultáneamente, en los datos obtenidos por el Anova (tabla 3) se indica que los resultados son significativos tomando en cuenta que el valor p era de 0.0014 a las 3 horas y 0.0016 a las 6 horas, en los 3 tipos de tratamientos antes mencionados. Estos hallazgos sugieren que el tratamiento aplicado tiene un efecto estabilizador o potenciador sobre el potencial de membrana de los eritrocitos, induciendo una hiperpolarización en la membrana.

Tabla 3. Anova. Ensayo de Potencial de Membrana a las 3 horas

<i>F</i>	<i>Valor - P</i>	<i>Resumen de Valor P</i>	<i>Valor - P</i>	<i>R cuadrado</i>
9.115	0.0014	**	Significativo	0.4647

Tabla 3. Anova. Ensayo de Potencial de Membrana a las 6 horas

<i>F</i>	<i>Valor - P</i>	<i>Resumen de Valor P</i>	<i>Valor - P</i>	<i>R cuadrado</i>
8.939	0.0016	**	Significativo	0.4598

Nota: Factor significativo entre los grupos de Sin Tratamiento, tratamiento y el control positivo, en el ensayo de potencial de Membrana a las 3 horas y a las 6 horas.

3.1.4. Microscopía de Campo Claro

Los resultados obtenidos del ensayo de microscopía indican que, a pesar de estar en presencia del compuesto SHAO OUC-ZXQ-03, la parasitemia del cultivo seguía en aumento sin presencia de inhibición.

Esto se puede observar luego de que, en los ensayos, aquellos que contaban con el compuesto y aquellos sin el compuesto, mantenían un crecimiento similar en parasitemia. Es decir, en el primer ensayo realizado con el compuesto en 200 μ L del iRBC, que se realizó con un 2% de hematocrito a las 0 horas, presentaba una parasitemia inicial de 2.11 %. Sin embargo, al pasar las 24 horas su parasitemia aumento con un porcentaje de 4.8 %. En cambio, el cultivo iRBC sin compuesto a las 0 horas contaba con una parasitemia de 2.43 % mientras que las 24 horas presentaba un porcentaje de 5.92 %.

Esto se pudo calcular al realizar un conteo visual de los glóbulos rojos parasitados con los estadios de *P. falciparum*. Cada una fue separada en estadios, siendo estos anillos, trofozoíto y esquizonte. La sumatoria de estos, dividido entre los glóbulos rojos no parasitados, daba como resultado el porcentaje de la parasitemia.

Esta misma tendencia se vio reflejada en el ensayo 2 y el ensayo 3. En el ensayo 2, los cultivos iRBC con compuesto, a las 0 horas presentaban una parasitemia de 2.74 %, mientras que a las 24 horas tenían una parasitemia de 7.76 %. En el caso del cultivo iRBC sin compuesto, este presentaba una parasitemia de 2.18 % a las 0 horas, mientras que una de 11.57 % a las 24 horas. En el ensayo 3, en el cultivo iRBC con el compuesto, se presentó una parasitemia de 2.29 % a las 0 horas y una de 8.23 % a las 24 horas. Mientras que, en el cultivo sin el compuesto, a las 0 horas presentaba una parasitemia de 2.71 % y a las 24 horas presentaba una parasitemia de 9.33 %. Indicando que, a pesar del iRBC estar en presencia del compuesto, este no presentó alguna señal de inhibición o alguna afectación en la célula como se muestra en la figura 21.

Cabe resaltar que aquellos ensayos que se realizaron con el compuesto y sin el compuesto en cultivos RBC, en las mismas condiciones que aquellos cultivos infectados (en un cultivo de 200

μL con un 2 % de hematocrito), presentaron una parasitemia de 0 % sin alguna afectación (figura 15).

Como indica Sachanonta et al. (2011), es necesario observar los cambios que se presentan en un cultivo a lo largo de los tratamientos aplicados con nuevos compuestos. En dicho ensayo se muestra que este compuesto ocasionaba una tenue afectación a la inhibición del parásito, sin embargo no lo esperado, por lo que se consideró su relación con la capacidad inhibitoria del compuesto (Zhang et al., 2017).

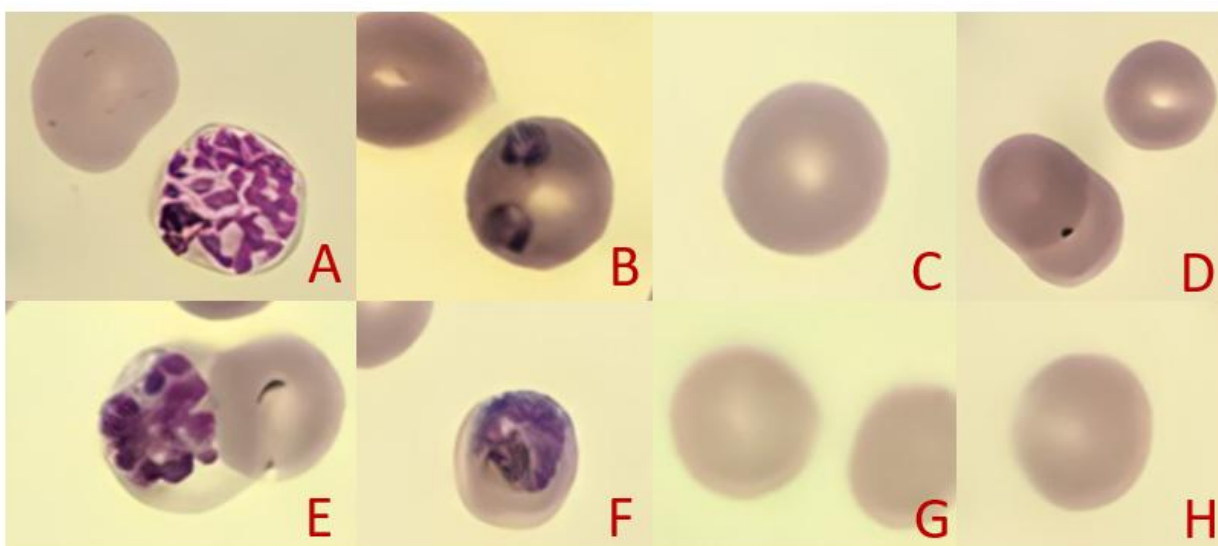


Figura 21. Ensayo de Microscopía de Campo Claro. En la figura A se puede observar iRBC sin el compuesto a las 0 h mientras que en la figura B esta la misma muestra a las 24 h. En cambio, en la figura E se encuentra la muestra de iRBC con el compuesto a las 0 h y en la figura F la misma muestra a las 24 h. Mientras en las figuras C, D, G y H presentamos las muestras de RBC a las 0 h, RBC a las 24h, RBC con el compuesto a las 0 h y RBC con el compuesto a las 24 h, respectivamente.

3.1.5. Prueba de Concentración Inhibitoria Media Máxima (IC_{50}) en *Plasmodium falciparum*

Basándonos en la investigación realizada por Zhang et al., (2017), inicialmente se contempló un IC_{50} de $1.84 \mu M$. De esta manera, se utilizó el doble del IC_{50} para todos los ensayos realizados. Sin embargo, luego de observar los resultados obtenidos, que indican poca inhibición por parte del compuesto, se realizó la prueba de concentración inhibitoria media máxima para validar que este mantenía dicho IC_{50} . No obstante, los resultados indican que el compuesto, hasta la fecha del último ensayo, presentaba un IC_{50} de $12.48 \mu M$ (figura 22).

Según las investigaciones llevadas a cabo por Matson et al., (2009), este cambio puede verse atribuido a diversos factores. Entre estos se menciona la vida útil del compuesto, este mencionaba que al resuspender un compuesto liofilizado, este puede perder parte de su capacidad inhibitoria, como sucedió en esta investigación. Sin embargo Pandey y su equipo mencionan que otra de las razones que este puede perder su actividad es debido al control de calidad que a este se realice al momento de obtener la muestra. En este caso el compuesto aun no cuenta con un control de calidad propio debido a que este es un compuesto aislado no un compuesto obtenido por compra (Pandey et al., 2023). El IC_{50} de $1.84 \mu M$, que inicialmente fue considerado como nuestra concentración inhibitoria media paso a ser de IC_{50} de $12.48 \mu M$. Dicho esto, en esta investigación se utilizó el doble, una concentración de $4 \mu M$, que aun así no llegaba a la IC_{50} actual. Mostrando de esta manera, la razón por la cual las pruebas antes realizadas indicaban que el compuesto no estaba inhibiendo el crecimiento del parásito.

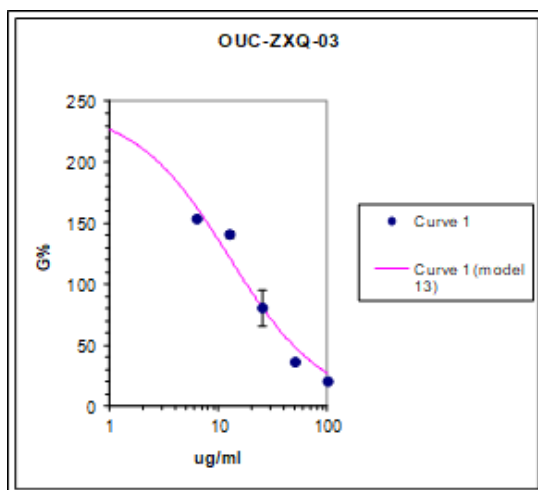


Figura 22. Prueba de Concentración inhibitoria media máxima en *Plasmodium falciparum*. En esta figura se puede observar que según las distintas concentraciones probadas (6.25, 12.5, 25, 50 y 100) el compuesto SHAO OUC-ZXQ-03 presenta un IC₅₀ de 12.48 μ M.

3.1.6. Prueba *In Vivo* de Seguridad del Compuesto SHAO OUC-ZXQ-03 en Ratones C57BL/6

La prueba *in vivo* del compuesto SHAO OUC-ZXQ-03 se llevó a cabo por medio de la aplicación de este a doce ratones C57BL/6, donde fueron divididos en 3 cajas para observar los efectos que el compuesto puede presentar en pruebas *in vivo*.

