

Actividad profiláctica causal de híbridos de primaquina. Ríos Orrego A.

**ACTIVIDAD PROFILÁCTICA CAUSAL DE HÍBRIDOS PRIMAQUINA-
QUINOXALINA, EN UN MODELO DE RATÓN INFECTADO CON
ESPOROZOÍTOS DE *Plasmodium yoelii* 17XNL.**



ALEXANDRA MARCELA RÍOS ORREGO

Universidad de Antioquia
Escuela de Microbiología y Bioanálisis
Medellín
2017

**ACTIVIDAD PROFILÁCTICA CAUSAL DE HÍBRIDOS PRIMAQUINA-
QUINOXALINA, EN UN MODELO DE RATÓN INFECTADO CON
ESPOROZOÍTOS DE *Plasmodium yoelii* 17XNL.**

ALEXANDRA MARCELA RÍOS ORREGO

Trabajo de Grado para optar al título de Magister en Microbiología y Bioanálisis

Directora de Tesis:

Adriana Lucia Pabón, PhD

Miembros del comité tutorial

María Agudelo, PhD

Vitelbina Núñez, PhD

Universidad de Antioquia
Escuela de Microbiología y Bioanálisis

Medellín

2017

Nota de Aceptación

Presidente del Jurado

Jurado

Jurado

Medellín, 23 de Mayo de 2017

AGRADECIMIENTOS

A mi familia, por el aliento y el tiempo que me ofrecieron con todo el amor, fundamentales para alcanzar este logro, los amo.

A mi tutora, la doctora Adriana Pabón por su acompañamiento, amistad y aliento.

A los miembros del comité tutorial, doctoras Vitelbina Núñez y María Agudelo, por sus valiosos aportes en la ejecución de este trabajo de investigación.

A los profesores Silvia Blair y Jairo Sáenz, por sus contribuciones a la elaboración de este manuscrito.

A mis amigas Alexa González, Adriana Pabón y Silvia Blair, por ser un soporte emocional en mi vida.

A los todos los integrantes del Grupo Malaria, en especial a aquellos compañeros que hicieron parte de este proyecto o que contribuyeron a la elaboración de este trabajo de investigación: Erika de Ossa, Gustavo Ramírez y Leonardo Bonilla. A Javier Murillo, el veterinario del PECET por su acompañamiento en los ensayos *in vivo*.

Al coordinador del posgrado, profesor Juan Álvaro López y a la secretaria Adriana Agudelo, por su diligencia y colaboración durante mi proceso de formación.

También quiero agradecer a las instituciones:

Grupo Malaria por el apoyo económico y administrativo, para la realización de mi tesis.

Al posgrado en Microbiología y Bioanálisis, de la Universidad de Antioquia, por la ayuda administrativa durante mi formación y por el apoyo económico para la realización de mi pasantía internacional.

Al programa de posgrados de la Universidad de Antioquia, por la beca otorgada para para matricularme en el cuarto semestre de maestría, y por la cofinanciación de mi pasantía internacional.

A los Doctores Carolina Barillas Muri y Alvaro Molina, del Laboratory of Malaria and Vector Research, National Institute of Allergy and Infectious Diseases, National Institutes of Health, Rockville, Meryland, EEUU, por recibirme en su laboratorio durante mi pasantía y compartir sus conocimientos conmigo.

Actividad profiláctica causal de híbridos de primaquina. Rios Orrego A.

Al programa Nacional de Salud de Colciencias por financiar el proyecto en el cual pude realizar mi trabajo de grado (contrato CRP: 2000032497).

CONTENIDO

RESUMEN	11
INTRODUCCIÓN	18
1. OBJETIVOS	23
1.1. OBJETIVO GENERAL	23
1.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	23
2. MARCO TEÓRICO	24
2.1. Generalidades de la Malaria.	24
2.2. Quimioprofilaxis en malaria.....	26
2.2.1. Esquema terapéutico para la evaluación de quimioprofilácticos causales para malaria	27
2.2.2. Factores que influyen la actividad de los quimioprofilácticos causales	28
2.2.3. Quimioprofilácticos causales usados actualmente.	30
2.2.3.1. Primaquina	31
2.2.3.2. Atovacuona/proguanil.....	33
2.2.4 Quimioprofilácticos causales en evaluación en humanos.	35
2.3. Modelos animales usados para la investigación de fármacos con actividad sobre formas hepáticas de <i>Plasmodium spp.</i>	36
2.4. Fármacos híbridos conformados con primaquina.....	40
2.4.1. Híbridos Primaquina-Quinoxalina	41
3. MATERIALES Y MÉTODOS	45
3.1. TIPO DE ESTUDIO.....	45
3.2. REACTIVOS	45
3.2.1. Compuestos híbridos.....	45
3.2.2. Ratones	46
• Aspectos éticos.....	47
3.2.3. Cepa de parásito.	47
3.3. MÉTODOS	48
3.3.1. Evaluación de la actividad citotóxica <i>in vitro</i>	48

3.3.1.1. Descripción del procedimiento para la valoración de la citotoxicidad <i>in vitro</i> de los híbridos quinoxalina- primaquina	48
3.3.2. Evaluación de la actividad quimioprofiláctica causal	50
3.3.2.1. Descripción del procedimiento para la determinación de la actividad profiláctica causal.....	50
3.3.3. Evaluación de la toxicidad aguda del compuesto QX6.....	53
3.3.3.1. Descripción del procedimiento empleado para la evaluación de la toxicidad aguda del compuesto QX6.....	54
3.4. Análisis estadístico	55
4. RESULTADOS	57
4.1. Actividad citotóxica de los híbridos primaquina-quinoxalina sobre células Hepa 1-6 de ratón.....	57
4.2. Actividad profiláctica causal de los híbridos primaquina-quinoxalina en ratones Balb/c.....	57
4.3. Toxicidad aguda del compuesto híbrido QX6 en ratones Balb/c.....	66
7. PERSPECTIVAS	80
ANEXOS.....	81
BIBLIOGRAFÍA	86

LISTA DE TABLAS

	Pag
Tabla 1. Concentración citotóxica 50 de los híbridos primaquina-quinoxalina sobre células Hepa 1-6 de ratón.	57
Tabla 2. Medianas de parasitemia en diferentes días de seguimiento de los ratones tratados con tres dosis de los compuestos híbridos.	58
Tabla 3. Medianas de las parasitemias en diferentes días de seguimiento, en los ratones tratados con cuatro dosis de los compuestos híbridos.	60
Tabla 4. Resumen de los resultados obtenidos durante la evaluación de la toxicidad aguda del compuesto QX6 y su comparación con la primaquina.	67
Tabla 5. Resultados de laboratorio de ratones Balb/c en los que se evaluó la toxicidad aguda del compuesto híbrido QX6.	69

LISTA DE GRÁFICAS

	Pag.
Gráfica 1. Ciclo de vida del <i>Plasmodium spp</i> en el humano.	25
Gráfica 2. Representación gráfica de la quimioprofilaxis causal.	30
Gráfica 3. Estructura de la primaquina.....	31
Gráfica 4. Estructuras de la atovacuona (A) y el proguanil (B)	34
Gráfica 5. Ciclo de vida de <i>Plasmodium yoelii</i> en el ratón.	38
Gráfica 6. Estructura de la quinoxalina	42
Gráfica 7. Estructuras de los compuestos híbridos: A: QX6, B: QX7, C: QX8, D: QX9, E: QX10	46
Gráfica 8. Comparación de las parasitemias en los días 4 y 5, de los grupos de ratones Balb/c infectados con <i>P. yoelii</i> 17XNL y tratados con tres dosis de los híbridos y con primaquina, con el grupo control.	59
Gráfica 9. Comparación de las parasitemias en los días 7 y 14, de los grupos de ratones Balb/c infectados con <i>P. yoelii</i> 17XNL y tratados con tres dosis de los híbridos y con primaquina, con el grupo control.	60
Gráfica 10. Comparación de las parasitemias en los días 4 y 5, de los grupos de ratones Balb/c infectados con <i>P. yoelii</i> 17XNL y tratados con cuatro dosis de los híbridos y con primaquina, con el grupo control.	61
Gráfica 11. Comparación de las parasitemias en los días 7 y 14, de los grupos de ratones Balb/c infectados con <i>P. yoelii</i> 17XNL y tratados con cuatro dosis de los híbridos y con primaquina, con el grupo control.	62
Gráfica 12. Regresión no lineal de los valores promedios de porcentajes de la parasitemia en los diferentes días de seguimiento del compuesto QX6 y de la primaquina con los dos esquemas de tratamiento administrados.	64
Gráfica 13. Porcentajes de inhibición de la parasitemia de los grupos de tratamiento en los diferentes días de seguimiento.	66
Gráfica 14. Comportamiento del peso en los ratones Balb/c no tratados y en los que se evaluó la toxicidad aguda del compuesto QX6 a 300 y 500 mg/kg de peso.	68

LISTA DE ANEXOS

	Pag
Anexo 1. Parasitemia desarrollada en los ratones Balb/c infectados con <i>P. yoelii</i> 17XNL el día 5 de seguimiento, en función de la vía de administración y el número de esporozoítos inoculados	81
Anexo 2. Formas sanguíneas de <i>P. yoelii</i> 17XNL en sangre periférica coloreada con Giemsa.	82
Anexo 3. Cinética de la parasitemia entre los días 2 y 16 de seguimiento de los ratones Balb/c infectados con <i>P. yoelii</i> 17XNL.....	83
Anexo 4. Análisis por citometría de flujo de la sangre de ratones Balb/c.	84
Anexo 5. Correlación entre microscopía y citometría de flujo para la determinación de la parasitemia en los días 4, 7 y 14 de seguimiento.....	85

GLOSARIO DE TERMINOS

- **Biodisponibilidad:** fracción de la dosis de una sustancia absorbida por cualquier vía, que alcanza la circulación sistémica (1).
- **Citotóxico:** que produce daño a la función o a la estructura celular (1).
- **Concentración citotóxica 50:** concentración calculada estadísticamente, de una sustancia en el medio que se espera que produzca daño tóxico sobre el 50% de una población de células, dada bajo un conjunto de condiciones definidas (1).
- **Concentración Inhibitoria 50:** concentración calculada estadísticamente, de una sustancia que se espera inhiba el crecimiento en el 50% de los organismos de experimentación de una población dada, bajo un conjunto de condiciones definidas (1).
- **Esporozoítos:** formas móviles de los parásitos de la malaria que son infectivos para los hospederos mamíferos y son inoculados por hembras de mosquitos al alimentarse de sangre. Los esporozoítos invaden los hepatocitos (2).
- **Esquizontes:** formas maduras de parásitos de la malaria en las células hepáticas (esquizontes hepáticos) o en glóbulos rojos (esquizontes eritrocíticos) que están bajo división celular. Este proceso se llama esquizogonia (2).
- **Falla terapéutica:** falla para eliminar la parasitemia y/o resolver los síntomas clínicos a pesar de la administración de un antimalárico, de forma que mientras que la resistencia puede llevar a falla terapéutica, no todas las fallas terapéuticas son debidas a resistencia. Las fallas terapéuticas también pueden resultar de dosis incorrecta, pobre calidad del medicamento, interacciones con otros medicamentos o deficiencias en la absorción (2).
- **Hipnozoítos:** formas parasitarias hepáticas persistentes del *P. vivax* o *P. ovale* que se mantienen en los hepatocitos del huésped por un intervalo (3-

45 semanas) antes de madurar a esquizontes hepáticos. Estos a su vez liberan merozoítos que infectarán glóbulos rojos. Los hipnozoítos son la fuente de las recaídas (2).

- **Ictericia:** exceso de pigmento biliar (bilirrubina) en la sangre y consecuente depósito en la piel y la esclerótica, que adquieren coloración amarilla. El pigmento proviene de la fragmentación de la hemoglobina, ordinariamente por la destrucción de hematíes en el bazo (2).
- **Merozoítos:** parásitos de la malaria liberados a circulación sanguínea cuando un esquizonte hepático o eritrocítico se rompe. Los merozoítos invaden entonces los glóbulos rojos (2).
- **Periodo pre patente:** tiempo entre la inoculación de esporozoítos y la aparición de parásitos en la sangre y representa la duración de la etapa hepática y el número de merozoítos producidos (3).
- **Porcentaje de inhibición:** tasa media de inhibición del crecimiento específico para la concentración de una sustancia en estudio, en relación con el valor de los controles sin tratamiento. Se representan en una gráfica en función de logaritmo de la concentración (1).
- **Quimioprofilaxis causal:** administración de fármacos para prevenir la infección hepática inicial por *Plasmodium*, actuando sobre los esporozoítos, formas causantes de la infección, o destruyendo los parásitos a nivel hepático, derivados directamente de ellos (4).
- **Quimioprofilaxis supresiva:** administración de un esquema de antimaláricos con efecto sobre formas sanguíneas para evitar el desarrollo de síntomas (5).
- **Quimioprofilaxis terminal:** administración de un esquema de tratamiento con esquizonticidas sanguíneos y con primaquina (esquizonticida tisular), con los cuales a veces se eliminan las formas latentes llamadas hipnozoítos y se evitan las recaídas (5).
- **Recaída:** la reaparición de parasitemia asexual en malaria por *P. vivax* o *P. ovale* derivada de formas hepáticas persistentes. Las recaídas ocurren

cuando la infección sanguínea ha sido eliminada pero los hipnozoítos persisten en el hígado y maduran a esquizontes hepáticos después intervalos variables de tiempo (2).

- **Reinfección:** presentación de parasitemia debido a una nueva infección producto de la picadura de un mosquito infectado con *Plasmodium spp.* (2).
- **Resistencia a medicamentos:** capacidad de los parásitos para sobrevivir y/o multiplicarse a pesar de la administración y absorción de un medicamento dado en dosis iguales o más altas que aquellas usualmente recomendadas y toleradas por el paciente. Estrictamente hablando la resistencia solo puede documentarse en estudios *in vitro*. (2).
- **Tolerancia:** capacidad de un organismo para sobrevivir en presencia de una sustancia tóxica (1).
- **Toxicidad aguda:** capacidad de una sustancia para producir efectos adversos dentro de un corto plazo de tiempo (usualmente hasta 14 días) después de la administración de una dosis única (o una exposición dada) o tras dosis o exposiciones múltiples en 24 horas (6).
- **Toxicidad:** capacidad de una sustancia para producir daño a un organismo vivo, en relación con la cantidad o la dosis administrada o absorbida, la vía de administración y su distribución en el tiempo (dosis única o repetidas). La toxicidad depende del tipo de efecto y de la severidad del daño, del tiempo necesario para producir este efecto y de la naturaleza del organismo afectado (1).
- **Vida media:** tiempo en el cual la concentración de una sustancia se reduce a la mitad, asumiendo un proceso de eliminación de primer orden (1).

ABREVIATURAS

ALT: enzima alanino-aminotransfera

AQC: actividad quimioprofiláctica causal

BUN: nitrógeno Ureico, del inglés Blood Urea Nitrógeno.

CC₅₀: concentración citotóxica 50.

CD45: antígeno común de leucocitos.

CDC: Centro para la Prevención y el Control de Enfermedades de los EEUU, del Inglés: Centers for Disease Control and Prevention

CI₅₀: concentración inhibitoria 50.

CV: coeficiente de variación.

DMEM F12: medio de cultivo Dulbecco's Modified Eagle Medium: Nutrient Mixture F-12.

DMSO: Dimetilsulfóxido.

DS: desviación estándar

FC: formas circulantes.

FDA: Oficina de Administración de Medicamentos y Alimentos de los EEUU, del inglés: Food Drug Administration.

FEE: formas exo eritrocíticas

FH: formas hepáticas

FS: formas sanguíneas.

HB: Hemoglobina.

IC95%: intervalo de confianza del 95%.

INS: Instituto Nacional de Salud de Colombia.

IP: inoculación Intraperitoneal

IV: inoculación intravenosa

OMS: Organización Mundial de la Salud.

PQ: Primaquina.

QC: quimioprofilaxis causal.

QdNO: Quinoxalina 1, 4-di-N-óxidos.

qRT-PCR: reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real.

RIQ: rango intercuartílico.

RESUMEN

Introducción: la malaria o paludismo es una enfermedad infecciosa de importancia epidemiológica causada por parásitos del género *Plasmodium*, que en el ciclo de vida en el hospedero mamífero presenta una fase inicial asintomática (hepática) en la que los parásitos se multiplican en este órgano y posteriormente pasan a la circulación e invaden y se multiplican en los eritrocitos y causan síntomas (fase sanguínea). La quimioprofilaxis causal (QC) en malaria se usa actualmente en viajeros no inmunes con el propósito de prevenir la infección inicial a nivel hepático actuando sobre los esporozoítos de *Plasmodium spp*, formas causantes de la infección, o destruyendo los parásitos derivados directamente de éstos. Sin embargo, recientemente en el marco de los programas liderados por la Organización Mundial de la Salud (OMS) se ha considerado la QC como una estrategia para reducir los casos de malaria en las zonas endémicas y de esta manera apuntar a su control, eliminación o erradicación. **Objetivo:** con el fin de aportar al conocimiento para el desarrollo de nuevos medicamentos antimaláricos, se evaluó *in vivo* el efecto quimioprofiláctico causal de cinco compuestos híbridos primaquina-quinoxalina (QX6, QX7, QX8, QX9 y QX10). **Metodología:** la actividad profiláctica de los híbridos se determinó en ratones Balb/c infectados con 5000 esporozoítos de *P. yoelii* 17XNL en dos esquemas terapéuticos de una dosis diaria de 100 mg/kg. La citotoxicidad de los híbridos se determinó mediante la prueba MTT y además se evaluó la toxicidad aguda en ratones Balb/c aplicando la metodología descrita en las guía OCDE. **Resultados:** El híbrido QX6 aunque no previno la infección hepática, logró inhibir el desarrollo de estas formas del parásito en un 95,97% y la extensión de 24 horas del periodo pre patente del parásito en sangre periférica, sin embargo la actividad profiláctica causal (AQC) de este híbrido no fue superior a la de la primaquina. El híbrido QX6 *in vitro* presentó una CC₅₀: 33,46 µg/mL: no citotóxico (equivalente a 71,65 µM), comparada con CC₅₀: 18,38 µg/mL: toxicidad leve 18,38 (equivalente a 40,37 µM) presentada por la primaquina,

medicamento usado actualmente para el tratamiento de la malaria. La toxicidad aguda del híbrido QX6 fue evaluada en ratones Balb/c y se encontró que a una dosis de 300 mg/kg de peso, no se presentan signos de toxicidad, y cuando se administró a 500 mg/kg de peso, este híbrido fue menos tóxico que la primaquina.

Conclusiones: con base en estos resultados, se sugiere a QX6 como una potencial molécula candidata a convertirse en una alternativa para el control de la malaria. Es importante continuar con la determinación del perfil farmacocinético del compuesto QX6 para ajustar el esquema profiláctico causal, administrando dosis más altas a las evaluadas en este estudio y con una frecuencia acorde a dicho perfil.

PALABRAS CLAVE: Quimioprofilaxis causal, Malaria, *in vivo*.

INTRODUCCIÓN

La malaria es una enfermedad parasitaria que durante años ha representado una amenaza para la Salud Pública mundial (7). La causan protozoos del género *Plasmodium*, transmitidos al hombre por la picadura de mosquitos infectados del género *Anopheles* (8).

El ciclo de vida de *Plasmodium* en el hospedero mamífero se desarrolla en dos fases, una preeritrocítica o hepática, que es asintomática y que su duración depende del hospedero. Esta fase se inicia con la invasión del esporozoíto al hígado (forma infectante que inocular el mosquito) y allí el parásito desarrolla la primera esquizogonia, en la que se transforma de trofozoíto a esquizonte. Las formas del parásito que hacen parte de esta fase del ciclo se conocen como exoeritrocíticas (FEE) o formas hepáticas (FH). Durante la fase hepática, *P. vivax* y *P. ovale* pueden desarrollar unas formas metabólicamente quiescentes, conocidas como hipnozoítos, que posteriormente (meses o años después) por factores aún sin dilucidar, son reactivadas y producen las recaídas. La segunda fase del ciclo de vida, es llamada eritrocítica, circulante o sanguínea, y se inicia cuando el esquizonte hepático libera los merozoítos que pasan a la circulación periférica e invaden los glóbulos rojos, donde se desarrollan y multiplican continuamente causando la sintomatología de la malaria. A las formas del parásito que participan en esta etapa del ciclo se les denomina formas eritrocíticas (FE), sanguíneas (FS) o circulantes (FC) (8) y el tiempo entre la entrada del esporozoíto y la detección de los parásitos en sangre periférica se conoce como periodo pre patente (3).

Dada la ausencia de una vacuna eficaz y la poca eficiencia de las medidas de protección personal como el uso de mosquiteros y repelentes, para evitar la infección malárica, se han desarrollado estrategias de prevención como la quimioprofilaxis, la cual es definida como "el uso de un fármaco antes de la infección hepática o sanguínea, con el objetivo de evitar las manifestaciones clínicas" (9). La

elección del fármaco quimioprofiláctico está determinado por los informes de resistencia del parásito a los antimaláricos, los cuales determinan la política terapéutica en cada zona endémica y por el estadio del parásito contra el que se dirige. La quimioprofilaxis que se usa para prevenir la infección malárica inicial en el hígado, y que actúa sobre los esporozoítos o destruyendo las formas parasitarias derivadas directamente de ellos, es conocida como quimioprofilaxis causal (QC) (9).

Entre los medicamentos usados para la QC, el único tratamiento disponible comercialmente que actúa sobre los esporozoítos impidiendo la entrada de *Plasmodium spp.* al hígado y sobre la primera generación de trofozoítos hepáticos e hipnozoítos, evitando las recaídas, es la primaquina (10, 11). Este medicamento es una 8 aminoquinolina, de uso limitado en personas con deficiencia de glucosa 6 fosfato deshidrogenasa (G6PD) porque puede causar anemia hemolítica, debido a su acción pro oxidativa. Esto hace que su uso sea restringido en grupos poblacionales de alto riesgo como las mujeres embarazadas y los niños menores de 6 meses, dado que en la actualidad no se cuenta con una prueba de laboratorio estandarizada que evalúe si la actividad enzimática en el feto o el niño es deficiente o no, para poder administrar el fármaco de forma segura (2).

Entre 1995 y 2001, en diferentes partes del mundo se hicieron estudios clínicos en humanos con asignación aleatoria que demostraron la efectividad de la primaquina como QC, tanto para *P. vivax* como para *P. falciparum* a la dosis recomendada por la OMS de 30 mg/día o según el peso corporal (0,5 mg/kg/día) por un número muy variable de días de seguimiento (4-90 semanas) (12-15). Tales estudios hallaron entre 88 % y 96 % de protección para *P. falciparum* y entre 85 % y 99 % para *P. vivax*, determinada por el seguimiento de la parasitemia con gota gruesa, luego de la salida del individuo del área endémica, en zonas de alta (13-15) o baja transmisión de malaria (12). Sin embargo, la efectividad de la primaquina ha sido puesta en duda por los reportes de tolerancia de los hipnozoítos de *P. vivax* (16).

La resistencia a la primaquina ha sido informada a nivel mundial y se ha determinado mediante el seguimiento de la parasitemia entre 90 y 365 días posteriores a la salida del paciente de la zona endémica y se ha encontrado entre un 0 y un 32% de recaídas, a pesar de la adherencia al tratamiento (17). No existe en la actualidad un medicamento que pueda usarse como alternativa a la primaquina para el tratamiento de los hipnozoítos. La combinación atovacuona-proguanil tiene acción quimioprofiláctica causal y al igual que la primaquina, inhibe el desarrollo de formas hepáticas (trofozoítos) pero no tiene acción contra los esporozoítos ni sobre los hipnozoítos, lo que significa que no evita las recaídas en la infección por *P. vivax* (18, 19).

Dado que solo se dispone actualmente de dos medicamentos con AQC y que son de eficacia limitada para algunas formas hepáticas, que están siendo tolerados por los plasmodios y/o son tóxicos, existe la necesidad de desarrollar nuevos medicamentos eficaces y seguros, que puedan ser usados masivamente en poblaciones endémicas para malaria (20, 21), para contribuir al cumplimiento de los objetivos de la OMS 2016-2030 de controlar, eliminar y erradicar la malaria a nivel mundial, ya que esta organización propone como un importante componente en el logro de sus objetivos, buscar alternativas terapéuticas de tipo profiláctico que prevengan la transmisión, eviten las recaídas, impidan la infección por cualquier tipo de *Plasmodium* y sean costo-efectivas y seguras en población vulnerable como son las mujeres embarazadas y los niños, para poder administrarlas en masa sin restricciones (22) .

Los estudios de compuestos con AQC requieren mayores recursos técnicos que los de la fase sanguínea, pues es necesaria la obtención de esporozoítos viables, que solo se logra luego de un ciclo exitoso del *Plasmodium spp.* en el mosquito *Anopheles*. Por el contrario, los estudios de compuestos en la fase eritrocítica solo necesitan formas sanguíneas que se obtienen del hospedero vertebrado o de un

cultivo continuo de *P. falciparum* en glóbulos rojos, el cual es más sencillo obtener. El desarrollo de este cultivo *in vitro* explica en parte por qué hoy se tienen más medicamentos para tratar las formas sanguíneas que para prevenir la infección hepática, además del hecho de que no se conozcan con exactitud los mecanismos de acción y blancos terapéuticos de los medicamentos usados rutinariamente para tratar las FEE del parásito (23). El desconocimiento que se tiene de la biología del parásito y de su ciclo de desarrollo en el hígado, se debe además a las dificultades para trabajar con los hepatocitos y esporozoítos de *Plasmodium* de mamífero *in vitro*, debido a la ausencia de un cultivo continuo (esquizogonia única por experimento) y a los bajos porcentajes de infección de hepatocitos que se obtienen por ensayo (alrededor del 1%) al utilizar un alto número de esporozoítos (más de 10000) (24).

Los modelos para evaluar la AQC *in vivo* son costosos porque requieren de instalaciones locativas adecuadas y de personal altamente calificado para manejar los animales. Entre estos modelos el más usado y extrapolable a humanos es el modelo de ratón infectado con *P. yoelii* o *P. berghei*, pues estas especies de parásitos tienen una secuencia nucleotídica similar a los plasmodios de humanos hasta en un 70% (25, 26), son comercialmente fáciles de obtener y los ratones son los hospederos naturales de estos parásitos, que comparados con otros mamíferos, se manipulan más fácilmente y se reproduce de forma rápida con grandes camadas, lo que facilita su disponibilidad.

En vista de la necesidad de desarrollar medicamentos para el tratamiento de las formas hepáticas de *Plasmodium* se han explorado los compuestos híbridos como una alternativa para su obtención (27). Estas moléculas se caracterizan por tener dos farmacóforos unidos, cada uno idealmente con un mecanismo de acción diferente y que potencian su efecto terapéutico (28). Capela y colaboradores en 2011 (29) y Lodige *et al.*, en 2013 (30), evaluaron en ratones infectados con esporozoítos de *P. berguei*, la actividad antiplasmodial multi estadio (sanguíneos y

hepáticos) de moléculas híbridas conformadas por primaquina unida a artemisininas y primaquina-cloroquina, respectivamente. En estos dos estudios se demostró que estos híbridos reducen la carga parasitaria en el hígado, pero esta disminución es menor comparada con la primaquina sola, la cual fue usada como control. Además, el híbrido primaquina-cloroquina fue más tóxico que la primaquina y en el estudio de Capela y colaboradores, la toxicidad del híbrido no fue evaluada.

Por otro lado, investigadores de la Unidad de I+D+i de la Universidad de Navarra y del Grupo Malaria de la Universidad de Antioquia, nos propusimos desarrollar compuestos híbridos con la versatilidad de la primaquina y con igual o mayor efecto profiláctico causal que la molécula sola, pero no tóxicos, con el objetivo de que puedan ser usados de manera segura y eficaz en el tratamiento de la malaria. Se sintetizaron cinco híbridos conformados por la primaquina (molécula que se sabe tiene acción sobre FEE) y la quinoxalina, una molécula a la cual se le ha comprobado su acción antiplasmodial sobre formas sanguíneas de *P. falciparum* (31). En este trabajo de investigación se evaluó la actividad quimioprofiláctica causal de los híbridos primaquina-quinoxalina en ratones Balb/c infectados con esporozoítos de *Plasmodium yoelii* 17XNL, mediante su administración oral, y además se determinó la actividad citotóxica de los híbridos sobre células hepa 1-6 de ratón y la toxicidad aguda en ratones Balb/c del compuesto QX6, el cual tuvo un efecto quimioprofiláctico causal.

1. OBJETIVOS

1.1. OBJETIVO GENERAL

Evaluar la actividad profiláctica causal de híbridos primaquina-quinoxalina en un modelo de ratón infectado con esporozoítos de *Plasmodium yoelii* 17XNL.

1.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar *in vitro* la actividad citotóxica de los híbridos primaquina-quinoxalina y de la primaquina sobre células Hepa 1-6 de ratón.
- Comparar la parasitemia de ratones infectados con esporozoítos de *P. yoelii* 17XNL que recibieron tratamiento profiláctico con los híbridos primaquina-quinoxalina y con la primaquina, con ratones infectados sin tratamiento.
- Evaluar *in vivo* la toxicidad aguda de los híbridos primaquina-quinoxalina que tengan efecto profiláctico.

2. MARCO TEÓRICO

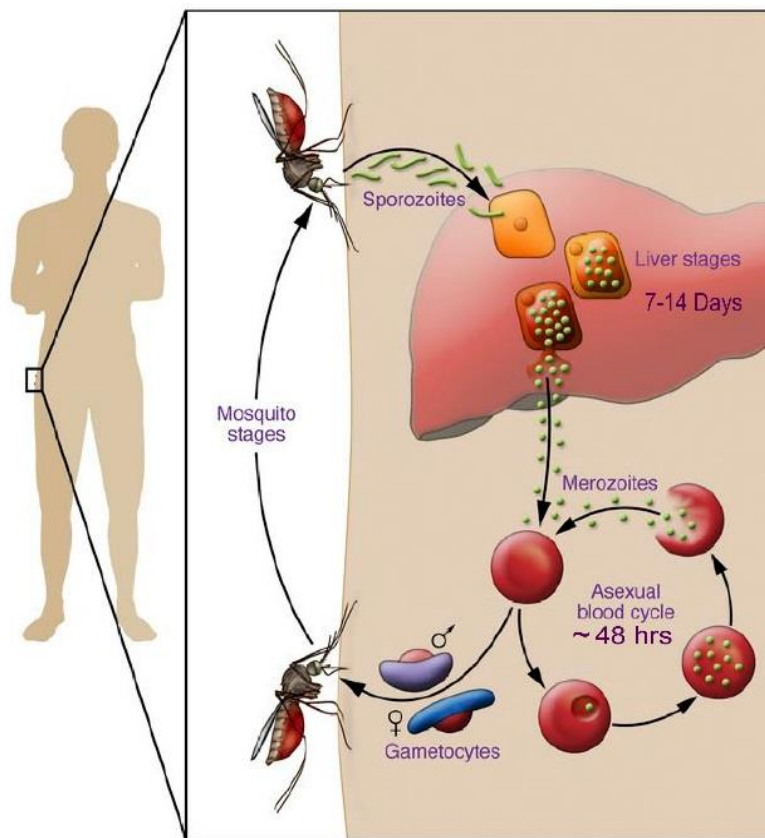
2.1. Generalidades de la Malaria.

La malaria es una enfermedad causada por protozoos del género *Plasmodium*, los cuales son transmitidos al hospedero mamífero a través de la picadura de mosquitos hembra del género *Anopheles* infectados. Los *Plasmodium* que frecuentemente parasitan al hombre son: *P. vivax* y *P. falciparum* (7), y en menor medida lo hacen: *P. malariae*, *P. ovale* y *P. knowlesi* (8); además, en 2014 se publicó el primer caso de infección humana por *P. cynomolgi* adquirida naturalmente (32). Las características clínicas de la malaria dependen de la especie de *Plasmodium* que produzca la infección, pero en el ser humano se presenta básicamente con un cuadro clínico clásico que consiste en escalofrío, fiebre, cefalea y sudoración (2).

La Organización Mundial de la Salud (OMS) para el año 2016 calculó que cerca de 3 200 millones de personas en 97 países estaban en riesgo de padecer malaria y que en el mundo ocurrieron 212 millones de casos y 429 000 muertes (7). En el año 2016, en el territorio colombiano se notificaron al Instituto Nacional de Salud (INS) a través del Sistema de vigilancia en Salud pública (Sivigila), 83 356 casos de malaria y la distribución por especie correspondió a 47 497 casos (57 %) por *P. falciparum*, seguido por *P. vivax* con 33 055 casos (39,7%) y 2 804 casos (3,3 %) de infecciones mixta (*P. falciparum* y *P. vivax*) (33). Además se confirmaron 19 muertes a causa de esta enfermedad en el territorio colombiano. Estas cifras muestran la importancia que tiene esta patología en el panorama de la morbimortalidad a nivel local y mundial (33).

El ciclo de vida de los parásitos que infectan mamíferos inicia con la entrada de los esporozoítos al hospedero vertebrado, mediante la picadura del mosquito *Anopheles* infectado. Estos esporozoítos entran al hígado y en un periodo comprendido entre 7 y 14 días en el humano completan el ciclo hepático, pasando

por los estadios de trofozoíto y esquizontes, y liberando entre 10000 y 30000 merozoítos (8). *P. vivax* y *P. ovale*, desarrollan hipnozoítos en el hígado. El ciclo eritrocítico de los Plasmodium humanos tarda alrededor de 48 horas y se inicia cuando los merozoítos que salen del hígado invaden los eritrocitos maduros (*P. falciparum*) o los reticulocitos (*P. vivax*) en sangre periférica. Dentro de los eritrocitos, una pequeña fracción de los parásitos se diferencian en gametocitos masculinos o femeninos, lo cuales son tomados por el mosquito durante la alimentación de sangre, donde se reproducirán sexualmente (2) (ver gráfica 1).



Gráfica 1. Ciclo de vida del *Plasmodium spp* en el humano.

Los mosquitos *Anopheles* inyectan los esporozoítos en la piel del humano. Los parásitos viajan a través del torrente sanguíneo hasta el hígado, donde atraviesan varios hepatocitos antes de establecer una infección. Dentro del hepatocito final el parásito se transforma en trofozoíto y finalmente en esquizonte, que contiene los merozoítos. Esta fase del ciclo tarda entre 7-14 días. Finalmente los merozoítos salen del hígado al torrente sanguíneo e inician la fase sanguínea, infectando los eritrocitos (*P. falciparum*) o reticulocitos (*P. vivax*). Dentro de estas células sanguíneas

una pequeña fracción de los parásitos se diferencian en gametocitos masculinos o femeninos, lo cuales son tomados por el mosquito durante la alimentación de sangre, donde se reproducirán sexualmente. Adaptado de Raphemot, 2016 (34).

2.2. Quimioprofilaxis en malaria

La quimioprofilaxis en el contexto de la malaria, es definida como: "la administración de un fármaco de manera que su concentración sanguínea se mantiene por encima del nivel que inhibe el crecimiento de los parásitos en el estadio eritrocítico o pre eritrocítico de su ciclo de vida, durante el período en riesgo" (35). Actualmente, ésta es la herramienta preventiva más efectiva para evitar la infección y/o la enfermedad por malaria. El esquema terapéutico de los quimioprofilácticos se debe adaptar a las características del individuo como la condición genética de la enzima G6PD, embarazo, edad, a las características genéticas de los *Plasmodium* presentes en la zona malárica que se desea visitar, es decir si existen reportes de resistencia o no a los medicamentos a utilizar, y a la forma o fase del ciclo del parásito que se quiere inhibir (36). Con base en este último aspecto la quimioprofilaxis en malaria puede clasificarse en: 1. **Quimioprofilaxis supresiva (QS)** o sanguínea, que elimina los parásitos que pasan a circulación luego de completar la fase hepática. Este tipo de quimioprofilaxis evita el desarrollo de la enfermedad, es decir las manifestaciones clínicas, pero no evita la infección (5). 2. **Quimioprofilaxis terminal (QT)**, en la que se administra primaquina, que es el medicamento antiplasmodial sobre las formas latentes llamadas hipnozoítos, para evitar las recaídas y 3. **Quimioprofilaxis causal (QC)**, que previene la infección inicial, actuando sobre los esporozoítos, formas causantes de la infección, o destruyendo los parásitos a nivel hepático, derivados directamente de ellos (35).