En la caja uno se contaba con cinco ratones C57BL/6 machos que fueron marcados de la siguiente manera: Oreja derecha cortada (ODC), Oreja Izquierda cortada (OIC), dos orejas cortadas (2OC), oreja derecha picada (ODP) y sin marca (SM). Todos con los ratones con la oreja cortada fueron aplicados el compuesto SHAO OUC-ZXQ-03, mientras que en el caso del ratón con la oreja picada y aquel sin marca no se les aplicó el compuesto sino nuestro blanco. En cambio, en la caja dos que contaba con 5 ratones, también marcados de la misma manera, fueron inyectados con el compuesto SHAO OUC-ZXQ-03 solo el ratón de la oreja picada y

aquel sin marca. Al resto se le aplicó el blanco. Por último, la caja 3 solo contenía 2 ratones. Se marcó un ratón con la oreja derecha cortada al cual se le aplicó el blanco y al ratón que no tenía marca el compuesto SHAO OUC-ZXQ-03.

Una vez inyectados con su respectivo compuesto, monitoreamos los signos vitales de los doce ratones. Desafortunadamente, a cuatro ratones que se les había inyectado el blanco comenzaron a presentar síntomas de estrés (pelo erizado, inmovilidad, entre otros). Considerando que al paso del tiempo estos no se recuperaban, se tomó la decisión de proceder con el punto final humanitario de los cuatro ratones y seguir el ensayo con 8 ratones. Cabe resaltar que, debido a la falta de ratones C57BL/6 con el control que tuvieron que ser sacrificados, el ensayo no se pudo llevar a cabo. Sin embargo, se siguieron monitorear los ratones sobrevivientes para observar su comportamiento, y utilizar la data obtenida como base para futuras investigaciones con el compuesto.

3.1.6.1. Variación de Peso de los Ratones C57BL/6 con Relación al Consumo de Comida y Agua

En la caja uno, se mantuvieron vivos y sin síntomas los ratones ODC, OIC y 2OC, todos inyectados con el compuesto SHAO OUC-ZXQ-03. Como se muestra en la figura 23 los ratones ODC y OIC los primeros días, luego de ser inyectados, perdieron peso. El ratón ODC perdió alrededor de 2 g de peso mientras que el ratón de OIC solo perdió 1 gramo de peso. Sin embargo, al paso de los días OIC volvió a su peso original y ODC aumento de peso. Mientras tanto 2OC, nunca perdió peso, pero si aumento 1 gramo de su peso original.

En la caja dos, los ratones el ODP y SM, se les aplicó el punto final humanitario por presentar los síntomas antes mencionados, y se siguió con el ensayo con los ratones ODC, OIC y 2OC. El ratón ODC mantuvo su peso los primeros días del ensayo, pero al quinto día y al noveno día este perdió 1 gramo de peso, sin embargo, al día siguiente este lo recuperaba. El ratón 2OC, al contrario del ratón ODC, aumento 1 g de peso, pero al día siguiente volvía a su peso original. Por último, el ratón OIC perdió 5 g, pero a lo largo del ensayo volvió a recuperar 2 g. Cabe destacar que al ratón OIC, a pesar de su pérdida de peso abrupta, no se le realizó el punto final humanitario debido a que no presentaba algún otro síntoma, sino que este se notaba activo.

En la caja 3 ambos ratones, SM y ODC, se mantuvieron vivos. El ratón SM no presento ninguna pérdida de peso, sino aumento 2 g de peso. En cambio, ODC perdió 1 g de peso, pero este volvió a recuperarlo.

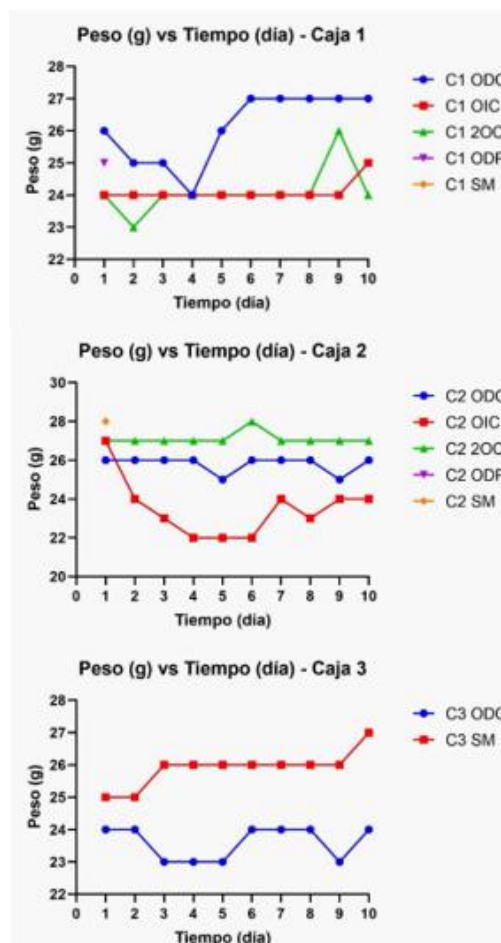


Figura 23. Variación de Peso de los Ratones C57BL/6 . En esta figura se observan los cambios de peso en los ratones C57BL/6 , agrupados por cajas en que se encontraban los ratones. Dentro de esta se puede observar una pequeña disminución en su peso corporal sin embargo todos presentaban una tendencia a aumentar de peso y, de perderlo, regresar a su peso original.

Esta pérdida de peso se puede asociar al consumo de agua e ingesta de alimentos donde, en la figura 24 se muestra que las 3 cajas de ratones presentaban la misma tendencia de consumo. Inicialmente los ratones presentaban un bajo consumo de agua, alrededor de 2.5 a 5 ml de agua, pero al paso de los días esto aumentaban a 10 ml - 20 ml por caja. Sin embargo, en el caso de la ingesta de alimentos esto consumieron inicialmente 7.5 a 10 g finalizando el décimo día, con alrededor de 15 a 20 g consumidos por caja.

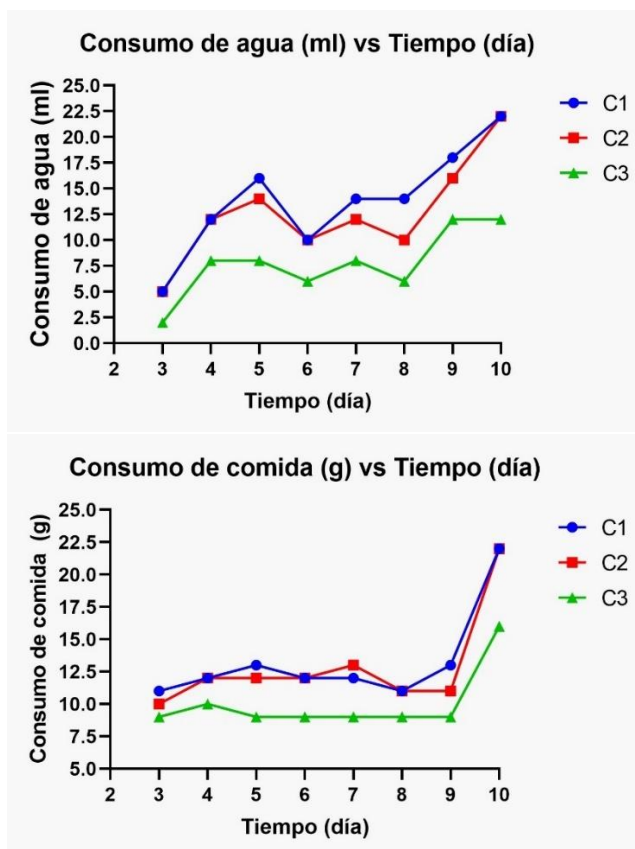


Figura 24. Consumo de Agua y Alimentos de los ratones C57BL/6 . Se observa en la figura superior una tendencia al constante aumento del consumo de agua por los ratones encontrados en las respectivas cajas. Mientras que la figura inferior se presenta el consumo del alimento en las 3 cajas que contenían a los ratones, donde se mantiene una tendencia constante de alimentación a lo largo de las cajas, excepto el décimo día en donde se observó un aumento en el consumo de alimento.

Existen diversos factores que pueden afectar el comportamiento de un ratón y pueden indicios de señales de sufrimiento en este. Entre estos se pueden observar la pérdida o aumento de peso atribuida por la ingesta de agua y el consumo de los alimentos. Por lo general un ratón saludable debe consumir entre 5 a 8 ml de agua. Esto indica que, como se menciona en la investigación realizada por Neil E. en el 2007, la pérdida de peso observada en los ratones puede ver atribuida a raíz de la deshidratación del animal. Esto observa inicialmente en la figura 23 en donde ciertos ratones mantenían su peso, pero al cabo de los días estos disminuían, para luego volver a su peso original. Sin embargo, al observar la figura 20 se puede evaluar que inicialmente estos no

ingerían suficiente agua, pero al paso de los días regresaron a su ingesta normal. Si bien es cierto, es necesario mencionar el que el consumo de comida no fluctuó en su ingesta normal de alimentos, que debe ser alrededor de 4 a 5 gramos diarios. Cabe mencionar que otra forma de hidratación de los ratones es por medio de sus alimentos; el cual pudo atribuir al aumento final del consumo elevado del alimento. Esto quiere decir que, con respecto al aumento y pérdida de peso, los ratones no presentaban signos de sufrimiento (Fawcett, 2012; Chi, 2021).

3.1.6.2. Variación de la Temperatura Corporal en los Ratones C57BL/6

Además del peso de los ratones, se tomó la decisión de medir su temperatura corporal. Esto, con el fin de evaluar si el ratón presentaba algún tipo de malestar de estrés, como lo es la fiebre. Como se observa en la figura 25, todos los ratones en la caja dos bajaron su temperatura corporal. En el caso del ratón ODC, este llegó a perder alrededor de 2 °C grados de temperatura corporal sin embargo volvió a aumentar su temperatura al día siguiente. Lo mismo sucedió con el ratón OIC el cual perdió alrededor 2 °C grados de su temperatura corporal, pero volvió a aumentarla al día siguiente. Cabe mencionar que los tres ratones, al décimo día habían vuelto a bajar su temperatura corporal.

Esta misma tendencia se ve reflejada en las cajas 1 y 3, donde los animales inicialmente presentaban una temperatura corporal de 31 °C a 32 °C que disminuyó al paso de los días. Sin embargo, al cabo del noveno y décimo día, este volvió a aumentar y oscilar entre los 30 °C a 31 °C.