Por recomendación de la OMS en 2015, la quimioprofilaxis para malaria está indicada solo en viajeros no inmunes que se desplazan a zonas endémicas y en la población africana que se encuentra en mayor riesgo de enfermar o morir a causa de esta enfermedad, como las mujeres embarazadas y los niños menores de 5 años. Además, dada la disminución de la morbimortalidad por malaria a nivel

mundial, la OMS propone investigar nuevos medicamentos eficaces y seguros que puedan ser usados en masa, para eliminar y erradicar la malaria (37).

2.2.1. Esquema terapéutico para la evaluación de quimioprofilácticos causales para malaria

James en 1931, fue el primero en la historia de la terapéutica malárica, en proponer un esquema quimioprofiláctico causal al evaluar la plasmocina, una 8 aminoquinolina de la cual se deriva la primaquina, usando una dosis previa a la infección con los esporozoítos de *P. relictum* en aves y 5 dosis posteriores a la infección (36). Posteriormente, Arnold en 1954 aplicó estos hallazgos suministrando primaquina a una concentración de 10, 15 o 30 mg por día a voluntarios humanos que vivían en zona endémica de Panamá. Estos tratamientos fueron suministrados el día previo a la infección (-1) y 6 días posteriores a la infección con esporozoítos de *P. vivax*. Los individuos permanecieron protegidos de la enfermedad por un periodo entre 190 y 450 días y los porcentajes de protección fueron de 30% para los individuos que recibieron 10 mg del medicamento, de 20% para los que tomaron 15 mg y de 100% para los que fueron tratados con 30 mg (38). Este mismo autor evaluó la dosis de 30 mg en un esquema de 4 días en 9 individuos humanos, los cuales infectó con esporozoítos de la cepa P-F-6 de *P. falciparum* y encontró que esta dosis fue 100% efectiva porque previno el desarrollo de la parasitemia. En este mismo estudio, para establecer en que día del ciclo hepático del parásito, actuaba la primaquina y si presentaba efecto profiláctico causal, se administraron a tres grupos de humanos 30 mg de primaquina en el día uno, tres o cinco pos infección con los esporozoítos y se logró determinar que solo la dosis dada 24 horas después de la inoculación de los esporozoítos protegió al 100% de los individuos del grupo 1 de desarrollar parasitemia (10 de 10), 9 voluntarios de 10 del grupo 2, evitaron la infección al tomar la dosis en el día 3 y ninguno de los participantes que tomó el medicamento el día 5 fue protegido (39).

Posteriormente Peters en 1970, evaluó en ratones el mismo esquema recomendado por James en 1931, pero tratando los días -1, 0 y +1 y es ésta la publicación que se toma de referencia en los estudios donde se evalúa la quimioprofilaxis causal de un compuesto (40).

2.2.2. Factores que influyen la actividad de los quimioprofilácticos causales

Desde 1973, cuando se iniciaron los estudios quimioprofilácticos causales con *Plasmodium yoelii*, la OMS publicó un documento en el que se mencionan los factores que pueden influenciar su evaluación (41):

- **Tamaño del inóculo de los esporozoítos:** En la evaluación de quimioprofilácticos causales, la actividad de los compuestos puede correlacionarse con el número de esporozoítos inoculados. Este hecho se puede evidenciar posteriormente por la intensidad de la infección en sangre o por la protección ejercida por el compuesto. Ploemean (42) y Fink (41), administraron primaquina a ratones infectados con *P. yoelii* y demostraron que a mayor número de esporozoítos inoculados, mayor es la parasitemia en sangre periférica. Sin embargo, el número de esporozoítos usado generalmente para estos estudios profilácticos (5000-1000000) está lejos de parecerse a lo que ocurre en la naturaleza, ya que se cree que en una picadura de mosquito *Anopheles* infectado, se inyecta entre 10 y 100 esporozoítos y para igualar el número de parásitos usado en un estudio, un individuo debería ser picado por alrededor de 50 mosquitos infectivos a la vez, lo que es prácticamente imposible que ocurra en realidad. Inoculando esta cantidad tan alta de esporozoítos se podría estar subestimando la actividad quimioprofiláctica causal de muchos compuestos. Este hecho fue comprobado por Capela y colaboradores en 2011, cuando evaluaron la AQC del híbrido primaquina-artemisininas y encontraron que dando una dosis de 26,5 $\mu\text{mol/kg}$ del compuesto e inocular por picadura de 10 *Anopheles*

stephensi infectados con *P. berguei*, ninguno de los ratones desarrolla parasitemia, en cambio a la misma dosis inoculando 10000 esporozoítos, este compuesto tuvo solo un 60% de efectividad.

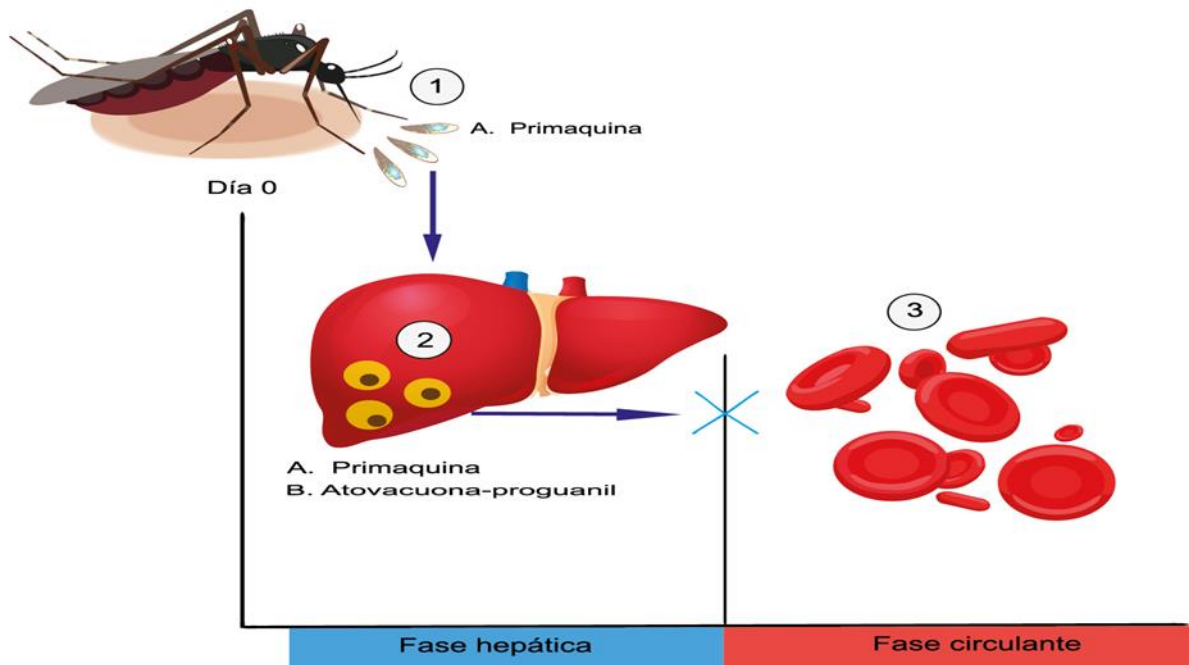
Desde 1970 las publicaciones de Fink y Greenberg (41, 43), pusieron de manifiesto la importancia de estandarizar la cantidad de esporozoítos para cada especie de *Plasmodium* para los estudios de la actividad profiláctica causal, dadas las diferencia en la tasas de infectividad que puede haber entre especies (esporozoítos de *P. yoelii* son 2000 veces más infectivos que los de *P. berguei*).

- **Momento del ciclo hepático en el que se administra y absorbe el fármaco:** Se ha sugerido que el momento de administración del fármaco, su absorción y vida media, antes o después de la inoculación de los esporozoítos, puede Influenciar el efecto de medicamentos profilácticos sobre las FH (43), pues a diferencia de la fase circulante, los parásitos que se desarrollan en el ciclo hepático de los *Plasmodium* de roedores, muestran un marcado sincronismo y se cree que estas formas empiezan a desarrollarse simultáneamente luego de llegar al hígado (24).
- **Duración del ciclo hepático en el modelo en el que se evalúa la actividad quimioprofiláctica causal:** De los plasmodios normalmente utilizados en los modelos murinos, se cree que *P. yoelii* presenta el desarrollo hepático más rápido y en comparación con el humano, tiene una diferencia de 5 días con respecto a *P. falciparum* y de mínimo 9 días comparado con *P. vivax*. Este hecho podría estar influyendo en los resultados de la evaluación de QC, pues se sabe que los roedores en general tienen tasas metabólicas más aceleradas, comparadas con las de los seres humanos. Estas diferencias metabólicas también podrían estar influyendo en el metabolismo del fármaco. Sin embargo, se han publicado estudios en los que una dosis de primaquina

de 30 mg/kg de peso en ratones y en humanos es suficiente para evitar la parasitemia, pero otros en los que la dosis de primaquina para lograr un efecto profiláctico causal en humanos, monos y ratones es diferente, necesitándose hasta de 6 veces más medicamento en ratones, comparado con la dosis para humanos (41).

2.2.3. Quimioprofilácticos causales usados actualmente.

Entre los medicamentos usados para la quimioprofilaxis causal, el único disponible comercialmente hoy, y que actúa sobre los esporozoítos y, por tanto, en el desarrollo de *Plasmodium spp.* a nivel hepático, es la primaquina. La combinación de atovacuona más proguanil también actúa sobre las formas hepáticas en desarrollo (trofozoítos), pero no tiene acción contra los esporozoítos (18, 19) (ver gráfica 2).



Gráfica 2. Representación gráfica de la quimioprofilaxis causal.

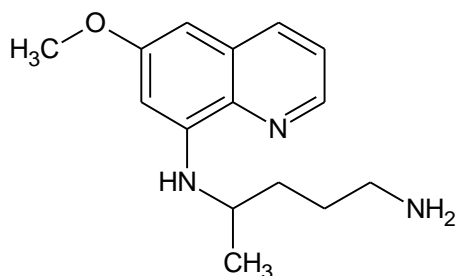
1. Inoculación de los esporozoítos por el mosquito. 2. Infección y desarrollo de la fase hepática. 3. Los quimioprofilácticos causales (A y B) evitan el paso del parásito a la circulación periférica y la

invasión de los glóbulos rojos. A. Primaquina: actúa sobre los esporozoítos (1) inhibiendo la infección y sobre los estadios hepáticos (2) evitando su desarrollo B. Combinación atovacuona-proguanil: actúa sobre los estadios hepáticos (2) inhibiendo el desarrollo. Fuente: Rios- Orrego, 2017 (44).

A continuación se describen los medicamentos disponibles para usarse como QC:

2.2.3.1. Primaquina

Es una 8-aminoquinolina (Gráfica 3) que actúa sobre los esporozoítos de todas las especies de *Plasmodium*, esteriliza los gametocitos de *P. falciparum* (formas infectantes para el vector) e inhibe el desarrollo de las formas hepáticas como trofozoítos, en todas las especies del parásito y de los hipnozoítos de *P. vivax* (10).



Gráfica 3. Estructura de la primaquina.

Fuente: elaboración del autor

Este grupo de moléculas tienen en general un metabolismo rápido (vida media de eliminación entre 4 y 6 horas); producen efectos adversos gastrointestinales, como dolor abdominal y vómito, y hemólisis en personas con deficiencia de glucosa-6-fosfato-deshidrogenasa (G6PD) (23). Esta enzima se encuentra en todas las células, es la responsable de catalizar la primera reacción de la vía de las pentosas fosfato y está implicada en la defensa de la célula contra el estrés oxidativo (7). Los individuos con deficiencia de esta enzima en sus eritrocitos tienen disminuida la generación de NADPH reducido, lo que lleva a que no se reduzca el glutatión oxidado y por esto son incapaces de contrarrestar estímulos oxidativos (8). En estas

condiciones, las 8-aminoquinolinas generan un estado de estrés oxidativo intraeritrocítico que puede desencadenar la lisis de estas células o su eliminación por el bazo, produciendo efectos secundarios como anemia hemolítica grave.

La primaquina fue desarrollada en 1940 por las fuerzas armadas estadounidenses y la FDA (*Food and Drug Administration*) la aprobó en 1952 para el tratamiento de la malaria. Durante 60 años, este fármaco ha sido y sigue siendo el único medicamento licenciado para utilizar de forma quimioproliférica en humanos contra los esporozoítos, las formas hepáticas de todas las especies de *Plasmodium*, los hipnozoítos de *P. vivax* y *P. ovale* y los gametocitos de *P. falciparum* (45). Se desconoce su mecanismo de acción, pero se cree que el blanco biológico es la mitocondria del parásito y que actúa específicamente interfiriendo con la función antioxidante de la ubiquinona en el transporte de electrones de la cadena respiratoria, lo que genera un ambiente oxidativo que altera el potencial de membrana, inhibiendo el intercambio iónico y produciendo la muerte del parásito (46). Otro mecanismo de acción propuesto para la primaquina es la producción dentro de la célula hospedera de peróxidos, superóxidos y radicales libres hidroxilados, mediada por sus metabolitos 5-hidroxiprimaquina y 6-metoxi-8-aminoquinolina, que generan un ambiente oxidativo perjudicial para el parásito (47).

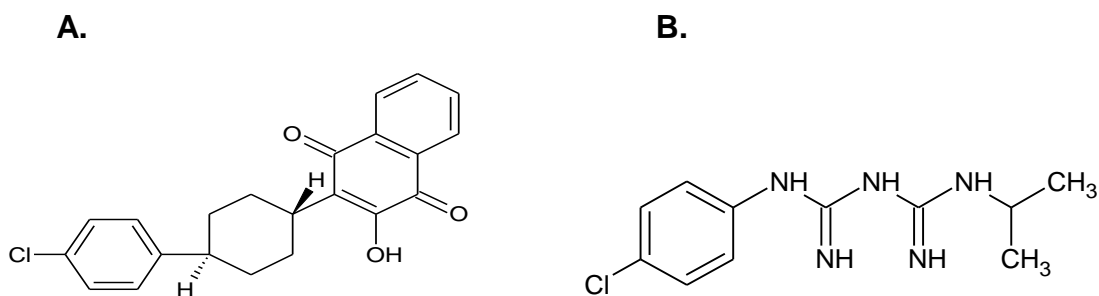
La efectividad de la primaquina como QC se comprobó en 1955 en un estudio en prisioneros humanos en Estados Unidos, que fueron sometidos a picaduras de mosquitos *Anopheles* infectados con *P. falciparum*. A estos individuos se les suministró primaquina a la dosis diaria de 0,5 mg/kg de peso por 3 o 5 días, por vía oral, y se pudo observar que fue eficaz solo cuando se administró entre los días 1 y 3 después de la picadura del mosquito (39). Estos resultados fueron las pistas iniciales para considerar la prevención de la infección en humanos con este medicamento.

Cuando se compara la AQC de la primaquina con la actividad profiláctica supresiva de medicamentos antiplasmodiales como mefloquina y doxiciclina en viajeros

israelíes no inmunes, solo 5,7% de los individuos que tomaron primaquina desarrollaron malaria al regresar a sus lugares de origen, mientras que el 52% y 53% de los que se enfermaron de malaria habían tomado, respectivamente doxiciclina y mefloquina (13). Aunque se ha demostrado que la primaquina es efectiva como QC, tanto para *P. vivax* como para *P. falciparum* (12-15), desafortunadamente ha habido reportes de emergencia de la falla terapéutica de la primaquina en pacientes con *P. vivax* que recibieron el régimen anti recaídas recomendado por la OMS de 15 mg / día durante 14 días. Los ensayos clínicos en los que se vigila la toma del medicamento y se miden las concentraciones del medicamento, son la base metodológica para vigilar la falla terapéutica. Sin embargo, en estos ensayos, la identificación de recaídas se confunde con la reinfección, es decir que distinguir un episodio de malaria debido a una recaída producida por la ineficacia del tratamiento con primaquina sobre los hipnozoítos, se confunde con un nuevo episodio producido por una nueva infección producto de una picadura de un mosquito *Anopheles* infectado en zona endémica y aunque actualmente se han venido desarrollando métodos de genotipificación para distinguir estos dos eventos, aún no se tiene un marcador de resistencia para *P. vivax*, lo que hace que actualmente solo se hable de falla terapéutica o tolerancia de esta especie a la primaquina, pero no de resistencia (48).

2.2.3.2. Atovacuona/proguanil

La atovacuona, una hidroxinaftoquinona, y el proguanil, una biguanida (Grafica 4), componen esta combinación de medicamentos que actúa sobre trofozoítos de *Plasmodium*, tanto hepáticos como eritrocíticos (29).



Gráfica 4. Estructuras de la atovacuona (A) y el proguanil (B).

Fuente: elaboración del autor

Gracias a la similitud estructural con la ubiquinona, la atovacuona actúa como inhibidor competitivo de esta molécula e interfiere en el transporte de electrones en el complejo bc1 mitocondrial, disminuyendo el potencial de membrana; además, por esta misma ruta metabólica se altera la biosíntesis de la pirimidina, vía de la que depende el parásito para sintetizar *de novo* sus ácidos nucleicos. Se cree que el proguanil potencia este mecanismo de acción, pero esta hipótesis no se ha comprobado aún; lo que se ha logrado comprobar es que el proguanil inhibe la acción de la enzima dihidrofolato reductasa lo que tiene como resultado la reducción de los cofactores de tetrahidrofolato que son necesarios para el metabolismo celular y la síntesis del ADN (49)

La combinación de la atovacuona/proguanil dada a una dosis de 250 mg de atovacuona y 100 mg de clorhidrato de proguanil, por día durante 20 semanas a individuos residentes de áreas no endémicas, tuvo una eficacia protectora del 84% (intervalo de confianza de 95%:44% -95%) para la malaria por *P. vivax*, del 96% para *P. falciparum* (IC 95%.: 72% -99%) y de 93% (IC 95%: 77%–98%) para ambas especies (50).