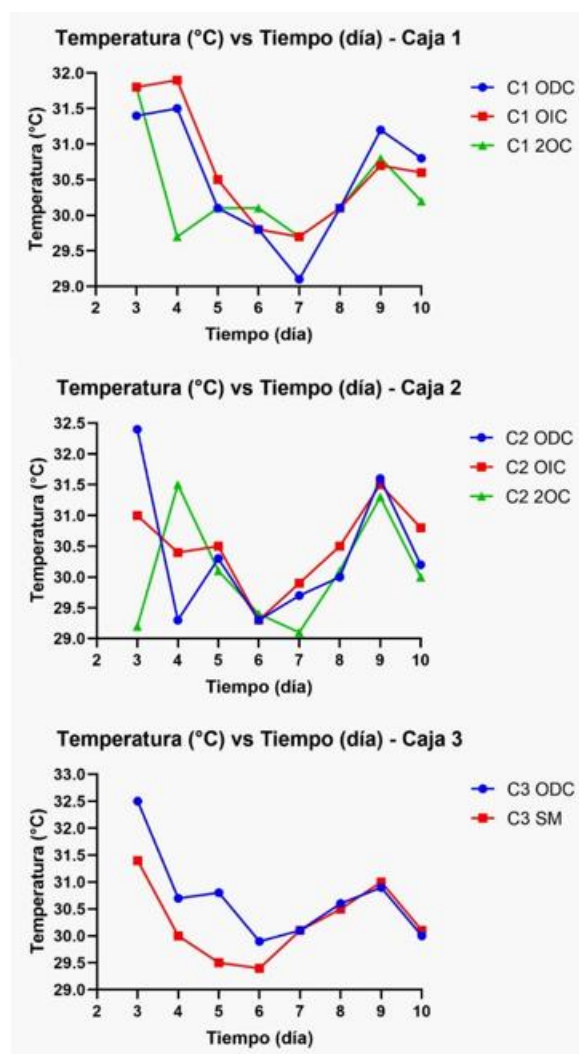


Figura 25. Temperatura Corporal de los Ratones C57BL/6 . Se observa en esta figura los cambios de temperatura corporal en los ratones C57BL/6 , agrupados por cajas en que se encontraban los ratones. En donde la caja 1 y 3 tienden disminuir su temperatura corporal, sin embargo, al sexto o séptimo día comienzan a aumentar su temperatura. En cambio, en la caja 2 los ratones ODC y OIC presenta la misma tendencia que los ratones de la caja 1 y 3, mientras que el ratón 2OC se comporta diferente. Este, a pesar comenzar con una temperatura bastante baja, al cuarto día este se recupera y sigue la tendencia del resto de los ratones.

Esta pérdida de temperatura corporal se puede ver directamente asociada a la temperatura ambiental y a la humedad relativa del ambiente en la habitación en la que se encuentran los ratones C57BL/6 , ya que estos parámetros funcionan como un termorregulador para el animal (Clough, 1982). Como se muestra en la figura 26, se puede observar la misma tendencia

presentada en la temperatura corporal de los animales. En donde la temperatura ambiental inicialmente presentaba una temperatura de 25°C, sin embargo, está bajo hasta llegar a los 21°C para luego volver a aumentar a 22°C. Mientras que la humedad relativa de la habitación presento inicialmente una humedad de 53% la cual disminuyo hasta llegar a 51% en el noveno día, para aumentar el décimo día a una humedad de 52%.

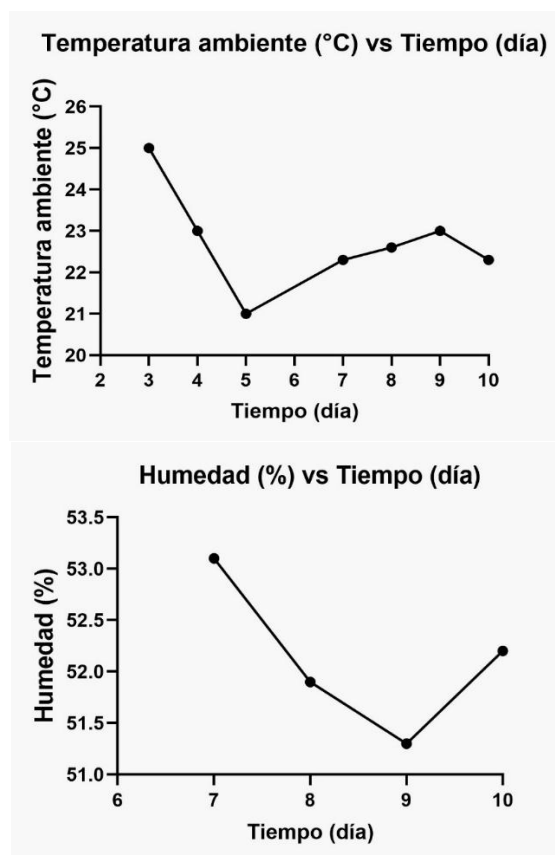


Figura 26. Temperatura Ambiental y Humedad Ambiental de los Ratones C57BL/6 . En la figura de la superior se presenta la variación de la temperatura ambiental, mientras que en la figura inferior se observa la variación de la humedad relativa del ambiental en la habitación donde se encontraban los ratones C57BL/6 .

Estos resultados concuerdan con lo mencionado, según la Dra. López en su artículo del 2005 “Normas básicas para la mantención de ratones y ratas de laboratorio”, donde se recomienda que

la temperatura ambiental de los ratones debería oscilar entre 20 a 26°C, mientras que una humedad relativa del 35 a 70% (López, 2005). Esto permite que se dé una termorregulación adecuada del ratón, ya que de estar fuera de estos parámetros puede ocasionar una afectación en el comportamiento del mismo. Esto conllevando a problemas en el sistema digestivo, su ciclo de sueño y hasta su sistema cardiovascular (Swoap et al., 2004; Fawcett, 2012).

Estos resultados indican que las fluctuaciones de temperatura que presentaban los ratones en el ensayo, era atribuido a factores externos como la temperatura ambiental y humedad relativa, evidenciando que estos no presentaban algún tipo de malestar de estrés, como lo es la fiebre.

3.1.6.3. Evaluación Macroscópica de los Órganos de los Ratones C57BL/6

Debido a que nuestra muestra con vehículo inicialmente se le aplicó el punto final humanitario por presentar signos de estrés, el ensayo perdió validez. Sin embargo, se decidió seguir observando a los ratones con el compuesto para evaluar su comportamiento ante el compuesto SHAO OUC-ZXQ-03. Al culminar el décimo día del ensayo, se realizó el punto final experimental, que conllevó el sacrificio de los ratones que, a esta fecha, habían llegado al final del experimento y no presentaban algún indicio de estrés.

Es en este punto en que se realizó una evaluación macroscópica de los órganos, donde se evaluó la afectación del hígado de los ratones. En la figura 27 podemos observar 3 ratones con diferentes diagnósticos. El primer ratón en la figura A. presenta un hígado de tamaño normal, sin ninguna afectación, y de un color rojizo, indicando un hígado saludable. Sin embargo, en las imágenes siguientes se presentan ratones con problemas de hígado. En la figura B se presenta un ratón con el tratamiento, en presencia de hígado graso con un hígado de tamaño reducido y con una coloración naranja. Mientras que en la figura C se observa un ratón, con el vehículo,

que presenta un hígado graso con una coloración naranja y un tamaño prominente. Esto quiere decir que los ratones presentes en la figura B y C, a pesar de que a uno se le inyectó el tratamiento y al otro el vehículo respectivamente, ambos presentan hígado graso.

Esto se puede ver atribuido a la cantidad de aceite de canola inyectado a los ratones, el cual fue utilizado para diluir tanto el vehículo como el tratamiento. Esto coincide con los hallazgos obtenidos por Andersen y Holub (Andersen & Holub, 1976) donde describen que el alto contenido de aceite de canola puede ocasionar hígado graso. Dicho esto, la alta cantidad de grasa puede influenciar al cambio de coloración del hígado, de una coloración rojiza a un color naranja como se muestra en la figura 22 (Bahena-Hernández et al., 2014).



Figura 27. Evaluación Macroscópica de los Órganos Ratón C57BL/6. **A.** Ratón C57BL/6 con hígado saludable, el cual presentaba un tamaño normal y una coloración rojiza. **B.** Ratón C57BL/6 con el compuesto SHAO OUC-ZXQ-03 presenta hígado graso, donde hubo reducción de tamaño del hígado y el cambio de coloración a naranja. **C.** Ratón C57BL/6 sin el compuesto SHAO OUC-ZXQ-03 con presencia de hígado graso, con reducción en el tamaño del hígado y el cambio de su coloración. Evaluación realizada por la veterinaria encargada del bioterio.

Capítulo IV: Conclusión y Recomendaciones

4.1. Conclusión

Tras el análisis de los resultados obtenidos, podemos concluir que la evidencia indica que el compuesto SHAO OUC-ZXQ-03 presenta una tenue actividad antiplasmodial ante los cultivos de *P. falciparum*, por las afectaciones en la membrana celular e hiperpolarización de la misma, que conlleva a una muerte célula. Simultáneamente se puede evaluar la capacidad del compuesto de reducir su actividad inhibitoria (IC50) al ser resuspendido el compuesto liofilizado para su uso. Evidenciando así que, al cabo del tiempo de vida del mismo, este puede perder parte de su capacidad inhibitoria media máxima.

Cabe resaltar que, en presencia del compuesto, los ensayos indican que los ratones no parecen presentar alguna sintomatología que pudiese haberle ocasionado sufrimiento. Lo cual, a pesar de no poder ser un resultado cuantificable, da una idea de la posible capacidad que puede presentar el compuesto. Es necesario seguir las investigaciones pertinentes para poder continuar observando la viabilidad y seguridad del compuesto en organismos vivos, y cultivos *in vitro*.