2.2.4. Quimioprofilácticos causales en evaluación en humanos.

En la actualidad hay solo dos compuestos con actividad antiplasmodial sobre los parásitos de estadios hepáticos, que se encuentran en fase clínica de evaluación en humanos: la tafenoquina y el KAF156.

La tafenoquina es una 8 aminoquinolina, que está siendo evaluada como un sustituto de la primaquina y actualmente se encuentra en estudios en fase III (10, 51). Se ha demostrado que esta molécula tiene una vida media más larga que la primaquina (entre 14 y 16 días) (51), lo que representa una clara ventaja sobre la primaquina (vida media 4-6 horas). Sin embargo, al igual que con el uso de la primaquina, se pueden presentar efectos adversos como molestias gastrointestinales en igual o mayor proporción, y las personas con deficiencia de glucosa 6 fosfato deshidrogenasa, también desarrollan hemólisis (52).

Por su parte, al compuesto de tipo imidazolpiperazina, KAF156, se le evaluó su AQC en ratones Suizos y presentó una efectividad del 100% a una dosis de 10 mg/kg administrada por vía oral dos horas antes de la infección con 10^5 esporozoítos de *P. berghei* por vía intravenosa (53). White *et al.*, recientemente evaluaron la seguridad, tolerabilidad, farmacocinética y eficacia de esta molécula en estudios de fase II en pacientes infectados con *P. vivax* y *P. falciparum* tratados con dos esquemas: el primero con una dosis diaria de 400 mg/kg de peso durante tres días y el segundo a dosis única de 800 mg/kg. Se concluyó en este estudio que la dosis de tres días es 100% efectiva y que la dosis única, solo tuvo una eficacia del 67%, pero se presentaron efectos adversos en ambos grupos de tratamiento como: bradicardia 62%, hipokalemia 50%, aumento de las transaminasas hepáticas hasta en el 33% de los pacientes y vómito en el 27%, lo que podría sugerir que el medicamento es tóxico y por ende, poco seguro (54). En conclusión, por el momento no se tiene un compuesto que además de eficaz, sea seguro para usar en la población en general.

2.3. Modelos animales usados para la investigación de fármacos con actividad sobre formas hepáticas de *Plasmodium spp.*

Históricamente, el descubrimiento de la fase extra eritrocítica comienza con Grassi en 1898, bajo la sospecha de que los parásitos que producían la malaria podían alojarse en otros órganos (55), pues se sabía que solo 10 días después de la inoculación de los esporozoítos, aparecían las formas circulantes. Fue hasta 1898 que MacCallum observó *P. relictum* en el hígado y el bazo de aves infectadas (56) y posteriormente, a finales de la década de 1930 pudo completarse la descripción del ciclo de la malaria aviar, y concluirse que tenía una fase de multiplicación en diversas células nucleadas. En ese momento, cerca de 15000 compuestos fueron evaluados como terapéuticos antimaláricos en aves, más específicamente en *P. gallinaceum* (57).

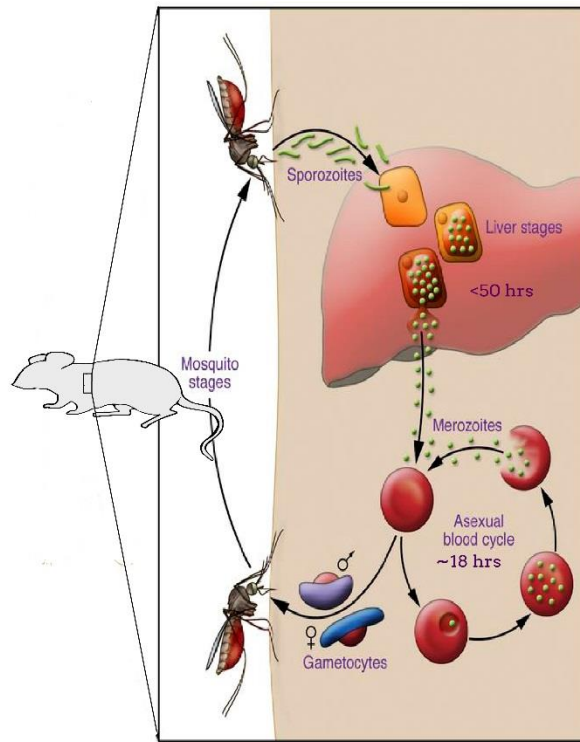
El descubrimiento en 1948 de *P. berghei* (58) y en 1950 de *P. yoelii* (57) en ratas (*Thamnomys rutilans*) en la Republica centro africana, posibilitaron el desarrollo de los fármacos antiplasmodiales, ya que este modelo representaba menos costos y fácil manipulación. El modelo murino orientó los estudios biológicos del parásito en esta época y en 1960 fueron usados monos *rhesus* (*Macaca mulatta*) infectados con *P. cynomolgi* para probar fármacos activos contra *P. vivax*, pues este parásito de monos es el único modelo animal que al igual que el humano, desarrolla hipnozoítos (55).

Posteriormente *P. yoelii* se logró adaptar a la especie *Mus musculus*, un ratón de laboratorio, facilitando desde entonces la investigación con esta especie de *Plasmodium*. Se han descrito tres subespecies de *P. yoelii* han sido descritas: *P. yoelii killicki*, *P. yoelii nigeriensis* y *P. yoelii yoelii*. Entre las tres subespecies de *P. yoelii* existen diferencias patogénicas, y en la subespecie *P. yoelii yoelii*, se han logrado identificar dos cepas con diferencias muy marcadas con respecto a su virulencia: *P. yoelii* 17XNL, que no es letal, la parasitemia alcanza valores entre 10

y 30% y es generalmente auto controlada por el ratón, pasando de una infección aguda a una forma crónica de la enfermedad, gracias a la respuesta inmune del hospedero, mientras que la cepa *P. yoelii* 17XL, es letal y produce la muerte del ratón entre la primera o segunda semana pos infección (59).

En general, *P. yoelii* presenta una etapa del ciclo hepático que dura menos de 50 horas (aproximadamente 48 horas) y en sangre periférica desarrolla un ciclo asincrónico con una periodicidad promedio de 18 horas y produce aproximadamente entre 18 y 22 merozoítos por esquizonte sanguíneo (ver gráfico 5) (59). Por las características anteriormente mencionadas, *P. yoelii yoelii* 17XNL es una cepa de *Plasmodium* murino muy usada en el desarrollo de profilácticos como vacunas y medicamentos, ya que su ciclo de vida es corto y el hospedero fácilmente manipulable. Además, es una importante herramienta para el tamizaje de medicamentos porque permite un seguimiento prolongado, gracias a que es una cepa no letal. (60).

A.



Gráfica 5. Ciclo de vida de *Plasmodium yoelii* en el ratón.

Los mosquitos *Anopheles* inyectan los esporozoítos en la piel del ratón y estos viajan a través del torrente sanguíneo hasta el hígado, donde atraviesan varios hepatocitos antes de establecer una infección. Dentro del hepatocito final, el parásito se transforma de trofozoíto hasta esquizonte, que contiene los merozoítos. Hasta este momento esta fase del ciclo tarda menos de 50 horas. Finalmente los merozoítos salen del hígado al torrente sanguíneo e inician la fase sanguínea, infectando los reticulocitos. Cada esquizogonia sanguínea tarda aproximadamente 18 horas. Dentro de los reticulocitos, una pequeña fracción de los parásitos se diferencia en gametocitos masculinos o femeninos, los cuales son tomados por el mosquito durante la alimentación de sangre, donde se reproducirán sexualmente. Adaptado de Raphemot, 2016 (34).

Hasta hoy, el uso de animales de experimentación ha sido de gran apoyo para generar conocimiento en áreas como la farmacología, dado que para garantizar que un compuesto que está siendo evaluado para uso en humanos, es seguro y eficaz, es necesario probarlo en un sistema biológico completo, y se debe comenzar dicha evaluación, en animales (61). Según el código de Nuremberg “cualquier experimento hecho en humanos, debe estar diseñado con base en resultados de investigación hecha en animales” (62). En el caso de la investigación farmacológica

para el desarrollo de medicamentos con actividad antiplasmodial, los roedores y los primates no humanos son los modelos animales más usados para evaluar estos compuestos contra formas plasmodiales hepáticas (24) y entre ambos modelos, el de primates es el que más se asemeja al humano, gracias a la similitud genética tanto de los hospederos, como de los parásitos que los infectan (26). Esta hipótesis se ha comprobado porque grandes simios, incluyendo gorilas y chimpancés, son huéspedes naturales de *P. falciparum* y *P. vivax* (25) y a su vez, los humanos se infectan con *P. knowlesi* y *P. cynomolgy* que infectan regularmente monos, lo que hace que la malaria pueda ser una enfermedad zoonótica. Gracias a la susceptibilidad a la infección de los chimpancés, por las mismas especies de *Plasmodium* que infectan a los seres humanos, éstos se constituyen en valiosos modelos de investigación, pues en este modelo animal se observaron por primera vez los hipnozoítos de *P. vivax* (19) y se identificaron los loci asociados a resistencia a los fármacos (57). Desafortunadamente la investigación con monos requiere de infraestructura especializada, costosa y de personal altamente calificado, lo que limita su uso.

En la actualidad, los modelos murinos de malaria son una importante herramienta para el estudio de la fase hepática, porque se sabe que *P. bergeri*, *P. chabaudi* y *P. yoelii* tienen una identidad proteica y nucleotídica cercana al 70%, con respecto a *P. falciparum*, (26) lo que lo hace un modelo animal válido para llevar a cabo estudios de medicamentos, previos en humanos. Sin embargo, con la necesidad de optimizar este modelo y tener resultados más extrapolables a lo que ocurre en el ser humano, se ha tratado de humanizar estos animales mediante el trasplante de tejidos humanos, que son soportados gracias a modificaciones genéticas y anatómicas y es así como estos ratones humanizados se han convertido en una herramienta biológica para estudiar la fase hepática de la malaria. Sin embargo, la investigación con estos animales representa altos costos y queda el interrogante de si un animal modificado genéticamente para soportar el trasplante de un tejido extraño (inmunosuprimido), podría ser un buen modelo para evaluar la eficacia

antiplasmodial de un fármaco, dada la importancia que tiene la respuesta inmune en el desenlace terapéutico (63).

2.4. Fármacos híbridos conformados con primaquina

Los híbridos como su nombre lo indica, son la unión de dos farmacóforos con el objetivo de crear una molécula biológicamente más efectiva que sus componentes por separado (61) y su uso se ha considerado como una estrategia novedosa para evitar el desarrollo de resistencia de los microorganismos (64). En malaria también se ha evaluado la actividad antiplasmodial multi estadio (sanguíneos y hepáticos) de estos compuestos tanto *in vitro* como en modelos murinos (29, 30, 65). El híbrido primaquina- artemisininas mostró actividad sobre cepas resistentes de *P. falciparum* (W2) (IC₅₀:13 y 9 nM), un poco superiores a la artemisinina (8 nM) y la primaquina (3,3 µM). *In vivo*, se administraron 26,5 µmol/kg del híbrido a ratones por vía IP, tres horas antes de infectarlos con 10000 esporozoítos de *P. berghei*. 48 horas posteriores a la inoculación de los esporozoítos, los ratones fueron sacrificados y se determinó que las formas en hígado, medidas por qRT-PCR, habían sido inhibidas con respecto al grupo control no tratado, en aproximadamente un 75%. Sin embargo, en los ratones tratados con la primaquina se inhibió el 100% de las formas hepáticas, desafortunadamente en el artículo no se especifica la concentración de primaquina usada en estos ensayos. Otro grupo de 6 ratones se infectó con la misma cantidad de esporozoítos y se trataron con 65,9 µmol/kg a dosis única y se determinó la parasitemia mediante extendido de sangre periférica coloreado con Giemsa. Tres de 6 ratones mostraron parasitemia el día 5 de seguimiento, y posteriormente se negativizaron, lo que hace pensar que el efecto inhibitorio del híbrido pudo estar más relacionado con la acción antiplasmodial sobre las formas sanguíneas del parásito, que sobre las hepáticas (29).

Otro híbrido conformado por la primaquina y que ha sido evaluado para su actividad quimioproliférica causal es el conformado por la cloroquina y la primaquina. Este

compuesto fue administrado por vía intraperitoneal o subcutánea a concentraciones de 60 mg/kg los días -2, -1 y 0. Este último día se inyectaron 10000 esporozoítos en la vena de la cola 1 h después de la administración de la dosis final del compuesto. La parasitemia fue monitoreada mediante extendido de sangre periférica teñida con Giemsa. El híbrido administrado por vía IP, causó un efecto antiplasmodial que se evidenció porque la parasitemia solo apareció el día 12 post infección, mientras que en los ratones no tratados se hizo evidente al día 5. Cuando se administraron 60 mg/kg de peso por vía subcutánea, todos los ratones desarrollaron parasitemia y no hubo ninguna diferencia con el grupo control no tratado, en cambio a una concentración mayor (90 mg/kg), el 66% de los ratones no presentaron parásitos en sangre periférica. Cuando el híbrido se dio a dosis superiores a 90 mg/kg produjo toxicidad letal en los animales (30) .

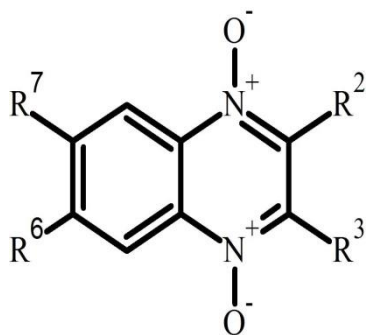
El tercer híbrido que ha sido evaluado *in vivo* fue el conformado por la primaquina y la pirimetamina. Este compuesto se evaluó en ratones C57Bl/6J infectados con 5000 esporozoítos de *P. berghei* cepa ANKA, a una concentración de 50 mg/kg, los cuales fueron administrados por vía oral, 8 horas antes de la infección, inmediatamente después y 24 horas después. A pesar de tener actividad *in vitro* sobre formas sanguíneas de *P. falciparum* en un rango entre 1,93 y 6,46 mM, estos híbridos no mostraron actividad profiláctica *in vivo* (65) .

2.4.1. Híbridos Primaquina-Quinoxalina

Las moléculas híbridas primaquina-quinoxalina se sintetizaron por primera vez en la Universidad de Navarra, España, en la Unidad I+D+i, mediante reacciones de oxidación y reducción que permitieron la combinación de fragmentos moleculares, mediante conectores diversos. Estos compuestos no habían sido probados antes.

Quinoxalina: La quinoxalina es un compuesto heterocíclico que contiene un anillo de benceno y un anillo de pirazina (ver gráfica 6) y representa una

estructura base que proporciona la posibilidad de un gran número de modificaciones dirigidas. Derivados de los compuestos a base de quinoxalina tienen una amplia gama de propiedades biológicas prometedoras, por lo que se han convertido en la base del diseño de nuevos fármacos con una amplia actividad biológica. Se sabe que la oxidación de ambos nitrógenos del anillo de pirazina para obtener Quinoxalina 1, 4-di-N-óxidos (QdNO), es la responsables de dicha actividad, entre ellas, la actividad antiplasmodial (66).



Gráfica 6. Estructura de la quinoxalina.

Fuente: elaboración del autor

Los derivados de quinoxalina han sido evaluados sobre formas sanguíneas de *P. falciparum* y se han obtenido resultados prometedores, tanto en cepas sensibles (3D7), como en cepas resistentes (FCR-3) (3D7 $IC_{50}=0,24\mu M$ y FCR-3 $IC_{50}=2,8 \mu M$ (31) y FCR3 $IC_{50}= 5,8 \mu M$ (67).

Los mecanismo de acción de los derivados de quinoxalina, no han sido muy estudiados, pero se sabe que son compuestos que actúan creando un ambiente pro oxidativo mediante la producción de radicales libres que producen rupturas en el DNA ya que los grupos nucleofílicos de la desoxirribosa y de las bases nitrogenadas quedan expuestos al ataque electrofílico. Las especies reactivas del oxígeno que participan en estos procesos aún no han sido identificadas, como tampoco la enzima que participa en este proceso y que representaría su blanco terapéutico (68). Sin

embargo, Brizuela *et al.*, en 2014 evaluaron el conoidin ((2,3-bis(bromometil)-1,4- dioxido-quinoxalina), un compuesto derivado de QdNO, y lograron establecer que produce daño oxidativo por la acumulación de radicales libres al inhibir la Peroxiredoxin-2 (Prx2). El eritrocito humano contiene abundante peroxiredoxina-2 (Prx2), una enzima antioxidante que lo protege del entorno pro-oxidante, controlando los niveles de peróxido. *P. falciparum* importa esta enzima para degradar los peróxidos generados durante su metabolismo celular, especialmente de la hemoglobina. Cuando se inhibe esta peroxiredoxina el parásito no es capaz de reproducirse (69).

El mecanismo de acción de los compuestos Quinoxalina 1, 4-di-N-óxido, también se ha relacionado con su citotoxicidad, pues se sabe que estos pueden producir radicales de oxígeno que causan daño genotóxico en células HepG₂ (70). Sin embargo, la citotoxicidad parece depender de los sustituyentes que se pongan a la molécula. Quiliano *et al.*, comprobaron que un compuesto hidrazina quinoxaline 1,4-di-N-oxido es altamente selectivo (IS>86) y no citotóxico (CC₅₀:>100µM (31).