4.2. Recomendaciones

Una vez expuestos los resultados de la investigación y dando a conocer las conclusiones, se puede realizar las siguientes recomendaciones:

- Es recomendable que se realice una prueba de concentración inhibitoria media máxima (IC50) al compuesto, con el fin de observar los cambios de concentración al paso del tiempo luego de este ser resuspendido. Evaluando así la similitud o diferencia que este presenta frente a previas pruebas realizadas, como también evaluar el tiempo de vida del mismo.
- Para la prueba *in vivo* de seguridad del compuesto SHAO OUC-ZXQ-03 recomiendo comenzar a trabajar con los ratones por lo menos 2 semanas antes de comenzar el ensayo, ya que esto ayudara a que ellos mantengan una rutina que no afecte los resultados del experimento.
- Para la prueba *in vivo* de seguridad del compuesto SHAO OUC-ZXQ-03 recomiendo comenzar a separar a los ratones en grupos por vehículo y compuesto, en vez de ser aleatorio por cajas, ya que permitirá observar diferencias entre cada grupo.
- Recomendando evitar el uso de aceite de canola en los ensayos *in vivo*, ya que este puede ocasionar hígado graso en los ratones.

Referencias Bibliográficas

- Allen, R. J., y Kirk, K. (2004). The membrane potential of the intraerythrocytic malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *The Journal of biological chemistry*, 279(12), 11264–11272. <https://doi.org/10.1074/jbc.M311110200>
- Aly, A. S., Vaughan, A. M., y Kappe, S. H. (2009). Malaria parasite development in the mosquito and infection of the mammalian host. *Annual review of microbiology*, 63, 195–221. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.091208.073403>
- Andersen, D. B., y Holub, B. J. (1976). The influence of dietary inositol on glyceride composition and synthesis in livers of rats fed different fats. *The Journal of nutrition*, 106(4), 529–536. <https://doi.org/10.1093/jn/106.4.529>
- Angchaisuksiri P. (2014). Coagulopathy in malaria. *Thrombosis research*, 133(1), 5–9. <https://doi.org/10.1016/j.thromres.2013.09.030>
- 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), e2012061. <https://doi.org/10.4084/MJHID.2012.061>
- AVMA. (2020). AVMA Guidelines for the Euthanasia of Animals: 2020 Edition. American Veterinary Medical Association, 161(15), 1–121. <https://doi.org/10.1136/vr.161.15.502> ISBN 978-1-882691-09-8. <https://www.avma.org/sites/default/files/2020-02/Guidelines-on-Euthanasia-2020.pdf>
- Aykul, S., y Martinez-Hackert, E. (2016). Determination of half-maximal inhibitory concentration using biosensor-based protein interaction analysis. *Analytical biochemistry*, 508, 97–103. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2016.06.025>
- Bahena-Hernández, S. Y., Huitrón-Contreras, Y., y López-Navarrete, O. (2014). Inducción de inflamación en ratón BALB C por medio de comida con alto contenido calórico y carente contenido nutricional. https://www.researchgate.net/publication/282013314_Induccion_de_inflamacion_en_raton

_Balb_c_por_medio_de_comida_con_alto_contenido_calorico_y_carente_contenido_nutri
cional

Basic malaria microscopy – 2nd edition. Learner’s guide. (2010). World Health Organization, Second Edition, 88pg. ISBN 978-92-4-154782-6(Part 1)
<https://www.who.int/publications/i/item/9241547820>

Bush, D., y Friedl, E. (2023). Definitive & Intermediate Hosts | Overview, Difference & Examples. Study.com. <https://study.com/academy/lesson/definitive-intermediate-hosts-in-parasitic-life-cycles.html#:~:text=The%20main%20difference%20between%20a,while%20the%20parasite%20remains%20asexual.>

Barbalato L, Pillarisetty LS. Histology, Red Blood Cell. (2022) StatPearls Publishing.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK539702/>

Burger MK, Schaller DJ. Metabolic Acidosis. 2023 Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2024 Jan-. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK482146/>

Carlos, B. C., Rona, L., Christophides, G. K., y Souza-Neto, J. A. (2019). A comprehensive analysis of malaria transmission in Brazil. Pathogens and global health, 113(1), 1–13.
<https://doi.org/10.1080/20477724.2019.1581463>

Cambridge University Press. (2023). Diagnosis. In Cambridge Advanced Learner’s Dictionary & Thesaurus. <https://dictionary.cambridge.org/dictionary/english/diagnosis>

CDC (2023) Malaria. About Malaria - FAQs.
<https://www.cdc.gov/malaria/about/faqs.html#>

CDC. (2022). Malaria - Disease. Centers for Disease Control and Prevention.
<https://www.cdc.gov/malaria/about/disease.html#:~:text=Following%20the%20infective%20bite%20by,from%207%20to%2030%20days>

CDC. (2024). Alternatives for pregnant women. Malaria.
<https://www.cdc.gov/malaria/hcp/clinical-guidance/pregnant-women.html>

CDC. (2024). Treatment of severe malaria. Malaria. <https://www.cdc.gov/malaria/hcp/clinical-guidance/treatment-of-severe-malaria.html>

CDC. (2024). Treatment of uncomplicated malaria. Malaria. <https://www.cdc.gov/malaria/hcp/clinical-guidance/treatment-uncomplicated.html>

CDC (2024). About parasites. Parasites. <https://www.cdc.gov/parasites/about/index.html>

CDC. Centers for Disease Control and Prevention. (2021). Dichlorodiphenyltrichloroethane (DDT) Factsheet | National Biomonitoring Program | CDC. https://www.cdc.gov/biomonitoring/DDT_FactSheet.html

Chaudhry R, Varacallo M. (2023) Biochemistry, Glycolysis. StatPearls. Treasure Island. Publishing <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK482303/>

Chi Michael (2021). Standard on food and/or water restriction and/or deprivation. López. University of North Carolina at Chapel Hill - Knowledge Base. Article ID: 132199 <https://policies.unc.edu/TDClient/2833/Portal/KB/ArticleDet?ID=132199#:~:text=Mice%20and%20rats%20consume%2070,average%20of%2015%2D20%20grams.>

Chitnis, C. E. (2001). Molecular insights into receptors used by malaria parasites for erythrocyte invasion. *Current Opinion in Hematology*, 8(2), 85–91. <https://doi.org/10.1097/00062752-200103000-00005>

Chrysafides SM, Bordes SJ, Sharma S. (2023) Physiology, Resting Potential. StatPearls <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK538338/>

Clough G. (1982). Environmental effects on animals used in biomedical research. *Biological reviews of the Cambridge Philosophical Society*, 57(Pt 3), 487–523. <https://doi.org/10.1111/j.1469-185x.1982.tb00705.x>

Contreras, C. E., Rivas, M. A., Domínguez, J., Charris, J., Palacios, M., Bianco, N. E., y Blanca, I. (2004). Stage-specific activity of potential antimalarial compounds measured in vitro by flow cytometry in comparison to optical microscopy and hypoxanthine uptake.

Memorias do Instituto Oswaldo Cruz, 99(2), 179–184. <https://doi.org/10.1590/s0074-02762004000200011>

Coronado, L., Zhang, X. Q., Dorta, D., Escala, N., Pineda, L. M., Ng, M. G., Del Olmo, E., Wang, C. Y., Gu, Y. C., Shao, C. L., y Spadafora, C. (2021). Semisynthesis, Antiplasmodial Activity, and Mechanism of Action Studies of Isocoumarin Derivatives. *Journal of natural products*, 84(5), 1434–1441. <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.0c01032>

Crutcher JM, Hoffman SL. Malaria. In: Baron S, editor. *Medical Microbiology*. 4th edition. Galveston (TX): University of Texas Medical Branch at Galveston; 1996. capítulo 83. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK8584/>

Derebe, D., Wubetu, M., y Alamirew, A. (2021). Evaluation of Antimalarial Activity of 80% Methanolic Root Extract of *Dorstenia barnimiana* Against *Plasmodium berghei*-Infected Mice. *Clinical pharmacology: advances and applications*, 13, 157–167. <https://doi.org/10.2147/CPAA.S313847>

Disruptor (2012) Definition, pictures, pronunciation and usage notes | Oxford Advanced Learner's Dictionary OxfordLearnersDictionaries.com. <https://www.oxfordlearnersdictionaries.com/definition/english/disruptor>

Fawcett, A. (2012). ARRPP Guideline 22: Guidelines for the housing of mice in scientific institutions. *Animal Research Review Panel* 1. https://www.animaethics.org.au/__data/assets/pdf_file/0004/249898/Guideline-22-mouse-housing.pdf

Félétou, M. (2011). *Endothelium: Part 1: Multiple Functions of the Endothelial Cells—Focus on Endothelium-Derived Vasoactive Mediators*. San Rafael (CA): Morgan & Claypool Life Sciences. NCBI Bookshelf. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK57149/>

Felizardo De Brito, C., Evangelista, A., Felipe, R., Cascabulho, C., Fragoso, V., y Melo De Oliveira, G. (2020). Laboratory Mice Euthanasia: Speed Death and Animal Welfare.

American Journal of Biomedical Science & Research, 8(4), 341–355.
<https://doi.org/10.34297/ajbsr.2020.08.001300>

Fox, M., Atkin, L., Matthews, S., Smith, P., y Taylor, K. (2020). Circulatory disorders. In Elsevier eBooks (pp. 89–114). <https://doi.org/10.1016/b978-0-7020-6223-0.00005-4>

Garcia, L. S. (2010). Malaria. Clinics in Laboratory Medicine, 30(1), 93–129.
<https://doi.org/10.1016/j.cll.2009.10.001>

Gluzman, I. Y., Francis, S. E., Oksman, A., Smith, C. E., Duffin, K. L., y Goldberg, D. E. (1994). Order and specificity of the Plasmodium falciparum hemoglobin degradation pathway. The Journal of clinical investigation, 93(4), 1602–1608.
<https://doi.org/10.1172/JCI117140>

Grazia, L., Carradori, S., Grande, R., Secci, D., y Guglielmi, P. (2020). Antimalarial Agents from Medicinal Plant and Fungal Sources. In: Swamy, M. (eds) Plant-derived Bioactives. Springer, Singapore. 297-334 https://doi.org/10.1007/978-981-15-1761-7_13

Griffing, S. M., Taul, P. L., Udhayakumar, V., y Silva-Flannery, L. (2015). A historical perspective on malaria control in Brazil. Memórias Do Instituto Oswaldo Cruz, 110(6), 701–718. doi.org/10.1590/0074-02760150041

Goldberg, D. E., y Zimmerberg, J. (2020). Hardly Vacuous: The Parasitophorous Vacuolar Membrane of Malaria Parasites. Trends in parasitology, 36(2), 138–146.
<https://doi.org/10.1016/j.pt.2019.11.006>

Hall, B. S., Daramola, O. O., Barden, G., y Targett, G. A. (1997). Modulation of protein kinase C activity in Plasmodium falciparum-infected erythrocytes. Blood, 89(5), 1770–1778.

Hansebout, R. R., Cornacchi, S. D., Haines, T., y Goldsmith, C. H. (2009). How to use an article about prognosis. Canadian journal of surgery. Journal canadien de chirurgie, 52(4), 328–336.

Hussain, H., Al-Sadi, A. M., Schulz, B., Steinert, M., Khan, A., Green, I. R., y Ahmed, I. (2017). A fruitful decade for fungal polyketides from 2007 to 2016: antimicrobial activity,

chemotaxonomy and chemodiversity. *Future Medicinal Chemistry*, 9(14), 1631–1648. doi:10.4155/fmc-2017-0028

Hussain, H., Schulz, B., y Green, I. R. (2019). Fungal Polyketides: Chemical Diversity and Their Cytotoxic Effects. *Sustainable Development and Biodiversity*, 195–214. https://doi.org/10.1007/978-3-030-30746-2_9

ICH. Safety Pharmacology Studies For Human Pharmaceuticals S7a. (2000). Harmonised Tripartite Guideline. International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use, S7A (Step 4 version. https://database.ich.org/sites/default/files/S7A_Guideline.pdf

Idro, R., Marsh, K., John, C. C., y Newton, C. R. (2010). Cerebral malaria: mechanisms of brain injury and strategies for improved neurocognitive outcome. *Pediatric research*, 68(4), 267–274. <https://doi.org/10.1203/PDR.0b013e3181eee738>

Killeen, G. F., Fillinger, U., Kiche, I., Gouagna, L. C., y Knols, B. G. (2002). Eradication of *Anopheles gambiae* from Brazil: lessons for malaria control in Africa? *The Lancet Infectious Diseases*, 2(10), 618–627. [https://doi.org/10.1016/s1473-3099\(02\)00397-3](https://doi.org/10.1016/s1473-3099(02)00397-3) DDT - A Brief History and Status. (Abril 21, 2022). US EPA. [https://www.epa.gov/ingredients-used-pesticide-products/ddt-brief-history-and-status#:~:text=DDT%20\(dichloro%2Ddiphenyl%2Dtrichloroethane,both%20military%20and%20civilian%20populations](https://www.epa.gov/ingredients-used-pesticide-products/ddt-brief-history-and-status#:~:text=DDT%20(dichloro%2Ddiphenyl%2Dtrichloroethane,both%20military%20and%20civilian%20populations)

Libretexts (2024). 7.19: Concentrations: dilution. Chemistry LibreTexts. https://chem.libretexts.org/Courses/Heartland_Community_College/CHEM_120%3A_Fundamentals_of_Chemistry/07%3A_Solutions/7.19%3A__Concentrations%3A_Dilution

Liffner, B., Balbin, J. M., Wichers, J. S., Gilberger, T., y Wilson, D. W. (2021). The ins and outs of plasmodium rhoptries, focusing on the cytosolic side. *Trends in Parasitology*, 37(7), 638–650. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2021.03.006>

López Gómez, C. (2005). Normas básicas para la mantención de ratones y ratas de laboratorio. *TecnoVet*, 11(2), págs. 20–23. Recuperado a partir de <https://revfono.uchile.cl/index.php/RT/article/view/38998>

Machholz, E., Mulder, G., Ruiz, C., Corning, B. F., y Pritchett-Corning, K. R. (2012). Manual restraint and common compound administration routes in mice and rats. *Journal of visualized experiments : JoVE*, (67), 2771. <https://doi.org/10.3791/2771>

Maciel, C., de Oliveira Junior, V. X., Fázio, M. A., Nacif-Pimenta, R., Miranda, A., Pimenta, P. F., y Capurro, M. L. (2008). Anti-plasmodium activity of angiotensin II and related synthetic peptides. *PloS one*, 3(9), e3296. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0003296>

Malaria. (Octubre 6, 2020). Center for Disease Control and Prevention. <https://www.cdc.gov/dpdx/malaria/index.html>

Martiney, J. A., Cerami, A., y Slater, A. F. (1996). Inhibition of hemozoin formation in *Plasmodium falciparum* trophozoite extracts by heme analogs: possible implication in the resistance to malaria conferred by the beta-thalassemia trait. *Molecular medicine (Cambridge, Mass.)*, 2(2), 236–246.

Mata-Cantero, L., Lafuente, M.J., Sanz, L. et al. (2014) Magnetic isolation of *Plasmodium falciparum* schizonts iRBCs to generate a high parasitaemia and synchronized in vitro culture. *Malar J* 13, 112. <https://doi.org/10.1186/1475-2875-13-112>

Matson, S. L., Chatterjee, M., Stock, D. A., Leet, J. E., Dumas, E. A., Ferrante, C. D., Monahan, W. E., Cook, L. S., Watson, J., Cloutier, N. J., Ferrante, M. A., Houston, J. G., y Banks, M. N. (2009). Best practices in compound management for preserving compound integrity and accurately providing samples for assays. *Journal of biomolecular screening*, 14(5), 476–484. <https://doi.org/10.1177/1087057109336593>

Miller, L. H., Baruch, D. I., Marsh, K., y Doumbo, O. K. (2002). The pathogenic basis of malaria. *Nature*, 415(6872), 673–679. <https://doi.org/10.1038/415673a>

Módulos de principios de epidemiología para el control de enfermedades (MOPECE). (2011). Organización Panamericana De La Salud, Segunda Edición. ISBN 92 75 32407 7 <https://www3.paho.org/col/dmdocuments/MOPECE2.pdf>

Moll, K., Kaneko, A., Scherf, A., y Wahlgren, M. (2013). *Methods In Malaria Research* (Sixth Edition ed.). EVIMalaR. https://www.beiresources.org/portals/2/MR4/Methods_In_Malaria_Research-6th_edition.pdf

New England Biolabs, Inc. (NEB)(2013). What is Lyophilization? New England Biolabs, Inc. https://www.neb.com/en/lyophilization-sciences/new-england-biolabs-lyophilization-sciences/what-is-lyophilization?srsId=AfmBOopnmrpszYxhMq3v7zUUAq-uiXrQY_ZOBmw2tpSUUS__y_mq0C1V

Nyandwaro, K., Oyweri, J., Kimani, F., y Mbugua, A. (2020). Evaluating Antiplasmodial and Antimalarial Activities of Soybean (*Glycine max*) Seed Extracts on *P. falciparum* Parasite Cultures and *P. berghei*-Infected Mice. *Journal of pathogens*, 2020, 7605730. <https://doi.org/10.1155/2020/7605730>

Pakosz, Z., Lin, T. Y., Michalczyk, E., Nagano, S., y Heddle, J. G. (2021). Inhibitory Compounds Targeting *Plasmodium falciparum* Gyrase B. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 65(10), e0026721. <https://doi.org/10.1128/AAC.00267-21>

Pandey, S. K., Anand, U., Siddiqui, W. A., & Tripathi, R. (2023). Drug Development Strategies for Malaria: With the Hope for New Antimalarial Drug Discovery-An Update. *Advances in medicine*, 2023, 5060665. <https://doi.org/10.1155/2023/5060665>

Pandey, A., Singh, N., Tekwani, B., Puri, S., y Chauhan, V. (1999). Assay of β - hematin formation by malaria parasite. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 20(1-2), 203–207. doi:10.1016/s0731-7085(99)00021-7

Pardave B., Arce C. y Cabezas, C. (1997). Aislamiento y Mantenimiento in vitro de *Plasmodium falciparum*. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Publica*. Versión impresa ISSN 1726-4634 Kasibhatla, S., Amarante-Mendes, G. P., Finucane, D.,

Brunner, T., Bossy-Wetzel, E., & Green, D. R. (2006). Analysis of DNA Fragmentation Using Agarose Gel Electrophoresis. *Cold Spring Harbor Protocols*, 2006(1), pdb. prot4429. <https://doi.org/10.1101/pdb.prot4429>

Platon, L., y Ménard, D. (2024). *Plasmodium falciparum* ring-stage plasticity and drug resistance. *Trends in parasitology*, 40(2), 118–130. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2023.11.007>

Positive and negative controls. (2024). Rockland. <https://www.rockland.com/resources/positive-and-negative-controls/>

Ramasamy, R. (2014). Zoonotic Malaria - Global Overview and Research and Policy Needs. *Frontiers in Public Health*, 2. <https://doi.org/10.3389/fpubh.2014.00123>

Rodent Blood Collection. (2021) Research Animal Resources and Compliance (RARC) https://www.rarc.wisc.edu/tools_and_guides/techniques/rodent_blood_collection.html

Rodrigues, P. T., Valdivia, H. O., de Oliveira, T. C., Alves, J., Duarte, A., Cerutti-Junior, C., Buery, J. C., Brito, C., de Souza, J. C., Jr, Hirano, Z., Bueno, M. G., Catão-Dias, J. L., Malafronte, R. S., Ladeia-Andrade, S., Mita, T., Santamaria, A. M., Calzada, J. E., Tantular, I. S., Kawamoto, F., Raijmakers, L., y Ferreira, M. U. (2018). Human migration and the spread of malaria parasites to the New World. *Scientific reports*, 8(1), 1993. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-19554-0>

Sachanonta, N., Chotivanich, K., Chaisri, U., Turner, G. D., Ferguson, D. J., Day, N. P., y Pongponratn, E. (2011). Ultrastructural and real-time microscopic changes in *P. falciparum*-infected red blood cells following treatment with antimalarial drugs. *Ultrastructural pathology*, 35(5), 214–225. <https://doi.org/10.3109/01913123.2011.601405>

Sato, S. (2021). *Plasmodium*—a brief introduction to the parasites causing human malaria and their basic biology. *Journal of Physiological Anthropology*, 40(1). <https://doi.org/10.1186/s40101-020-00251-9>

Schuster F. L. (2002). Cultivation of *plasmodium* spp. *Clinical microbiology reviews*, 15(3), 355–364. <https://doi.org/10.1128/CMR.15.3.355-364.2002>