Como resultado de diferentes proyectos de investigación, la Unidad de I+D+i de la universidad de Navarra ha sintetizado diferentes series de derivados de 1,4-di-N-óxido de quinoxalina con una gran variedad de sustituyentes en las posiciones 2, 3, 6 y 7 (ver gráfica 6). Estas sustituciones se hicieron porque se podría esperar que las quinoxalina análogas de quinolinas antimaláricas, tuvieran actividad antiplasmodial. Jaso *et al.*, en 2003, han estudiado la influencia de los grupos 1,4-di-N-óxido en el anillo de quinoxalina con respecto a la actividad antiplasmodial, confirmando su importancia en el aumento de dicha actividad (71).

Los sistemas de quinoxalina bien oxidados o reducidos, unidos a los fragmentos de primaquina serían sistemas híbridos que potencien la eficacia de ambos

fragmentos. Los híbridos evaluados en este estudio fueron conformados por un anillo quinoxalínico enlazado a la primaquina mediante el grupo amino, dando como resultado la formación de una amida como conector de unión covalente entre las dos moléculas.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

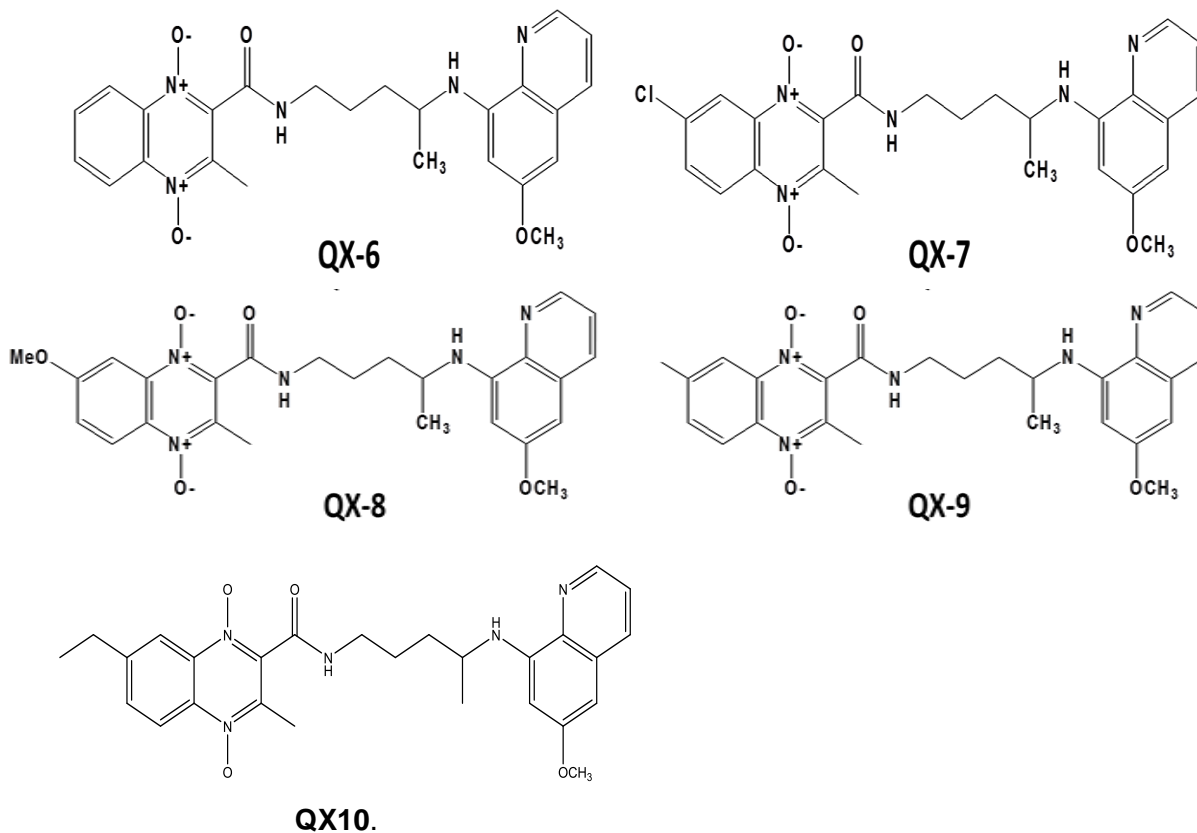
3.1. TIPO DE ESTUDIO: El estudio desarrollado es de tipo experimental.

3.2. REACTIVOS

Los reactivos usados en este trabajo como el cloruro de sodio, glutamina, primaquina difostato al 98%, glutaraldehído, Tritón X-100 y medio de cultivo DMEM-F12 fueron de la casa comercial SIGMA®. El suero bovino fetal se obtuvo de MICROGEN; la ribonucleasa A de QIAGEN; el metanol, dimetilsulfoxido (DMSO) y el colorante Giemsa fueron de MERCK. Otros reactivos como la penicilina/estreptomina de GIBCO; el Sybr Green de LABELING & DETECTION y el anticuerpo Anti-mCD45 se obtuvo de la casa comercial R & D SYSTEMS.

3.2.1. Compuestos híbridos:

En la Unidad I+D+i de la Universidad de Navarra, en España, se sintetizaron cinco compuestos híbridos con las siguientes estructuras (Gráfica 7):



Gráfica 7. Estructuras de los compuestos híbridos: A: QX6, B: QX7, C: QX8, D: QX9, E: QX10.

Fuente: elaboración del autor

3.2.2. Ratones: Se emplearon ratones sanos de la cepa Balb/c de entre 6 y 7 semanas de edad, machos y hembras de 20 ± 2 g de peso. Estos ratones se compraron en Charles River® Laboratories International, EEUU y fueron mantenidos en el bioterio de la Sede Investigación Universitaria (SIU), bajo las siguientes condiciones ambientales:

Macroambiente

- Temperatura de 28 °C, controlada
- Humedad relativa de 70 % controlada
- Aireación en 14-20 cambios de aire/ hora con filtros HEPA
- Iluminación artificial con lámpara luz día, 12h luz/ 12h oscuridad.
- Zona aislada de ruidos y olores.

Microambiente

- **Cajas:** Plásticas de polipropileno de 20X25X20 cm, las cuales fueron esterilizadas mediante autoclave. Los teteros y demás implementos fueron desinfectados con solución de hipoclorito de sodio a una concentración de 200 ppm, y luego del proceso de lavado se airearon hasta el secado completo.
- **Alimentación:** Los animales se alimentaron a voluntad con concentrado marca Rodentina “PURINA” y agua esterilizada mediante autoclave.
- **Encamado:** viruta de madera previamente cernida y esterilizada. El lecho de las camas se cambió dos veces a la semana para evitar acumulación de materia orgánica en descomposición.

- **Densidad del alojamiento:** se alojaron máximo 5 animales por caja.

Los ratones fueron manipulados por un veterinario, el cual supervisó diariamente el estado de salud de los animales. Como criterios de punto final, se estableció una parasitemia de 40% y/o si los animales tenían señales de sufrimiento, según la evaluación del veterinario. Para la eutanasia se aplicó el método de cámara de CO₂, aprobado por el comité de ética de la SIU, el cual reduce al máximo el dolor y el estrés de los animales.

- **Aspectos éticos**

Todos los procedimientos con los ratones se hicieron acatando la LEY 84 DE 1989 (diciembre 27), por la cual se adopta el Estatuto Nacional de Protección de los Animales, se crean unas contravenciones y se regula lo referente a su procedimiento y competencia. CAPITULO VI: Del uso de animales vivos en experimentos e investigación. Este proyecto fue aprobado por Comité de Ética para la Experimentación con Animales de la Universidad de Antioquia en su sesión del 22 de junio de 2012.

3.2.3. Cepa de parásito: Para los diferentes experimentos en los que se evaluó el efecto profiláctico causal, se usaron esporozoítos de la cepa no letal de *Plasmodium yoelii* 17XNL. Estos esporozoítos fueron comprados a la empresa Sanaria® en EEUU y transportados y conservados en nitrógeno líquido (aproximadamente -190 °C) en el laboratorio del Grupo Malaria.

3.2.4. Hepatocitos: Las células Hepa 1-6 (células derivadas de hepatoma de ratón) fueron compradas al laboratorio American Type Culture Collection® (ATCC) y transportadas y conservadas en nitrógeno líquido (aproximadamente -190 °C) en el laboratorio del Grupo Malaria.

3.3. METODOS

3.3.1. Objetivo específico 1: evaluación de la actividad citotóxica de los híbridos primaquina-quinoxalina sobre células Hepa 1-6 de ratón

La citotoxicidad de los híbridos quinoxalina- primaquina se evaluó sobre la viabilidad y proliferación *in vitro* de la línea celular Hepa 1-6 (células de hepatoma de ratón), porque el hepatocito constituye la primera célula hospedera para el *Plasmodium* en el ratón. Este método se fundamenta en la reducción del bromuro 3-(4,5 dimetiltiazol-2il)-2,5-difenil tetrazolio (MTT), descrito por Mosmann (72), el cual revela daños celulares a nivel mitocondrial. El MTT de color amarillo es reducido por las células metabólicamente activas, en parte, por la acción de enzima succinato deshidrogenasa, generando equivalentes reducidos tales como NADH y NADPH que dan como resultado la formación de cristales de formazán, un compuesto de coloración violeta que es solubilizado y cuantificado por espectrofotometría (72).

Descripción del procedimiento

Las células Hepa 1-6 fueron mantenidas en cultivo a 37 °C con 5% de CO₂, en medio de cultivo Dulbecco's Modified Eagle Medium: Nutrient Mixture F-12 (DMEM F-12) Sigma®, suplementado con suero fetal bovino (SFB) al 10%. Para evaluar el efecto citotóxico de los compuestos híbridos se tomaron células de un cultivo con confluencia del 80% y se contaron en cámara de Neubauer para posteriormente sembrar 2x10⁵ células/pozo en 100 µL de DMEM F-12 en platos de 96 pozos. Las células se incubaron durante 24 horas para permitir la formación de la monocapa, a las mismas condiciones de temperatura y concentración de CO₂ antes descritas para su mantenimiento. Las soluciones madre de los compuestos se prepararon en dimetilsulfoxido (DMSO) al 96%, a una concentración de 10 mg/mL. La concentración final de DMSO en los ensayos fue de 0,5%, la cual se comprobó en experimentos previos, que no tiene efecto citotóxico sobre las células. A partir de las soluciones madre, se hicieron las diferentes diluciones en el medio DMEM F-12

suplementado, poniendo en cada pozo 100 μ L de los compuestos híbridos a 7 concentraciones seriadas desde 100 μ g/mL hasta 1,612 μ g/mL. Estas concentraciones se seleccionaron porque se consideró la clasificación de citotoxicidad según Zofou *et al.*, que se muestra más adelante, y que contempla un rango que entre 1 y 30 μ g/mL. Los platos se incubaron por 48 horas a 37 °C y posteriormente, se agregaron 30 μ L de MTT a una concentración de 2 mg/mL a cada pozo y se incubaron nuevamente a 37°C por 4 horas. Pasado este tiempo se eliminó el sobrenadante y se agregó 130 μ L de DMSO al 96% para permitir que los cristales del MTT se disolvieran, se incubaron nuevamente los platos durante 20 minutos a temperatura ambiente y se mezcló suavemente. La absorbancia de cada pozo se leyó en un espectrofotómetro marca Thermo Scientific Multiskan FC Multiskan FC® a 570 nm.

Para cada ensayo se utilizaron como control de crecimiento, células cultivadas bajo las mismas condiciones en ausencia del compuesto híbrido y cada concentración fue evaluada por duplicado en dos ensayos independientes. La concentración citotóxica 50 (CC₅₀), es decir, la concentración del compuesto que mata el 50% de las células hepáticas, se determinó al comparar la absorbancia obtenida en los pozos control, con la de los tratamientos.

Los datos obtenidos de las absorbancias, se analizaron con el programa GraphPad Prism™, versión 5.01. Se calculó el promedio y la desviación estándar de las dos CC₅₀ obtenidas en los experimentos y la citotoxicidad se clasificó según Zofou *et al.*, en cuatro categorías: Altamente tóxicos (CC₅₀ < 1 μ g/mL), moderadamente tóxicos (CC₅₀ >1 hasta 10 μ g/mL), citotoxicidad leve (CC₅₀:11-30 μ g/mL) y potencialmente no tóxicos (CC₅₀>30 μ g/mL) (73).

3.3.2. Objetivo específico 2: evolución de la actividad profiláctica causal de los híbridos primaquina-quinoxalina en ratones Balb/c.

Para evaluar la actividad profiláctica causal de los híbridos se siguió el método de Peters 1970 (40) modificado, el cual consiste en administrar el compuesto el día -1 (24 horas antes de la infección con los esporozoítos), día 0 (día de la infección) y 24 horas posteriores a la infección. Se considera que una sustancia tiene efecto profiláctico causal si inhibe la infección o el desarrollo de formas hepáticas de *Plasmodium* (4). Para esta investigación se emplearon dos esquemas terapéuticos, uno administrando 100 µL del compuesto y los controles por 3 días: -1, 0 y día +1 (24 horas después de la infección). En el segundo esquema se dio además de los días anteriormente descritos, otra dosis 48 horas después de la infección (día +2). Para ambos esquemas los ratones fueron aleatoriamente asignados a los grupos de tratamiento y a los grupos control.

Descripción del procedimiento:

Administración del tratamiento: los compuestos híbridos se administraron a una concentración de 100 mg/mL, disueltos en DMSO al 100%, por vía oral mediante una sonda nasogástrica de calibre G24, siempre a la misma hora cada día. En el esquema dado en tres días, se conformaron cuatro grupos de cuatro ratones a los que se les suministraron por grupo de tratamiento, uno de los híbridos: QX6, QX7, QX8 y QX9. Para el esquema dado en cuatro días, además de los cuatro compuestos híbridos antes mencionados, se evaluó el compuesto QX10 a la misma concentración que los demás híbridos.

- **Grupos control:** como control negativo se usó DMSO al 100%. En el esquema de tratamiento de tres días, se inició con 4 ratones, pero para el día 3, sin explicación aparente, murió uno, quedando el grupo conformado solo por 3 animales y para el esquema de cuatro días se emplearon 5 ratones. Como control positivo se usó la primaquina, la cual se suministró a una

concentración de 20 mg/Kg de peso del ratón (n=4) en el esquema de tratamiento de tres días y a una concentración y a una concentración de 30 mg/kg de peso (n=5) en el esquema de cuatro días.

- **Infección de los ratones con los esporozoítos:** se hizo en el día 0, inoculando por vía intravenosa (IV) en la vena de la cola del ratón, 50 μ L de una solución que contenía 5×10^3 esporozoítos disueltos en PBS suplementado con 10% de suero de ratón separado por centrifugación, luego de extraer sangre total a un ratón mediante punción cardíaca. Esta cantidad de esporozoítos y la vía de administración se definieron en el proceso de estandarización previo a la realización de los ensayos (Anexo 1 y 2).
- **Seguimiento de la parasitemia:** se realizó los días 3, 4, 5, 7 y 14, se tomó una gota de sangre de la punta de la cola del roedor, mediante un pequeño corte con tijeras estériles y se extendió sobre una lámina porta objetos (ver anexo 2). El seguimiento de la parasitemia se estandarizó previamente, donde se logró determinar que la cepa utilizada para los ensayos es detectable microscópicamente entre el día 3 y 4 pos infección y que entre los días 15 y 16, algunos ratones la autocontrolan (ver anexo 3). El porcentaje de parasitemia se determinó por dos técnicas: microscopía y citometría de flujo y los valores por ambas técnicas estuvieron correlacionados (ver anexo 4).

Microscopia: se realizaron extendidos de sangre periférica con una gota de sangre del ratón sobre una lámina portaobjetos. Cuando la muestra estuvo seca, se fijó con metanol al 100% y luego se coloreó con Giemsa a una dilución 1:10 en agua de grifo. La cantidad de parásitos en sangre periférica se determinó observando 10 campos microscópicos con objetivo de 100X, en los cuales se contaron los glóbulos rojos parasitados y no parasitados. Para calcular el porcentaje de parasitemia se contaron en promedio 5000 glóbulos rojos por muestra en los 10 campos microscópicos y para

determinar una muestra como negativa, se leyeron todos los campos microscópicos óptimos, es decir, en los que los eritrocitos estaban ligeramente separados.

Citometría de flujo: para realizar esta técnica se siguió el procedimiento modificado descrito por Barkan y colaboradores (74). Se usaron 2 gotas de sangre total (aproximadamente 2 μ L), que fueron mezcladas con una solución de 200 μ L de PBS heparinizado para evitar su coagulación. Como los reticulocitos, que están en mayor cantidad en ratones que en humanos, generan falsos positivos en la determinación de la parasitemia, por su tamaño parecido al del glóbulo rojo y a que su RNA también puede intercalarse con el Sybr Green (fluorocromo usado para su marcaje), las muestras tuvieron un tratamiento previo al marcaje con este fluorocromo, de la siguiente manera: En primer lugar, las células se fijaron con 1 mL de glutaraldehído al 0,04% en PBS e incubación a 4°C durante 1 hora. Luego la muestra fue centrifugada a 2000 rpm por 5 minutos y después se descartó el sobrenadante. Posteriormente, las células se re-suspendieron en 500 μ L de Tritón X-100 para facilitar la disolución de proteínas integrales de la membrana celular y se dejó esta solución a temperatura ambiente por 10 minutos. Pasado este tiempo, se centrifugaron por 5 minutos a 2000 rpm y una vez descartado el sobrenadante, se re-suspendieron en 200 μ L de PBS. Para lograr la hidrólisis del RNA se adicionaron 2 μ L de Ribonucleasa A sigma ® (RNAsa-A) a una concentración de 1mg/mL, se incubaron las muestras durante 1 hora a 37°C, para luego de dos lavados con PBS, se adicionaran 20 μ L de Sybr Green (concentración 0,05x) y 2 μ L del anticuerpo anti-m CD45 marcado con Alofocianina (APC) para marcar y eliminar la población de glóbulos blancos que podrían interferir con la determinación de la parasitemia, ya que también sus ácidos nucleicos son marcados con Sybr Green. Finalmente, las muestras se incubaron por 20 minutos en la oscuridad.

Para determinar la parasitemia en las muestras se usó un citómetro de flujo marca BD Accuri® C6 Flow Cytometer USA. El láser azul se utilizó para la detección del Sybr Green a 488 nm. En primer lugar, las células se agruparon de acuerdo con su perfil FSC-H / SSC-H para excluir los restos celulares de desechos de la sangre roja (RBC) y el perfil FSC-A / FSC-H para diferenciar los dobletes celulares de las células individuales. Además la población de una sola célula fluorescente se analizó con SSC-H / FL1-H, utilizando un láser rojo y se detectaron los glóbulos blancos marcados con anti mCD45 con el fluorocromo Alociocianina (APC) a 650 nm. Un total de 10000 células fueron leídas por el citómetro en cada corrida (ver anexo 4).

3.3.3. Objetivo específico 3: evaluación de la toxicidad aguda del compuesto híbrido QX6 en ratones Balb/c.

Para la evaluación de la toxicidad aguda del compuesto QX6 se siguió la metodología y el diseño experimental descrito en la guía # 423 de la Organización para la Cooperación y Desarrollo Económico (OCDE) (6). Para evaluar la toxicidad de forma aguda, el compuesto debe administrarse en un lapso de tiempo no superior a 24 horas y las concentraciones que se deben administrar son de 2000, 300, 50 y/o 5 mg/kg de peso del ratón, iniciando con la administración de 2000 mg/kg cuando según estudios *in vitro*, el compuesto no sea citotóxico. Para esta prueba, en las guías de la OCDE se propone utilizar 3 ratones por grupo de la concentración a evaluar. Cuando más de un ratón muere, la concentración del compuesto evaluado debe administrarse a una concentración inferior y si muere uno o ningún ratón, una sustancia puede clasificarse dentro de las siguientes 5 categorías, según el sistema globalmente armonizado (GSH) (6):

- **Categoría 1:** Administración de 5 mg/kg: Mortal en caso de ingestión.
- **Categoría 2:** Administración de 50 mg/kg: Tóxico en caso de ingestión.
- **Categoría 3:** Administración de 300 mg/kg: Nocivo en caso de ingestión.

- **Categoría 4:** Administración de 2 000mg/kg: Podría ser nocivo en caso de ingestión.
- **Categoría 5:** Administración de dosis mayores de 2 000, pero inferiores a 5000: No clasificado.

Descripción del procedimiento

Se seleccionaron hembras Balb/c de 6-8 semanas de edad y a cada una se le administró el compuesto de acuerdo al peso, por vía oral mediante una sonda gástrica. La variación en el peso de los animales fue inferior $\pm 20\%$. Como se tenían datos *in vitro* de citotoxicidad del compuesto, en el cual fue clasificado como no tóxico, se dio la dosis máxima (2000 mg/kg) del compuesto QX6 a un ratón. Como el ratón tratado con el compuesto híbrido murió con signos de toxicidad aguda (salivación e ictericia leve), se administró 300 mg/kg de QX6 a 3 ratones, y como todos sobrevivieron sin signos de toxicidad, el compuesto se administró a otros 3 animales a una concentración de 500 mg/kg de peso. Uno de estos tres ratones fue sacrificado a las 20 horas porque mostró signos de toxicidad (salivación y postración), por lo que se decidió no dar dosis mayores. Para comparar la toxicidad de QX6 con la primaquina, este último compuesto fue dado a dos ratones según el peso: a uno se le dio 2000 mg/kg y a otro 500 mg/kg. El peso de los roedores se monitoreó cada 8 días para detectar posibles variaciones que pudieran sugerir deterioro físico y se observaron cambios clínicos y de comportamiento en las primeras 4 horas de administrado el compuesto y a las 20 o 24 horas pos administración. Después de las 24 horas pos tratamiento, se observaron los mismos parámetros anteriormente descritos cada día hasta completar 14 días. Al concluir los días de observación a los animales se les practicó eutanasia en cámara de CO₂ y se realizó el análisis anatomopatológico macroscópico y se tomaron muestras de tejido del bazo, hígado y riñón, para la evaluación microscópica mediante la coloración hematoxilina y eosina, la cual se realizó en el laboratorio de Patología de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad de Antioquia. También se tomaron muestras de sangre mediante punción cardiaca para medir parámetros

bioquímicos de función renal (nitrógeno ureico y creatinina) y hepática (alanina aminotransferasa: ALT y bilirrubina total) y hemoleucograma (HLG).

3.4. Análisis estadístico

Objetivo específico 1: evaluación de la actividad citotóxica de los híbridos primaquina-quinoxalina sobre células Hepa 1-6 de ratón: los datos de las absorbancias de las pruebas de citotoxicidad se analizaron en el programa GraphPad Prism™, versión 5.01, mediante un análisis de regresión no lineal con ajuste de curva y para obtener el dato promedio final, se tuvo en cuenta que el r^2 del ajuste de la ecuación fuera mayor de 90% y que los datos obtenidos en cada ensayo no tuvieran variaciones mayores al 20% del valor promedio de los datos.

Objetivo específico 2: actividad profiláctica causal de los híbridos primaquina-quinoxalina en ratones Balb/c: se calcularon medianas y rangos intercuartílicos de las parasitemias en cada tratamiento. Las parasitemias de los grupos de ratones tratados con los híbridos y con la primaquina, se compararon con las del grupo control en los días 4, 5, 7 y 14 posteriores a la infección usando la prueba estadística no paramétrica Kruskal-Wallis. Al encontrar diferencias estadísticamente significativas, se analizaron los rangos múltiples (*post hoc*) con la prueba de Dunn's, para comparar los grupos de tratamientos respecto al control negativo. Mediante pruebas T, se evaluó la posible asociación entre la parasitemia obtenida en cada grupo de tratamiento y la variable sexo o la variable peso del ratón. En todas las pruebas se consideró un valor $p < 0,05$, como de significancia estadística.

La prueba no paramétrica de rangos de Spearman se usó para determinar la correlación entre las parasitemias determinadas por microscopia y por citometría de flujo.

Objetivo específico 3: evaluación de la toxicidad aguda del compuesto híbrido QX6 en ratones Balb/c: los valores de los parámetros hematológicos como

hemoglobina, hematocrito, recuento de glóbulos rojos, leucocitos y plaquetas, así como los valores de la química sanguínea (nitrógeno ureico, creatinina, bilirrubina total y enzima Alanino transferasa), fueron comparados entre los grupos de ratones tratados con los híbridos, con la primaquina y con los no tratados, usando la prueba estadística no paramétrica Kruskal-Wallis. Un valor $p < 0,05$, se consideró de significancia estadística.

4. RESULTADOS

4.1. Objetivo específico 1: actividad citotóxica de los híbridos primaquina-quinoxalina sobre células Hepa 1-6 de ratón.

Las concentraciones citotóxicas 50 (CC₅₀) de los híbridos, sobre las células Hepa 1-6 de ratón, fueron mayores a 30 µg/mL, valores que de acuerdo con la clasificación de citotoxicidad presentada en la metodología, son consideradas como potencialmente no citotóxicas (73). La primaquina, que es un medicamento usado actualmente para el tratamiento de la malaria, presentó una CC₅₀ promedio de 18,38 µg/mL, lo que se considera como un nivel de toxicidad leve. Los compuestos QX7, QX8, QX9 y QX10, tuvieron un CC₅₀ por encima de la concentración más alta evaluada que fue 100 µg/mL (ver tabla 2).

Tabla 1. Concentración citotóxica 50 de los híbridos primaquina-quinoxalina sobre células Hepa 1-6 de ratón.

Compuesto	REPLICA 1		REPLICA 2		PROMEDIO		
	CC ₅₀ (µg/mL)	IC95%	CC ₅₀ (µg/mL)	IC95%	CC ₅₀ (µg/mL)	DS	CV
Pq	15,85	7,102- 35,36	20,92	12,20 – 35,89	18,38	3,58	15,33
QX-6	35,93	23,85 – 54,14	30,99	17,12 -56,11	33,46	3,49	10,43
QX7	>100	>100	>100	>100	No citotóxico		
QX8	>100	>100	>100	>100	No citotóxico		
QX9	>100	>100	>100	>100	No citotóxico		
QX10	>100	>100	>100	>100	No citotóxico		

Los experimentos se realizaron por duplicado y en dos ensayos independientes. CC₅₀: concentración citotóxica 50. IC95%: intervalo de confianza de 95%, DS: Desviación estándar. CV: coeficiente de variación. NA: No aplica

4.2. Objetivo específico 2: actividad profiláctica causal de los híbridos primaquina-quinoxalina en ratones Balb/c.

En los ratones no tratados (grupos control negativo que recibió DMSO) y en los que recibieron tratamiento con los compuestos QX7, QX8, QX9 y QX10, la parasitemia fue detectable microscópicamente entre los días 3 y 4 pos infección (tabla 3) y en todos los grupos evaluados, ni el día de aparición de la parasitemia ni su porcentaje estuvieron relacionados con el sexo, ni con el peso del ratón (prueba t student, $p > 0,05$).

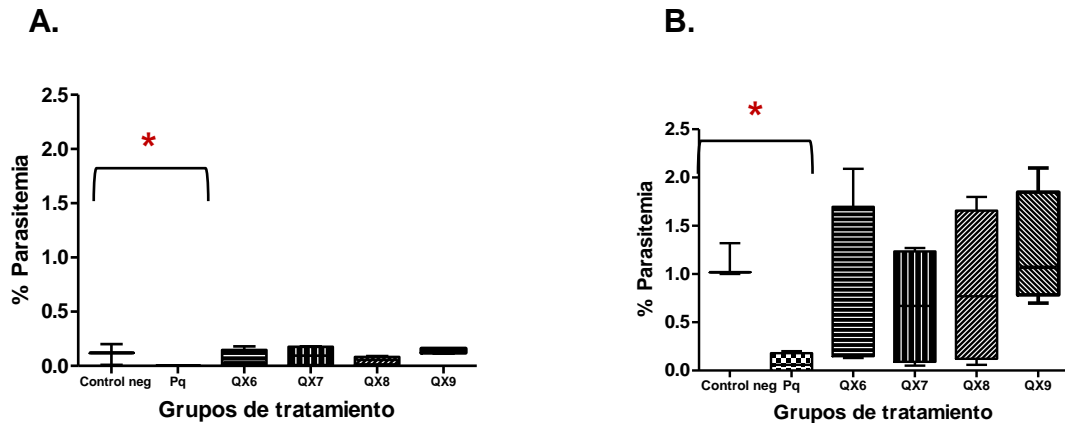
En el esquema de tres días de tratamiento, el compuesto QX6 presentó en el día 4 de seguimiento una mediana de parasitemia de 0,033 parásitos/ μ L, valor que comparado con los demás híbridos QX7: 0,095, QX8:0,055, QX9: 0,145 y el control negativo (0,120 parásitos/ μ L), fue menor. Sin embargo, esta diferencia no fue estadísticamente significativa ($p=0,0651$) (ver tabla 3 y grafico 8). En el grupo tratado con primaquina no se observaron parásitos este día de seguimiento y esto representó una diferencia estadística significativa con respecto al grupo control ($P=0,0236$). Los porcentajes de parasitemia obtenidos este día por microscopia y citometría de flujo, estuvieron correlacionados (ver anexo 4).

Tabla 2. Medianas de parasitemia en diferentes días de seguimiento de los ratones tratados con tres dosis de los compuestos híbridos.

Tratamiento	Medianas de los % de parasitemias (RIQ)			
	Día 4	Día 5	Día 7	Día 14
Control negativo	0,120(0,200- 0,010)	1,020 (1,000-1,320)	4,440(6,700-3,000)	38,20(38,30-30,96)
QX6*	0,033(0,147- 0,011)	0,3650 (0,1500-1,698)	4,135(4,978-3,615)	40,50(46,16-28,88)
QX7*	0,095(0,175- 0,007)	0,6700 (0,0900-1,235)	3,735 (14,64-2,300)	16,96(42,98-10,20)
QX8*	0,055(0,082-0,012)	0,7700 (0,1225-1,658)	3,355(8,703-2,200)	19,93(42,40-8,230)
QX9*	0,145(0,160-0,122)	1,070 (0,7850-1,850)	4,160(4,750-3,600)	19,90(27,35-4,080)
Primaquina**	0 ^a	0,0600 ^a (0,0-0,1800)	2,000(5,118-0,000)	19,30(42,88-0,00)

RIQ: Rango Intercuartilico. * Compuestos híbridos dados a una dosis de 100 mg/kg de peso diario por 3 días. **Control positivo, dado a una concentración de 20 mg/kg de peso por 3 días.

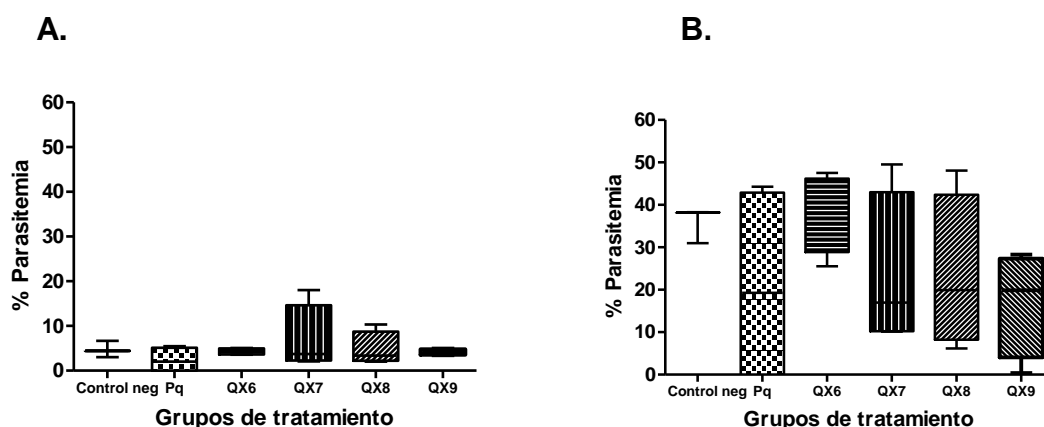
^a Diferencia estadísticamente significativa con respecto al control negativo.



Gráfica 8. Comparación de las parasitemias en los días 4 y 5, de los grupos de ratones Balb/c infectados con *P. yoelii* 17XNL y tratados con tres dosis 100 mg/kg de los híbridos y con primaquina 20 mg/kg, con el grupo control.

Grupo control negativo (vehículo) $n=3$, control positivo (primaquina) $n=4$. Grupos de tratamiento con los híbridos, $n=4$. **A.** Día 4 de seguimiento: Prueba de Kruskal –Wallis: $p=0,0236$, comparación entre grupos control. **B.** Día 5 de seguimiento: Prueba de Kruskal –Wallis: $p=0,0353$. Diferencia estadísticamente significativa entre el grupo sin tratamiento y el grupo control positivo (tratados con primaquina).

Los datos de las medianas de parasitemias de todos los compuestos híbridos evaluados en los otros días de seguimiento (5, 7 y 14), tampoco fueron estadísticamente diferentes con respecto al control negativo, y a pesar de que la primaquina para el día 5 presentó un valor $p=0,0353$, esta diferencia no permanece en los días posteriores de seguimiento (7, 9 y 14). Este comportamiento se muestra en la tabla 4 y en las gráficas 9 y 10.



Gráfica 9. Comparación de las parasitemias en los días 7 y 14, de los grupos de ratones Balb/c infectados con *P. yoelii* 17XNL y tratados con tres dosis de los híbridos y con primaquina, con el grupo control.

Grupo control negativo (vehículo) n=3, control positivo (primaquina) n=4. Grupos de tratamiento con los híbridos, n=4. **A.** Día 7 de seguimiento: Prueba de Kruskal –Wallis: $p>0,05$. **B.** Día 14 de seguimiento: Prueba de Kruskal –Wallis $p>0,05$.

Para el esquema de cuatro días, se aumentó la dosis de primaquina a 30 mg/kg, buscando tener un grupo control positivo con una mejor actividad profiláctica causal y además se aumentó el número de individuos en los grupos control positivo y negativo (n=5 en cada uno). La tabla 4 muestra los datos de las medianas de las parasitemias, en los diferentes días de seguimiento.

Tabla 3. Medianas de las parasitemias en diferentes días de seguimiento, en los ratones tratados con cuatro dosis de los compuestos híbridos.

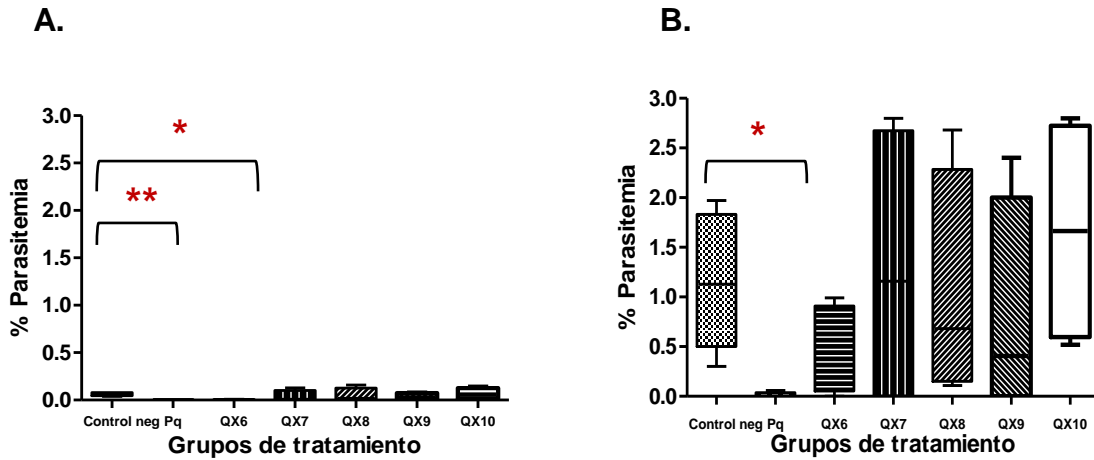
Tratamiento	Medianas del porcentaje de parasitemia (RIQ)			
	Día 4	Día 5	Día 7	Día 14
Control negativo	0,060 (0,080-0,045)	1,130 (0,5000-1,830)	2,850(3,390- 2,295)	10,70(28,43- 3,520)
QX6*	0 ^a (0,007-0)	0,4400 (0,0550-0,9075)	2,550(3,128- 1,755)	17,23(23,39- 8,173)
QX7*	0,010 (0,102-0)	1,160 (0,0050-2,675)	1,540(3,925- 1,083)	12,62(21,25- 4,683)
QX8*	0,0200 (0,125-0,005)	0,6800(0,1500-2,283)	3,275(3,825- 2,500)	25,40(37,83- 10,85)
QX9*	0,030(0,075-0)	0,4050(0,0025-2,000)	2,590(4,158- 0,985)	22,56(33,16- 10,48)

QX10*	0,060(0,125-0,017)	1,665(0,5975-2,725)	3,560(4,418- 2,988)	3,685(4,163- 2,983)
Primaquina**	0 ^a	0 ^a (0-0,0350)	0 ^a (1,535-0)	0 ^a (16,88-0)

RIQ: Rango intercuartilico. ** Compuestos híbridos dados a una dosis de 100 mg/kg de peso día por 4 días. *Control positivo, dado a una concentración de 30 mg/kg de peso día por 4 días.