Shao, C. L., Wu, H. X., Wang, C. Y., Liu, Q. A., Xu, Y., Wei, M. Y., Qian, P. Y., Gu, Y. C., Zheng, C. J., She, Z. G., y Lin, Y. C. (2011). Potent antifouling resorcylic acid lactones from the gorgonian-derived fungus *Cochliobolus lunatus*. *Journal of natural products*, 74(4), 629–633. <https://doi.org/10.1021/np100641b>

Shears, M. J., Nirujogi, R. S., Swearingen, K. E., Renuse, S., Mishra, S., Reddy, P. J., Moritz, R. L., Pandey, A., y Sinnis, P. (2019). Proteomic Analysis of Plasmodium Merosomes: The Link between Liver and Blood Stages in Malaria. *Journal of Proteome Research*, 18(9), 3404–3418. <https://doi.org/10.1021/acs.jproteome.9b00324>

Shears, M. J., Nirujogi, R. S., Swearingen, K. E., Renuse, S., Mishra, S., Reddy, P. J., Moritz, R. L., Pandey, A., y Sinnis, P. (2019). Proteomic Analysis of Plasmodium Merosomes: The Link between Liver and Blood Stages in Malaria. *Journal of Proteome Research*, 18(9), 3404–3418. <https://doi.org/10.1021/acs.jproteome.9b00324>

Sibley C. H. (2015). Observing in real time the evolution of artemisinin resistance in *Plasmodium falciparum*,” *BMC Med.* Vol. 13(No.1) p. 67. doi:10.1186/s12916-015-0316-5

Silva, G. B. D., Junior, Pinto, J. R., Barros, E. J. G., Farias, G. M. N., y Daher, E. F. (2017). Kidney involvement in malaria: an update. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo*, 59, e53. <https://doi.org/10.1590/S1678-9946201759053>

Spencer, L., Mendoza, E., y Louro, A. (2016). <https://www.revistabionatura.com/2016.01.03.9.html>. *Bionatura Ibero-American Journal of Biotechnology and Life Sciences*. <https://www.revistabionatura.com/2016.01.03.9.html>

Spencer, L. M., Gómez, A., y Collovini, E. (2016). Mechanisms of invasion from sporozoite and merozoíto of *Plasmodium*. *Bionatura (Ibarra - Impresa)*, 1(2), 89–94. <https://doi.org/10.21931/rb/2016.01.02.9>

Suh K., Kain K. y Keystone J. (2004). Malaria. *Canadian Medical Association Jurnal*; 170(11):1693-702. doi: 10.1503/cmaj.1030418 Ashley EA1, Dhorda M, Fairhurst RM, Amaratunga C, Lim P, Suon S, Sreng S, Anderson JM, Mao S, Sam B, Sopha C, Chuor CM,

Nguon C, Sovannaroeth S, Pukrittayakamee S, Jittamala P, Chotivanich K, Chutasmit K, Suchatsoonthorn C, Runcharoen R, Hien TT, Thuy-Nhien NT, Thanh NV, Phu NH, Htut Y, Han KT, Aye KH, Mokuolu OA, Olaosebikan RR, Folaranmi OO, Mayxay M, Khanthavong M, Hongvanthong B, Newton PN, Onyamboko MA, Fanello CI, Tshefu AK, Mishra N, Valecha N, Phyo AP, Nosten F, Yi P, Tripura R, Borrmann S, Bashraheil M, Peshu J, Faiz MA, Ghose A, Hossain MA, Samad R, Rahman MR, Hasan MM, Islam A, Miotto O, Amato R, MacInnis B, Stalker J, Kwiatkowski DP, Bozdech Z, Jeeyapant A, Cheah PY, Sakulthaew T, Chalk J, Intharabut B, Silamut K, Lee SJ, Vihokhern B, Kunasol C, Imwong M, Tarning J, Taylor WJ, Yeung S, Woodrow CJ, Flegg JA, Das D, Smith J, Venkatesan M, Plowe CV, Stepniewska K, Guerin PJ, Dondorp AM, Day NP, White NJ; Tracking Resistance to Artemisinin Collaboration (TRAC) (2014). Spread of artemisinin resistance in *Plasmodium falciparum* malaria. *The New England Journal of Medicine*. Vol. 371(No.5) 411-23. doi: 10.1056/NEJMoa1314981.

Swoap, S. J., Overton, J. M., y Garber, G. (2004). Effect of ambient temperature on cardiovascular parameters in rats and mice: a comparative approach. *American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology*, 287(2), R391–R396. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00731.2003>

Tatem, A. J., y Smith, D. L. (2010). International population movements and regional *Plasmodium falciparum* malaria elimination strategies. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(27), 12222–12227. <https://doi.org/10.1073/pnas.1002971107>

Tibúrcio, M., Sauerwein, R., Lavazec, C., y Alano, P. (2015). Erythrocyte remodeling by *Plasmodium falciparum* gametocytes in the human host interplay. *Trends in Parasitology*, 31(6), 270–278. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2015.02.006>

Torres-Mendoza, D., Coronado, L. M., Pineda, L. M., Guzmán, H. M., Dorrestein, P. C., Spadafora, C., y Gutiérrez, M. (2018). Pumilacidins from the Octocoral- Associated *Bacillus* sp. DT001 Display Anti-Proliferative Effects in *Plasmodium falciparum*. *Molecules* (Basel, Switzerland), 23(9), 2179. <https://doi.org/10.3390/molecules23092179>

Turner, P. V., Brabb, T., Pekow, C., y Vasbinder, M. A. (2011). Administration of substances to laboratory animals: routes of administration and factors to consider. *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science : JAALAS*, 50(5), 600–613.

Tuteja, R. (2007). Malaria – an overview. *The FEBS Journal*, 274(18), 4670–4679. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2007.05997.x>

Uzor, P. F., Prasasty, V. D., y Agubata, C. O. (2020). Natural Products as Sources of Antimalarial Drugs. *Evidence-based complementary and alternative medicine: eCAM*, 2020, 9385125. <https://doi.org/10.1155/2020/9385125>

Valencia Mayoral P, y Ancer Rodríguez J(Eds.), (2014). *Patología*. McGraw Hill. <https://accessmedicina.mhmedical.com/content.aspx?bookid=1493§ionid=102858037>

Vandermosten, L., Pham, T. T., Possemiers, H., Knoop, S., Van Herck, E., Deckers, J., Franke-Fayard, B., Lamb, T. J., Janse, C. J., Opdenakker, G., y Van den Steen, P. E. (2018). Experimental malaria-associated acute respiratory distress syndrome is dependent on the parasite-host combination and coincides with normocyte invasion. *Malaria journal*, 17(1), 102. <https://doi.org/10.1186/s12936-018-2251-3>

Wahed, A., Quesada, A., y Dasgupta, A. (2019). Red blood cell disorders. In Elsevier eBooks (pp. 31–50). <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-814964-5.00003-6>

Wasiu A Ajetunmobi, Adebola E Orimadegun, Biobele J Brown, Nathaniel K Afolabi, Folorunso A Olabiyi, John I Anetor, Samuel Omokhodion, Kikelomo Osinusi, Felix O Akinbami, Wuraola A Shokunbi, Olugbemiro Sodeinde y Delmiro Fernandez-Reyes (2012). Haemoglobinuria among children with severe malaria attending tertiary care in Ibadan, Nigeria. *Malar J* 11, 336. <https://doi.org/10.1186/1475-2875-11-336>

Wellems, T. E., y Plowe, C. V. (2001). Chloroquine-resistant malaria. *The Journal of infectious diseases*, 184(6), 770–776. <https://doi.org/10.1086/322858>

Wiita, A. P., Seaman, J. E., y Wells, J. A. (2014). Global Analysis of Cellular proteolysis by selective enzymatic labeling of protein N-Termini. *Methods in Enzymology on CD-*

ROM/Methods in Enzymology, 327–358. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-417158-9.00013-3>

Wikipedia contributors. (2022, June 6). Biofouling. In Wikipedia, The Free Encyclopedia. Retrieved 18:27, June 9, 2022, from <https://en.wikipedia.org/w/index.php?title=Biofouling&oldid=1091863775>

Williams, S., Nix, D., y Patel, K.H. (2007). Drug Storage and Stability. Medicine, Chemistry, Materials Science. DOI:10.1016/B978-0-323-03228-5.50103-8 Corpus ID: 99342610

World Health Organization (2022). World malaria report 2022. WHO | Global Report. <https://www.who.int/publications/i/item/9789240064898>

World Health Organization: WHO. (2024). Vector-borne diseases. <https://who.int/news-room/fact-sheets/detail/vector-borne-diseases>

World Health Organization. Roll Back Malaria. (2005) <https://apps.who.int/iris/handle/10665/69057>

Yalcindag, E., Elguero, E., Arnathau, C., Durand, P., Akiana, J., Anderson, T. J., Aubouy, A., Balloux, F., Besnard, P., Bogreau, H., Carnevale, P., D'Alessandro, U., Fontenille, D., Gamboa, D., Jombart, T., le Mire, J., Leroy, E., Maestre, A., Mayxay, M., y Prugnolle, F. (2011). Multiple independent introductions of *Plasmodium falciparum* in South America. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(2), 511–516. <https://doi.org/10.1073/pnas.1119058109>

Xue-Qing Zhang, Carmenza Spadafora, Laura M. Pineda, Michelle G. Ng, Ji-Hong Sun, Wei Wang, Chang-Yun Wang, Yu-Cheng Gu y Chang-Lun Shao. Discovery, Semisynthesis, Antiparasitic and Cytotoxic Evaluation of 14-Membered Resorcylic Acid Lactones and Their Derivatives. *Sci Rep* 7, 11822 (2017). <https://doi.org/10.1038/s41598-017-12336-0>

Anexos

Anexo 1. Incorporación de Yoduro de Propidio

Cuadro 1. Ensayo #1 de Incorporación de Yoduro de Propidio

Ensayo #1 de Incorporación de Yoduro de Propidio					
		Pocillo 1	Pocillo 2	Pocillo 3	Pocillo 4
Sustancia agregada al Pocillo	RBC + Compuesto	176	145	123	123
	RBC	132	151	136	142
	iRBC + Compuesto	136	152	133	155
	iRBC	142	131	132	136
	RBC calentados	160	118	138	122
	iRBC calentados	124	130	137	121

Cuadro 2. Ensayo #2 de Incorporación de Yoduro de Propidio

Ensayo #2 de Incorporación de Yoduro de Propidio					
		Pocillo 1	Pocillo 2	Pocillo 3	Pocillo 4
Sustancia agregada al Pocillo	RBC + Compuesto	142	143	154	138
	RBC	215	115	135	131
	iRBC + Compuesto	224	197	195	126
	iRBC	158	206	210	156
	RBC calentados	115	81	132	165
	iRBC calentados	88	154	145	92

Anexo 2. Microscopía

Cuadro 3. Ensayo #1 de Microscopía

	Ensayo #1 de Microscopía							
	RBC + Compuesto		RBC		iRBC + Compuesto		iRBC	
	0 horas	24 horas	0 horas	24 horas	0 horas	24 horas	0 horas	24 horas
Anillos	0	0	0	0	3	49	8	52
Trofozoíto	0	0	0	0	18	0	12	3
Esquizonte	0	0	0	0	1	0	5	5
RBC	1019	1031	1081	1118	1043	1009	1025	1013
%Parasitemia	0	0	0	0	2,11	4,86	2,44	5,92

Cuadro 4. Ensayo #2 de Microscopía

	Ensayo #2 de Microscopía							
	RBC + Compuesto		RBC		iRBC + Compuesto		iRBC	
	0 horas	24 horas	0 horas	24 horas	0 horas	24 horas	0 horas	24 horas
Anillos	0	0	0	0	19	74	18	90
Trofozoíto	0	0	0	0	5	4	1	29
Esquizonte	0	0	0	0	4	1	3	3
RBC	1070	1035	1031	1045	1021	1017	1005	1054
%Parasitemia	0	0	0	0	2,74	7,77	2,19	11,57

Cuadro 5. Ensayo #3 de Microscopía

	Ensayo #3 de Microscopía							
	RBC + Compuesto		RBC		iRBC + Compuesto		iRBC	
	0 horas	24 horas	0 horas	24 horas	0 horas	24 horas	0 horas	24 horas
Anillos	0	0	0	0	11	79	17	94
Trofozoíto	0	0	0	0	9	5	7	3
Esquizonte	0	0	0	0	4	0	5	0
RBC	1026	1052	1107	1007	1048	1021	1071	1040
%Parasitemia	0	0	0	0	2,29	8,23	2,71	9,33

Anexo 3. Potencial de Membrana

Cuadro 6. Ensayo #1 Potencial de Membrana

Ensayo #1 Potencial de Membrana								
RBC sin Tinción	495	497	517	515	517	531	521	531
iRBC sin Tinción	503	507	502	539	514	509	515	514
RBC sin Compuesto	760	771	556	866	695	1380	1138	1149
RBC con Compuesto	1724	886	685	614	720	880	756	1185
iRBC sin Compuesto	1561	596	552	734	828	866	667	908
iRBC con Compuesto	694	955	737	666	2244	635	1020	1172
RBC con CCP	520	520	510	525	517	524	538	545
iRBC con CCP	546	542	502	525	588	536	547	557
3 horas					6 horas			

Cuadro 7. Ensayo #2 Potencial de Membrana

Ensayo #2 Potencial de Membrana								
RBC sin Tinción	513	498	542	547	531	532	541	534
iRBC sin Tinción	522	523	566	553	540	540	546	532
RBC sin Compuesto	1057	612	848	980	934	1070	976	1476
RBC con Compuesto	1222	2155	937	571	2635	1274	1142	2206
iRBC sin Compuesto	3285	898	1695	507	1292	3654	2068	1549
iRBC con Compuesto	848	621	1227	807	2255	1540	1266	693
RBC con CCP	549	559	554	542	581	538	542	606
iRBC con CCP	559	539	521	537	563	535	559	571
3 horas					6 horas			

Anexo 4. Hemólisis

Cuadro 8. Ensayo #1 Hemólisis

Ensayo #1 - Hemólisis				
RBC + Compuesto	0.267	0.33	0.341	0.344
RBC	0.331	0.337	0.338	0.312
iRBC + Compuesto	0.787	0.733	0.753	0.748
iRBC	0.746	0.696	0.772	0.769
RBC + Tritón 0.1%	2.787	2.601	2.622	2.689
iRBC + Tritón 0.1%	3.63	3.647	3.597	3.68

Cuadro 9. Ensayo #2 Hemólisis

Ensayo #2 - Hemólisis				
RBC + Compuesto	0.262	0.237	0.265	0.264
RBC	0.272	0.251	0.247	0.285
iRBC + Compuesto	1.077	0.927	1.166	1.033
iRBC	0.836	0.83	0.959	1.167
RBC + Tritón 0.1%	3.127	3.152	3.033	3.029
iRBC + Tritón 0.1%	2.579	2.465	3.168	2.96

Cuadro 10. Ensayo #3 Hemólisis

Ensayo #3 – Hemólisis				
RBC + Compuesto	0.323	0.326	0.324	0.334
RBC	0.326	0.320	0.320	0.322
iRBC + Compuesto	0.778	0.767	0.737	0.771
iRBC	0.791	0.872	0.783	0.792
RBC + Tritón 0.1%	3.243	2.860	3.299	3.349
iRBC + Tritón 0.1%	3.313	3.443	3.599	3.443

Anexo 5. Prueba *In-vivo* de seguridad del compuesto SHAO OUC-ZXQ-03

Cuadro 11. Prueba *In-vivo* de seguridad del compuesto SHAO OUC-ZXQ-03 Día #1

Día #1 Prueba <i>In-vivo</i> de seguridad del compuesto SHAO OUC-ZXQ-03				
#	Ratón	Peso	Consumo de Comida	Consumo de Agua
Caja 1	Oreja derecha cortada	26 g	-	-
	Oreja Izquierda cortada	24g		
	2 orejas cortadas	24g		
	Oreja derecha picada	25g		
	sin marca	24g		
Caja 2	Oreja derecha cortada	26g	-	-
	Oreja Izquierda cortada	27g		
	2 orejas cortadas	27g		
	Oreja derecha picada	27g		
	sin marca	28g		
Caja 3	Oreja derecha cortada	24g	-	-
	sin marca	25g		

Cuadro 12. Prueba *In-vivo* de seguridad del compuesto SHAO OUC-ZXQ-03 Día #2

Día #2 Prueba <i>In-vivo</i> de seguridad del compuesto SHAO OUC-ZXQ-03				
#	Ratón	Peso	Consumo de Comida	Consumo de Agua
Caja 1	Oreja derecha cortada	25g	-	-
	Oreja Izquierda cortada	24g		
	2 orejas cortadas	23g		
Caja 2	Oreja derecha cortada	26g	-	-
	Oreja Izquierda cortada	24g		
	2 orejas cortadas	27g		
Caja 3	Oreja derecha cortada	24g	-	-
	sin marca	25g		

Cuadro 13. Prueba In-vivo de seguridad del compuesto SHAO OUC-ZXQ-03 Día #3

Día #3 Prueba In-vivo de seguridad del compuesto SHAO OUC-ZXQ-03											
#	Ratón	Peso	Temperatura	Consumo de Comida	Consumo de Agua	Temperatura Ambiente del Cuarto	Humedad del Cuarto				
Caja 1	Oreja derecha cortada	25g	31.4°C	11g	5ml	25°C	-				
	Oreja Izquierda cortada	24g	31.8°C								
	2 orejas cortadas	24g	31.8°C								
Caja 2	Oreja derecha cortada	26g	32.4°C	10g	5ml			25°C	-		
	Oreja Izquierda cortada	23g	31°C								
	2 orejas cortadas	27g	29.2°C								
Caja 3	Oreja derecha cortada	23g	32.5°C	9g	2ml					25°C	-
	sin marca	26g	31.4°C								

Cuadro 14. Prueba In-vivo de seguridad del compuesto SHAO OUC-ZXQ-03 Día #4

Día #4 Prueba In-vivo de seguridad del compuesto SHAO OUC-ZXQ-03							
#	Ratón	Peso	Temperatura	Consumo de Comida	Consumo de Agua	Temperatura Ambiente del Cuarto	Humedad del Cuarto
Caja 1	Oreja derecha cortada	24g	31.5°C	12g	12ml	23°C	-
	Oreja Izquierda cortada	24g	31.9°C				
	2 orejas cortadas	24g	29.7°C				
Caja 2	Oreja derecha cortada	26g	29.3°C	12g	12ml		
	Oreja Izquierda cortada	22g	30.4°C				
	2 orejas cortadas	27g	31.5°C				
Caja 3	Oreja derecha cortada	23g	30.7°C	10g	8ml		
	sin marca	26g	30°C				

Cuadro 15. Prueba In-vivo de seguridad del compuesto SHAO OUC-ZXQ-03 Día #5

Día #5 Prueba In-vivo de seguridad del compuesto SHAO OUC-ZXQ-03							
#	Ratón	Peso	Temperatura	Consumo de Comida	Consumo de Agua	Temperatura Ambiente del Cuarto	Humedad del Cuarto
Caja 1	Oreja derecha cortada	26g	30.1°C	13g	16ml	21°C	-
	Oreja Izquierda cortada	24g	30.5°C				
	2 orejas cortadas	24g	30.1°C				
Caja 2	Oreja derecha cortada	25g	30.3°C	12g	14ml		
	Oreja Izquierda cortada	22g	30.5°C				
	2 orejas cortadas	27g	30.1°C				
Caja 3	Oreja derecha cortada	23g	30.8°C	9g	8ml		
	sin marca	26g	29.5°C				

Cuadro 16. Prueba In-vivo de seguridad del compuesto SHAO OUC-ZXQ-03 Día #6

Día #6 Prueba In-vivo de seguridad del compuesto SHAO OUC-ZXQ-03							
#	Ratón	Peso	Temperatura	Consumo de Comida	Consumo de Agua	Temperatura Ambiente del Cuarto	Humedad del Cuarto
Caja 1	Oreja derecha cortada	27g	29.8°C	12g	10ml	-	-
	Oreja Izquierda cortada	24g	29.8°C				
	2 orejas cortadas	24g	30.1°C				
Caja 2	Oreja derecha cortada	26g	29.3°C	12g	10ml		
	Oreja Izquierda cortada	22g	29.3°C				
	2 orejas cortadas	28g	29.4°C				
Caja 3	Oreja derecha cortada	24g	29.9°C	9g	6ml		
	sin marca	26g	29.4°C				