^a Diferencia estadísticamente significativa con respecto al control negativo.

Para el cuarto día de seguimiento, 1 de 4 (25%) ratones tratados con el compuesto QX6 y ninguno (0%) de los ratones tratados con primaquina, presentaron parásitos en sangre periférica. Ambos compuestos tuvieron una diferencia significativa con respecto al grupo control negativo (QX6: $p=0,0284$) (grafica 10). A pesar de que al día 5 el porcentaje de parásitos en sangre de los ratones tratados con QX6 sigue siendo menor que la del grupo control negativo, se pierde la significancia estadística (QX6: $p=0,788$). Sin embargo, con respecto al grupo tratado con primaquina, esta diferencia se conserva ($p=0,02160$).



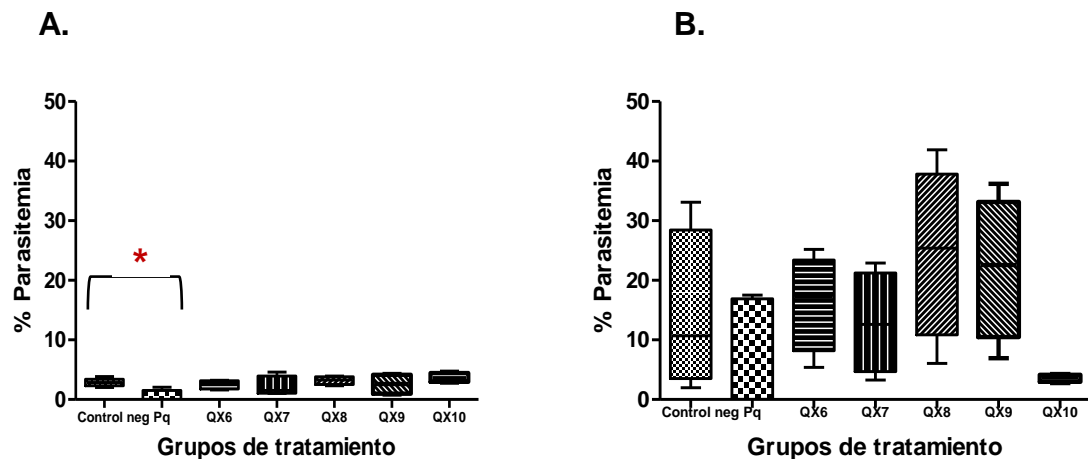
Gráfica 10. Comparación de las parasitemias en los días 4 y 5, de los grupos de ratones Balb/c infectados con *P. yoelii* 17XNL y tratados con cuatro dosis de los híbridos y con primaquina, con el grupo control.

Grupo control negativo (vehículo) $n=5$, control positivo (primaquina) $n=5$. Grupos de tratamiento con los híbridos, $n=4$. **A.** Día 4 de seguimiento: prueba Kruskal-Wallis test: valor $p=0,0284$, **B.** Día 5 de seguimiento prueba Kruskal-Wallis test. Valor $p=0,788$.

Para el día 7, las diferencias estadísticas entre grupos control, positivo y negativo, se conservan, pero los ratones tratados con QX6 presentan parasitemias similares

al resto de los compuestos híbridos evaluados (QX6=2,55%, QX7: 1,54%, QX8=3,27%, QX9=2,59%, QX10= 3,56%) e incluso al grupo control no tratado (2,85%), pero para el día 14 la diferencia estadística significativa entre el grupo de ratones no tratados y los tratados, incluso con la primaquina, se pierde. $p=0,1736$. (Grafico 11).

Es importante aclarar que, con el esquema de cuatro días, en el grupo de ratones tratados con 30 mg/ kg de peso de primaquina, 2 de 5 (40%) ratones desarrollaron parasitemia desde el día 5 de seguimiento, pero los tres restantes permanecieron negativos hasta el final del estudio (día 14). Este hecho hizo que el rango de los datos fuera amplio, y en consecuencia, la diferencia entre los grupos control no se hiciera evidente (tabla 4 y grafico 11).



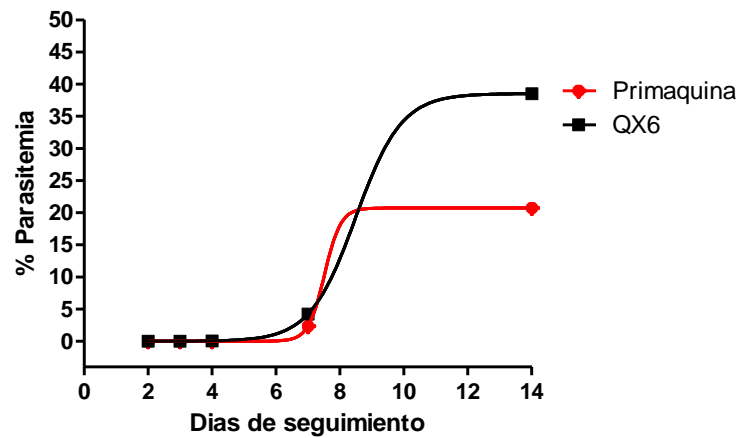
Gráfica 11. Comparación de las parasitemias en los días 7 y 14, de los grupos de ratones Balb/c infectados con *P. yoelii* 17XNL y tratados con cuatro dosis de los híbridos y con primaquina, con el grupo control.

Grupo control negativo (vehículo) $n=5$, control positivo (primaquina) $n=5$. Grupos de tratamiento con los híbridos, $n=4$. **A.** Día 7 de seguimiento: prueba Kruskal-Wallis test: valor $p=0,0218$. **B.** Día 14 de seguimiento prueba Kruskal-Wallis test. Valor $p=0,1736$

Un análisis de regresión lineal con los valores promedio de las parasitemias obtenidas los días 2, 3, 4 y 5 luego del tratamiento con 3 y 4 dosis de 100 mg/kg de

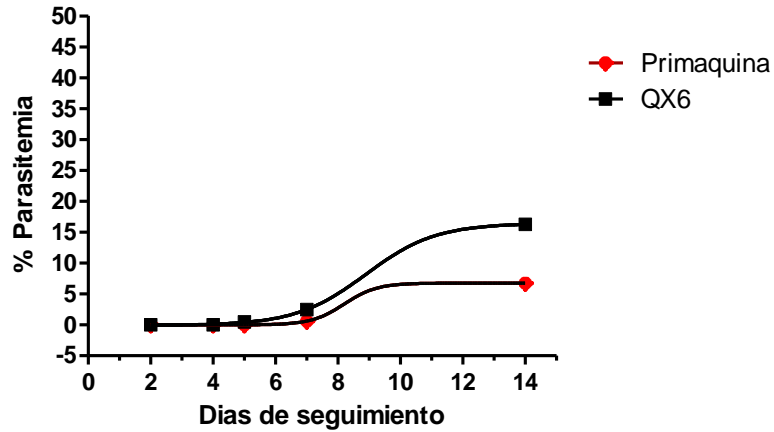
QX6 y de 20 mg/kg en tres dosis y 30 mg/kg en cuatro dosis de primaquina, muestra que las curvas de respuesta al tratamiento son muy similares los días 2, 3, 4 y 5 con ambos tratamientos, además que las parasitemias en todos los días de seguimiento fueron más bajas con 4 dosis de ambos compuestos, que con 3 dosis (ver gráfico 12).

A.



Día de seguimiento	% promedio de parasitemia Pq	% promedio de parasitemia QX6
2	0	0
3	0	0
4	0	0,06
7	2,37	4,24
14	20,73	38,51

B.



Día de seguimiento	%promedio de parasitemia Pq	% promedio de parasitemia QX6
2	0	0
4	0	0,002
5	0,014	0,467
7	0,614	2,477
14	6,752	16,262

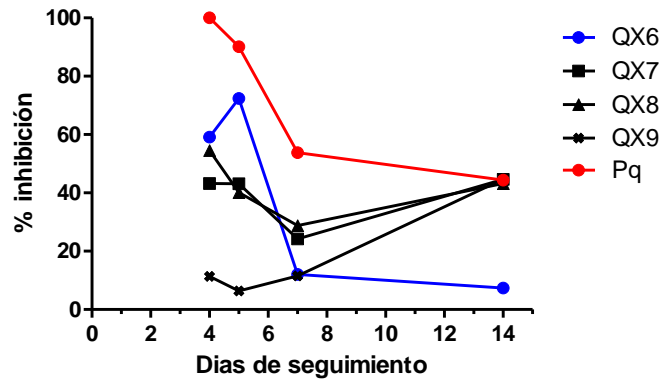
Gráfica 12. Regresión no lineal de los valores promedios de porcentajes de la parasitemia en los diferentes días de seguimiento del compuesto QX6 y de la primaquina con los dos esquemas de tratamiento administrados.

Cada punto de la gráfica representa el valor promedio de la parasitemia de los ratones tratados con **A:** tres dosis de 100 mg/kg de QX6 (n=4) y de la primaquina 20 mg/kg (n=4) y **B:** cuatro dosis de 100 mg/kg de QX6 (n=4) y de la primaquina 30 mg/kg (n=5).

Cuando se calcularon los porcentajes de inhibición de la parasitemia de los compuestos, con respecto al control sin tratamiento, pudo observarse que QX6, hace que en el día 4, se inhiba la parasitemia en un 59,09% con el esquema de tres días. Sin embargo, cuando se da un día más de tratamiento, el porcentaje de inhibición mejora hasta el 95,97% y es muy similar al que se obtuvo con la primaquina (100%). Para el día 5 de seguimiento, QX6 dado por tres días aumentó su porcentaje de inhibición de los parásitos a un 72,34%, en cambio con 4 dosis este disminuye (59,63%). Para este día, la primaquina inhibe la parasitemia en un

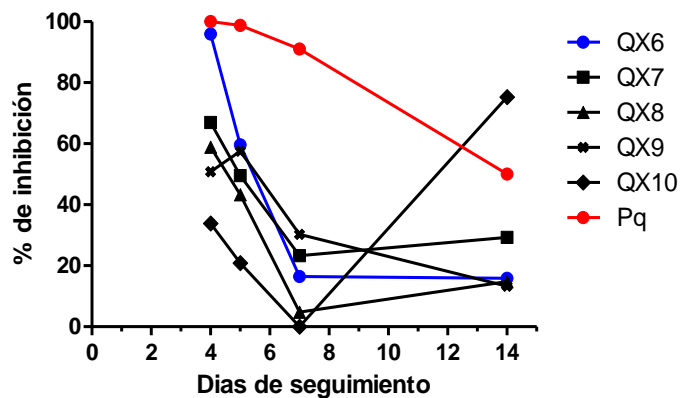
90,1% dada en tres dosis y en un 98,79% con cuatro (ver gráfico 13). Es importante resaltar que 72 horas después de la última dosis, independiente del esquema de tratamiento dado, QX6, inhibe la parasitemia en un porcentaje similar al de la primaquina (ver gráfico 13). Los híbridos QX7, QX8, QX9 y QX10, no presentaron efecto significativo en la inhibición de la parasitemia de los ratones en ninguno de los días de seguimiento.

A.



Día de seguimiento	% inhibición QX6	% inhibición QX7	% inhibición QX8	% inhibición QX9	% inhibición Primaquina
4	59,09	43,18	54,55	11,36	100
5	72,34	43,09	40,16	6,38	90,16
7	12,04	24,24	28,8	11,56	53,78
14	7,38	44,59	43,21	44,74	44,39

B.



Día de seguimiento	% inhibición QX6	% inhibición QX7	% inhibición QX8	% inhibición QX9	% inhibición QX10	% inhibición Primaquina
4	95,97	66,94	58,87	50,81	33,87	91,03
5	59,63	49,57	43,26	57,51	20,85	98,79
7	16,42	23,26	4,78	30,31	0	91,03
14	15,87	29,33	14,76	13,27	75,29	60,00

Gráfica 13. Porcentajes de inhibición de la parasitemia de los grupos de tratamiento en los diferentes días de seguimiento.

Cada punto de la gráfica representa el valor promedio de la parasitemia de los ratones tratados con A: tres dosis del compuesto híbrido (n=4) y de la primaquina (n=4) y B: cuatro dosis de los compuestos híbridos (n=4) y de la primaquina (n=5) y de 4 ratones tratados con los compuesto híbridos

4.3. Objetivo específico 3: toxicidad aguda del compuesto híbrido QX6 en ratones Balb/c.

Cuando se dio 2000 mg/kg del compuesto QX6 a un ratón, se produjo la muerte del animal entre las seis y 20 horas pos administración. En la necropsia se observó un tamaño normal del órgano, pero los tejidos estaban levemente ictericos. Al administrar primaquina en la misma concentración a un ratón, se produjo la muerte en el mismo lapso de tiempo y los hallazgos en la necropsia fueron similares, excepto por la ictericia que se presentó en una intensidad moderada, es decir en un grado mayor a la observada en el ratón tratado con QX6.

Al administrar 300 mg/kg de QX6 a tres ratones, todos mostraron un comportamiento y respuesta a estímulos normal, con hábitos de alimentación acordes a su especie y sin signos de toxicidad. En cuanto al examen clínico, los ratones tuvieron un buen estado general, ojos claros y brillantes, mucosas normo coloreadas y pelo brillante sin erección. Este mismo comportamiento fue observado en dos de tres ratones a los que se les administró 500 mg/kg del híbrido. Un animal que recibió esta misma concentración fue encontrado a las 20 horas postrado, por lo que se decidió practicar la eutanasia. En la necropsia se observaron órganos en

aparición y tamaño normal y en su estómago se encontró comida, por lo que pudo concluirse que el animal no dejó de alimentarse. Los hallazgos patológicos a nivel microscópico fueron: necrosis aguda de hígado y riñón. También se administraron 500 mg/kg de primaquina a un ratón y este fue hallado 20 horas después, inconsciente y convulsionando, razón por la cual fue sacrificado. En la necropsia pudo observarse que el animal tenía el estómago sin comida, con un grado de congestión severa y ulcerado, el resto de los órganos se encontraron normales. Microscópicamente el diagnóstico fue: necrosis aguda de hígado, riñón y esplenitis necrotizante (ver tabla 5).

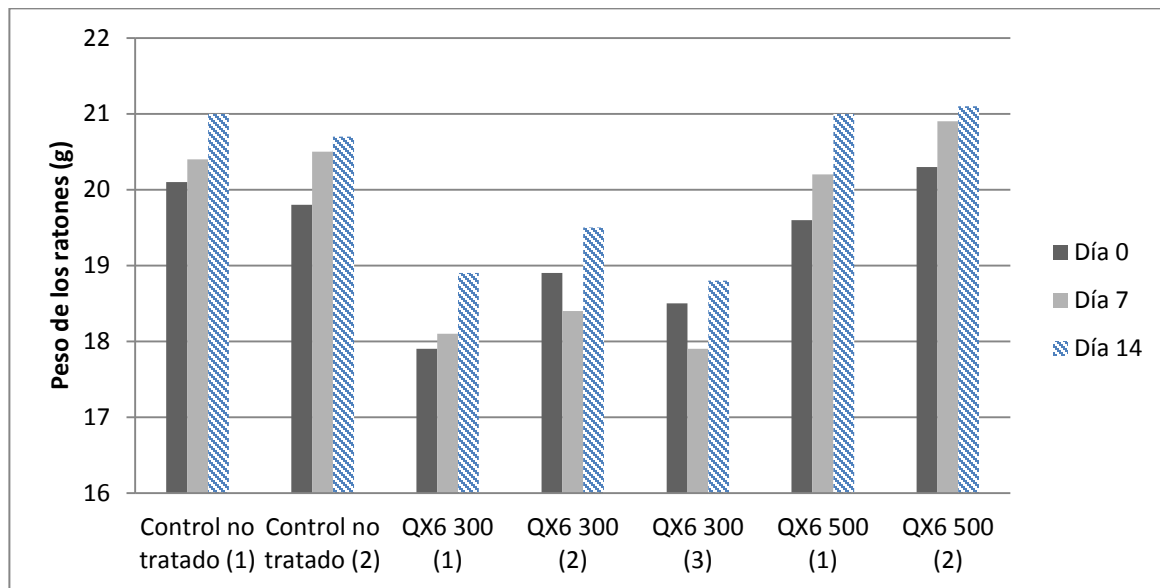
Los anteriores hallazgos permiten clasificar al compuesto QX6 según el sistema globalmente armonizado, en la categoría 4, que indica que podría ser nocivo en caso de ingestión.

Tabla 4. Resumen de los resultados obtenidos durante la evaluación de la toxicidad aguda del compuesto QX6 y su comparación con la primaquina.