Cuadro 17. Prueba In-vivo de seguridad del compuesto SHAO OUC-ZXQ-03 Día #7

Día #7 Prueba In-vivo de seguridad del compuesto SHAO OUC-ZXQ-03							
#	Ratón	Peso	Temperatura	Consumo de Comida	Consumo de Agua	Temperatura Ambiente del Cuarto	Humedad del Cuarto
Caja 1	Oreja derecha cortada	27g	29.1°C	12g	14ml	22.3°C	53.1%
	Oreja Izquierda cortada	24g	29.7°C				
	2 orejas cortadas	24g	29.7°C				
Caja 2	Oreja derecha cortada	26g	29.7°C	13g	12ml		
	Oreja Izquierda cortada	24g	29.9°C				
	2 orejas cortadas	27g	29.1°C				
Caja 3	Oreja derecha cortada	24g	30.1°C	9g	8ml		
	sin marca	26g	30.1°C				

Cuadro 18. Prueba In-vivo de seguridad del compuesto SHAO OUC-ZXQ-03 Día #8

Día #8 Prueba In-vivo de seguridad del compuesto SHAO OUC-ZXQ-03							
#	Ratón	Peso	Temperatura	Consumo de Comida	Consumo de Agua	Temperatura Ambiente del Cuarto	Humedad del Cuarto
Caja 1	Oreja derecha cortada	27g	30.1°C	11g	14ml	22.6°C	51.9%
	Oreja Izquierda cortada	24g	30.1°C				
	2 orejas cortadas	24g	30.1°C				
Caja 2	Oreja derecha cortada	26g	30°C	11g	10ml		
	Oreja Izquierda cortada	23g	30.5°C				
	2 orejas cortadas	27g	30.1°C				
Caja 3	Oreja derecha cortada	24g	30.6°C	9g	6ml		
	sin marca	26g	29.5°C				

Cuadro 19. Prueba In-vivo de seguridad del compuesto SHAO OUC-ZXQ-03 Día #9

Día #9 Prueba In-vivo de seguridad del compuesto SHAO OUC-ZXQ-03							
#	Ratón	Peso	Temperatura	Consumo de Comida	Consumo de Agua	Temperatura Ambiente del Cuarto	Humedad del Cuarto
Caja 1	Oreja derecha cortada	27g	31.2°C	13g	18ml	23°C	51.3%
	Oreja Izquierda cortada	24g	30.7°C				
	2 orejas cortadas	23g	30.8°C				
Caja 2	Oreja derecha cortada	25g	31.6°C	11g	16ml		
	Oreja Izquierda cortada	24g	31.5°C				
	2 orejas cortadas	27g	31.3°C				
Caja 3	Oreja derecha cortada	23g	30.9°C	9g	12ml		
	sin marca	26g	31°C				

Cuadro 20. Prueba In-vivo de seguridad del compuesto SHAO OUC-ZXQ-03 Día #10

Día #10 Prueba In-vivo de seguridad del compuesto SHAO OUC-ZXQ-03							
#	Ratón	Peso	Temperatura	Consumo de Comida	Consumo de Agua	Temperatura Ambiente del Cuarto	Humedad del Cuarto
Caja 1	Oreja derecha cortada	27g	30.8°C	22g	22ml	22.3°C	52.2%
	Oreja Izquierda cortada	25g	30.6°C				
	2 orejas cortadas	24g	30.2°C				
Caja 2	Oreja derecha cortada	26g	30.2°C	22g	22ml		
	Oreja Izquierda cortada	24g	30.8°C				
	2 orejas cortadas	27g	30°C				
Caja 3	Oreja derecha cortada	24g	30°C	16g	12ml		
	sin marca	27g	30.1°C				

Glosario

- **Anillo.** Estadio más joven de *Plasmodium falciparum* en su desarrollo asexual dentro de los glóbulos rojos. Adquiere este nombre por su forma de anillo. (Platon & Ménard, 2024).
- **Compuesto.** Presenta características inhibitorias ante el crecimiento de un parásito (Pakosz et al., 2021).
- **Control Negativo.** Es el grupo control que no se le agrega ningún tipo tratamiento, ya que se quiere observar como el grupo control se actúa normalmente bajo los mismos parámetros que el resto del estudio (Rockland, 2024).
- **Control Positivo.** Es el grupo control que se le agrega un algo conocido y su resultado es un ya conocido y validado dentro del protocolo a utilizar (Rockland, 2024).
- **Diagnóstico.** Es la identificación de la enfermedad en cuestión al analizar los síntomas que este ocasiona. (Cambridge University Press, 2023).
- **Dilución final.** Solución final, obtenida de la dilución de la muestra madre, para obtener una menor concentración (Libretexts, 2024).
- **Disruptor.** Agente que interfiere o altera alguna estructura o función de una molécula biológica (Oxford, 2012).
- **Endotelio.** Membrana interna en el corazón y en los vasos sanguíneos (Félétou, 2011).
- **Epidemiología.** Se encarga del estudio de los patógenos con relación a su distribución y efectos biológicos. Es decir, La epidemiología se encarga de estudiar la frecuencia de la presencia de una enfermedad en una población y su distribución, con el fin de prevenir futuros casos y la contingencia del mismo (OPS, 2011).

- **Eritrocito (RBC).** Célula sanguínea encontrada en la sangre que contiene proteínas (hemoglobina) y oxígeno a través del cuerpo (Barbalato L & Pillarisetty LS, 2022).
- **Eritrocito infectado (iRBC).** Se refiere a al eritrocito infectado por el parásito *Plasmodium falciparum* (Mata-Cantero et al., 2014).
- **Esquizonte.** Estadio de *Plasmodium falciparum*, en su desarrollo asexual, donde se lleva a cabo una división nuclear que permite la producción de merozoitos (Tibúrcio et al., 2015).
- **Glucólisis.** Proceso de descomposición de la glucosa (Chaudhry & Varacallo, 2023).
- **Hemólisis.** Como lo menciona la palabra "Hemo" se refiere a sangre y "lisis" se refiere a degradación. Esta se refiere a la degradación de los glóbulos rojos (Wahed et al., 2019).
- **Hospedador.** También conocido como huésped, es aquel organismo que se encarga de alojar a otro organismo con el fin de proporcionar un ambiente necesario para crecimiento y reproducción de este (Bush & Friedl, 2023).
- **Hospedador Definitivo.** Organismos que albergara al parasito proporcionando las necesidades básicas necesarias para que este llegue a su madurez y etapa reproductiva. (Bush & Friedl, 2023).
- **Hospedador Intermediario.** Organismo que albergara al parasito monetaria mente para que este cumpla con parte de su ciclo de vida. Por lo general el hospedador definitivo se alimenta del intermediario, facilitando el traslado al siguiente hospedador. (Bush & Friedl, 2023).
- **IC50.** También conocido como "Prueba de Concentración Inhibitoria Media Máxima" se refiere a la concentración total de un compuesto necesaria para inhibir el 50% del crecimiento del parásito (Aykul & Martinez-Hackert, 2016).

- **Isquemia.** Condición adquirida por la falta de suministro de sangre que puede llegar a ocasionar hipoxia (no hay suministro de oxígeno en la sangre) (Fox et al., 2020).
- **Liofilizado.** Preparación de una sustancia que es congelada y deshidratada al vacío. Esto generalmente se realiza para su transporte o la conservación del compuesto (NEB, 2013).
- **Micronema.** Organelo del merozoito encontrado en el complejo apical del merozoito, ayuda a unión y penetración del eritrocito. Este secuestra los receptores del eritrocito y los libera en altas concentraciones en el complejo apical para su ingreso (Spencer et al., 2016).
- **Muestra madre.** Es la solución concentrada utilizada para ser diluida en concentraciones más pequeñas (Libretexts, 2024).
- **Orgánulo Roptrío.** Organelos encontrados en el complejo apical del merozoito, tiene como función asistir en la unión del merozoito a la membrana del eritrocito. Una vez inicie la unión estos organelos se unen para crear un cuello que, con ayuda del micronema, permitirá el ingreso a la célula (Liffner et al., 2021).
- **Parásito.** Organismo que vive dentro o sobre de un hospedador, y se alimenta de esto u obtiene su alimento por él (CDC, 2024).
- **Patología.** Es el estudio de las enfermedades y los síntomas de la misma. En otras palabras, es el estudio de lo que sucede dentro del paciente, sus síntomas y efectos. (Valencia & Ancer, 2014)
- **Potencial de Membrana.** Este se refiere a la capacidad del potencial eléctrico de la célula, ocasionada por su capacidad de concentración y permeabilidad por los iones que se movilizan a través de la membrana (Chrysafides et al., 2023).

- **Prognosis.** Es un pronóstico a futuro de la salud del paciente a base de su enfermedad adquirida, de la persona (edad, sexo y raza) y tratamiento proporcionado (Hansebout et al., 2009).
- **Proteólisis.** Como lo dice la palabra “Proto” de proteínas y “lisis” de lisar. Proteólisis se refiere a la degradación de proteínas en polipéptidos más pequeños o en aminoácidos (Wiita et al., 2014).
- **Punto final Experimental.** Se refiere a cuando se cumplen todos los objetivos experimentales que indican el fin del estudio. Es momento de sacrificar los animales participantes del estudio (Felizardo De Brito et al., 2020).
- **Punto final Humanitario.** Se refiere a la muestra humanitaria que se les da a los animales cuando presentan alguno indicativo de sufrimiento como: diarrea, erizamiento de pelaje, actividad motora, entre otros (Turner et al., 2011).
- **Trofozoíto.** Segundo estadio de Plasmodium F. en su desarrollo asexual. Es la etapa donde el parásito pasa por cambios morfológicos, donde este crece de su forma de anillo y pasa a tomar una forma ligeramente ameboide (Martiney et al., 1996).
- **Vacuola Parasitófora.** Estructura producida por el parásito en la célula huésped que permitirá su desarrollo (Goldberg & Zimmerberg, 2020).
- **Vector.** Organismo vivo, mayormente mosquitos, que transmiten patógenos entre animales y humanos (WHO, 2024).