Compuesto administrado (n)	Dosis (mg/Kg)	Principales hallazgos
QX6 (1)	2000	Muerte del animal a las 20 horas. Necropsia: Ictericia leve
Primaquina (1)		Muerte del animal a las 20 horas. Necropsia: Ictericia intensa.
QX6 (3)	500	2 ratones clínicamente normales durante todo el seguimiento. 1 ratón sacrificado por postración. Necrosis aguda de riñón e hígado
Primaquina (1)		Ratón sacrificado por inconsciencia y convulsiones. Esplenitis necrosante y necrosis aguda de riñón e hígado
QX6 (3)	300	Todos los animales clínicamente normales durante todo el seguimiento.

Todos los ratones que sobrevivieron y que fueron tratados con el compuesto híbrido tanto a concentración de 300 mg/mL (3/3), como de 500 mg/mL (2/3), tuvieron una ganancia de peso igual a los animales no tratados (ver gráfico 14), además los parámetros hematológicos como hematocrito, la serie roja, plaquetaria y la serie blanca, no fueron significativamente diferentes a la de los ratones no tratados (prueba Kruskal Wallis $p=0,098$) y los valores de química sanguínea del nitrógeno ureico, creatinina y bilirrubina total, fueron similares a los de los ratones no tratados. Solo la enzima Alanino transferasa en un ratón tratado con 500 mg/mL tuvo un

aumento leve (82 U/L) comparado con el intervalo de valores enzimáticos en los animales no tratados entre 34 U/L y 78U/L (tabla 5).



Gráfica 14. Comportamiento del peso en los ratones Balb/c no tratados y en los que se evaluó la toxicidad aguda del compuesto QX6 a 300 y 500 mg/kg de peso.

Los números entre paréntesis representan la numeración de los animales evaluados. Prueba Kruskal Wallis, $p=0,098$.

Al practicar las necropsias de los ratones sobrevivientes tratados con QX6 y sin tratamiento, pudo observarse que los órganos tenían tamaño y aspecto normal, y en el examen patológico solo se observó congestión en grado leve a moderado a ambas dosis del compuesto en riñón y bazo, y apoptosis de leve a moderada en bazo. Sin embargo, estos hallazgos también fueron encontrados en los ratones no tratados. El diagnóstico del patólogo en todos los animales (tratados y no tratados) fue: "No se observaron cambios tisulares significativos en ninguno de los fragmentos evaluados: hígado bazo y riñón".

Tabla 5. Resultados de laboratorio de ratones Balb/c en los que se evaluó la toxicidad aguda del compuesto híbrido QX6.

Dosis del tratamiento	Control sin tratamiento		QX6 300 mg/kg de peso		QX6 500 mg/kg de peso	
Laboratorio	Media ±DS	Valores Min-Max	Media ±DS	Valores Min-Max	Media ±DS	Valores Min-Max
Hemoleucograma	(n=3)		(n=1)		(n=1)	
Hemoglobina (g/dL)	16,02 (0,73)	15,33-16,02	15,93 (NA)	NA	15,8	NA
Hematocrito (%)	48,06 (2,21)	46-50,4	47,8 (NA)	NA	47,4	NA
Reticulocitos (%)	0,15 (0,13)	0,06-0,3	0,09 (NA)	NA	0,07	NA
Plaquetas (x10 ³ /μL)	556,66 (120,22)	421-650	421 (NA)	NA	664	NA
Leucocitos(x10 ³ /μL)	6,1 (1,37)	4,9-7,6	5,8 (NA)	NA	6	NA
Linfocitos (%)	78,36 (3,06)	75-79,1	75 (NA)	NA	66	NA
Monocitos (%)	2,76 (0,40)	2,3-3	3 (NA)	NA	2	NA
Neutrófilos (%)	17,8 (3,70)	16,4-22	22 (NA)	NA	30	NA
Química Sanguínea	(n=4)		(n=3)		(n=2)	
Creatinina (mg/dL)	0,54 (0,05)	0,5-0,6	0,62 (0,07)	0,56-0,72	0,76 (0,06)	0,72-0,81
BUN (mg/dL)	18,65 (2,9)	15,1-22,2	18,22 (0,32)	17,8-19,2	16,61 (3,66)	19,2-14,02
ALT(U/L)	48,25 (20,10)	34-78	59,33 (20,75)	30-82	58 (33,94)	82-43
Bilirrubina Total (mg/dL)	0,53 (0,472)	0,11-1,04	0,11 (0,01)	0,09-0,17	0,13 (0,05)	0,09-0,17

5. DISCUSION

Según la OMS, la malaria es una enfermedad tropical desatendida (75) y a pesar de su evidente carga de morbimortalidad, son escasos los medicamentos disponibles para su tratamiento y prevención. El parásito ha desarrollado resistencia a muchos de ellos (artesanato, cloroquina, mefloquina, amodiaquina, entre otros) y algunos como la primaquina, la doxiciclina y la mefloquina, son tóxicos (36).

Pese a su comprobada toxicidad (6), la primaquina es el medicamento antiplasmodial con más amplia actividad quimioproliférica, pues es el único que actúa sobre hipnozoítos, evitando las recaídas (profilaxis terminal), sobre gametocitos en estadio V, previniendo la transmisión del hombre al vector (considerada una medida profiláctica) y el único con acción sobre esporozoítos, inhibiendo la infección hepática (profilaxis causal) (48,49). Partiendo de la ventajosa actividad de este fármaco, se decidió hacerle modificaciones, uniéndole un segundo farmacóforo (quinoxalina), con la idea de conformar un compuesto híbrido menos tóxico y con igual o mayor actividad antiplasmodial.

Investigadores de la Universidad de Navarra con quienes realizamos este trabajo colaborativo, sintetizaron cinco híbridos denominados QX y estructuralmente se diferencian en que QX6 es el único compuesto de la serie que no presenta sustitución en el carbono 7 de la quinoxalina, los demás tienen sustituyentes electroatrayentes: QX7 (R=Cl), o electrodonadores: QX8 (R=OCH₃), QX9 (R=CH₃) y QX10 (R=C₂H₅). Anteriormente otros investigadores como Burguete y Ancizu *et al.*, en 2008 y 2010 respectivamente, reportaron que sustituciones R7, mejoran la actividad antileishmaniana de las quinoxalinas (76, 77), y otros autores informan que por el contrario, esta sustitución no hace que la actividad sobre agentes antimicrobianos aumente (78). Zarranz *et al.*, en 2003 además publicaron que grupos donadores de electrones (CH) sobre el anillo bencénico de la quinoxalina reducen la actividad, y los mejores valores de índice de selectividad fueron

obtenidos de compuestos no sustituidos o sustituido solo con un grupo en la posición 7 (79).

En nuestros experimentos, QX6 presentó mejor actividad antiplasmodial que los demás híbridos evaluados, pero no superó la acción de la primaquina, es decir que en nuestros ensayos, la sustitución o no en R7 no mejora la actividad antiplasmodial de los híbridos en comparación con la primaquina, lo que nos lleva a pensar que es mejor no sustituirlo o hacerlo con un grupo químico diferente a los usados en este estudio. Por otro lado, ninguno de los híbridos fue soluble en agua, como sí lo es la primaquina; esta hidrofobicidad dificultó la dilución de los compuestos, pero pudo favorecer su biodisponibilidad, favoreciendo que el fármaco cruzara exitosamente varias barreras antes de alcanzar el parásito intra hepático, atravesando la vacuola parasitófora.

Se cree que el mecanismo de acción antiplasmodial de las quinoxalinas es la generación de radicales libres que crean un ambiente pro oxidativo dañino para el DNA del parásito, y aunque la primaquina también está asociada al aumento de los radicales libres, se cree que estos actúan a nivel mitocondrial; se esperaría entonces que con la unión de estas dos moléculas se potenciara el efecto antiparasitario. Sin embargo, esto no ocurrió. Podría posteriormente evaluarse la unión de estos dos farmacóforos con conectores de ésteres, hidrolizables por enzimas con mayor disponibilidad (esterasas) para que estas dos moléculas actuaran por separado en el organismo, y posiblemente obtener mejor actividad antiplasmodial.

QX6 fue el único híbrido que presentó efecto profiláctico causal con el esquema de tratamiento de cuatro dosis de 100 mg/kg de peso diarios, pues se observó un 95,97% de inhibición del desarrollo de las formas hepáticas de *P. yoelii* 17XNL con respecto al grupo de ratones no tratados, es decir, solo un ratón presentó parásitos en sangre este día y con densidad de parásitos baja (0,007%) en comparación con

los 5 ratones control negativo, que fueron positivos con una mediana de 0,06%. Este valor representa una reducción de los parásitos de la fase hepática, que se ve reflejada en la extensión del periodo de protección de los ratones de 24 horas más que en los ratones no tratados, hecho similar a lo observado por Bejon *et al.*, en 2005, en sus estudios de vacunas en humanos, en los cuales se observó que cuando las medidas profilácticas hacen que la carga parasitaria hepática disminuya, el tiempo de aparición de la parasitemia aumenta (80).

Cuando se evaluó el esquema profiláctico con los híbridos QXs dado en tres días, la muerte de un ratón el día 3 de seguimiento en el grupo control negativo, pudo haber tenido influencia en los resultados de los análisis estadísticos, por ejemplo para el día 4, las medianas de las parasitemias tuvieron un intervalo amplio y este hecho pudo ser determinante para que las diferencias estadísticas en este día de seguimiento, con respecto a los grupos de tratamiento y control positivo (primaquina), no se presentaran.

En nuestros ensayos, la inhibición en la parasitemia cuando se administró QX6 no se mantuvo durante todo el seguimiento, pues todos los ratones desarrollaron parasitemia en ambos esquemas evaluados, a diferencia de los tratados con primaquina que fueron protegidos 3 de 4 ratones a los que se les administraron 3 dosis de 20 mg/kg (75%) y 3 de 5 (60%) de los tratados con 30 mg/kg por 4 días. Valores similares a estos porcentajes de protección con la administración de primaquina a dosis de 20 y 30 mg/kg/día por 3 y 4 días, respectivamente, no habían sido reportados antes con la cepa de *P. yoelii* 17XNL. Diferentes autores han usado primaquina como control para sus ensayos, obteniendo 100% de actividad profiláctica causal a dosis entre 10 y 50 mg/mL, inoculando entre 10000 y 50000 esporozoítos por ratón y usando dosis del fármaco previas a la infección con estas formas parasitarias, el día de la infección y pos infección. Sin embargo, todos estos ensayos fueron hechos con *P. berghei* (42, 81, 82). Es probable que para la cepa de *P. yoelii* 17XNL la dosis necesaria de primaquina para inhibir la parasitemia, sea más alta que para *P. berghei*, y de ser así, esto podría indicar que los esporozoítos

de esta cepa son más infectivos, o que no son igual de sensibles a las 8 aminoquinolinas, lo que haría que nuestros resultados no fueran comparables con estudios realizados con otras especies de *Plasmodium* de roedor. Esta hipótesis debe comprobarse en caso de continuar evaluando el compuesto híbrido QX6.

Existen pocos estudios publicados en los que se evalúa la actividad profiláctica causal para malaria de compuestos en roedores y solo cuatro, lo hacen con *P. yoelii* (84-85) y entre estos últimos, solo Coppi y colaboradores en 2006, lo hacen con la cepa *P. yoelii* 17XNL (85) .

Coppi *et al.*, (85) evaluaron la AQC de la alicina, un tiosulfonato que se encuentra en el ajo (*Allium sativum*), en un modelo murino de malaria (ratones *Swiss webster* infectados con *P. yoelii* 17XNL). Aunque este estudio tiene grandes diferencias metodológicas con el nuestro, en cuanto al esquema terapéutico, vía de administración de los compuestos y determinación de la eliminación de los parásitos en hígado, estos autores tampoco obtuvieron una eliminación completa de la carga parasitaria. Cabe resaltar además que en este estudio no se usó un control positivo, lo que no nos permite comparar los porcentajes de protección que obtuvimos con la primaquina.

Otro estudio publicado por Carraz *et al.*, en 2006, evaluó la actividad profiláctica causal la tazopsina, un compuesto natural provenientes de la planta *Strychnopsis thouarsii* (Menispermaceae), endémica de Madagascar y de su derivado semi sintético, N ciclopentil-tazopsina (NCP-tazopsina, en *P. yoelii* cepa 265 BY. El estudio se hizo en ratones a los que se les inyectaron retro orbitalmente entre 4000 y 10000 esporozoítos y se trataron con 100 mg/kg/día y 400 mg/kg/día, respectivamente por 4 días (-1, 0, +1 y +2). Los resultados mostraron que ninguno de los ratones que recibió 400 mg/kg/día, desarrolló parasitemia, y que en el 70 % de los que recibieron 100 mg/kg/día, se observó parásitos en sangre periférica. Comparado con nuestro estudio, estos autores tuvieron ratones sin parasitemia a dosis superiores a las dadas en nuestro estudio y similar a nuestros hallazgos, los

animales que desarrollan parasitemia, también extienden su periodo pre patente por el efecto del compuesto, sin embargo, cabe resaltar que en este estudio se utilizó una cepa de parásito diferente y que a la misma concentración del compuesto (100 mg/kg de peso), este no inhibió el 100% de la infección en los ratones (86).

Pocos compuestos híbridos con primaquina han sido desarrollados (29, 30, 65). Lodige *et al.*, mostraron que el híbrido conformado por la primaquina y la cloroquina, administrado a 20 mg/kg de peso del ratón infectado con 10000 esporozoítos de *P. berghei*, fue capaz de ampliar el periodo pre patente de la parasitemia, igual ocurrió en nuestros ensayos, pero éste lo hizo por 7 días con respecto al grupo control no tratado (30). Los híbridos conformados por la primaquina y derivados de las artemisininas son los que han presentado mejor actividad antiplasmodial. Sin embargo, no se podría afirmar que este tipo de combinación sea solo quimioprofiláctica causal, pues estos compuestos inhiben el 60% de la parasitemia en los ratones infectados con 10000 esporozoítos de *P. berghei* al día 4 de seguimiento y posterior a este día lo hacen en el 100% de los animales (29), lo que hace concluir que la disminución de la parasitemia en sangre se debe más al efecto supresivo del híbrido, pues al determinar la IC₅₀ sobre formas sanguíneas del parásito fue de 9,1 µg/mL. A diferencia de este comportamiento, QX6 tiene moderada actividad antiplasmodial (87) sobre formas sanguíneas de *P. falciparum* (IC₅₀ sobre cepa 3D7: 65,8 µM y FCR3: 64,23 µM), datos sin publicar), y es entonces el efecto sobre la inhibición de la parasitemia, solo consecuencia de la acción del híbrido sobre las formas hepáticas.

Con respecto a los factores que la OMS considera que pueden influenciar la evaluación de la actividad de los quimioprofilácticos causales, específicamente en relación con el tamaño del inóculo, para nuestros experimentos decidimos usar una cantidad de esporozoítos intermedia (5000), a pesar de infectar al 100% de los ratones con 2000; sin embargo como lo demuestran Greenberg y Fink (41, 43), es importante estandarizar la cantidad de esporozoítos para cada especie de

Plasmodium en los estudios de la actividad profiláctica causal, dadas las diferencias en la tasas de infectividad que puede haber entre especies (esporozoítos de *P. yoelii* son 2000 veces más infectivos que los de *P. berguei*), incluso los resultados obtenidos en este estudio sugieren que debería estandarizarse el tamaño del inóculo cuando se trabaja con cepas de la misma especie. Por ello es importante tener en cuenta que para futuros estudios de AQC del compuesto QX6, se debe estandarizar la tasa curativa de este compuesto con la ayuda de la administración de primaquina, que es un componente del híbrido, para administrar en los ensayos la cantidad de compuesto necesario para eliminar el 100% de las FEE y que se vea reflejado en la no aparición de parasitemia durante el seguimiento.

Otra característica que la OMS determinó que afecta la valoración de la actividad profiláctica, es el momento del ciclo hepático en el que se administra y absorbe el fármaco. El compuesto QX6 mostró actividad sobre las formas hepáticas, la cual se evidenció con la ampliación de 24 horas del periodo pre patente en los ratones tratados con este compuesto. Este hallazgo podría estar indicando que este compuesto tiene actividad contra las FEE, pero que podría tener una baja biodisponibilidad, o una lenta absorción o que actúe sobre algún estadio específico del parásito, y que por esta razón solo pudo eliminar parte de los parásitos en el hígado. Estudios farmacocinéticos para hallar un esquema terapéutico acorde a las características del compuesto, son necesarios para continuar con la evaluación de QX6.

La duración del ciclo hepático, en el modelo que se evalúa la actividad quimioprofiláctica causal, también influye sobre los resultados. En este estudio se usó el modelo murino de *P. yoelii*, el cual presenta un desarrollo hepático más rápido comparado con los plasmodios que parasitan al hombre, pues se sabe que los roedores tienen tasas metabólicas más aceleradas, comparadas con las de los seres humanos. El ciclo hepático corto del modelo de roedor sugiere que los esquemas deberían tener varias dosis diarias durante las 48 horas, periodo que

tarda el ciclo en completarse. QX6 podría evaluarse a dosis mayores y más frecuentes.

Por otro lado, los quimioprofilácticos supresivos, son los más usados en la actualidad, y a pesar de que no inhiben el desarrollo de hipnozoítos, tienen esquemas más largos y se toman a dosis sub terapéuticas, lo que contribuye al desarrollo de resistencia. QX6 tiene moderada acción sobre formas sanguíneas (IC₅₀ sobre cepa 3D7: 65,8 µM y FCR3: 64,23 µM, datos sin publicar), lo que podría representar una clara ventaja. Además, los compuestos con AQC tienen una ventaja, sobre los supresivos en relación con aspectos biológicos propios de la fase hepática como el hecho de que esta etapa representa un cuello de botella en el ciclo de vida del parásito, debido a la baja cantidad de esporozoítos que es inyectada por el mosquito y a que los parásitos en el hígado desarrollan una única esquizogonia antes de salir del órgano; estos aspectos podrían facilitar la eliminación de estas formas parasitarias y evitar el desarrollo de resistencia, pues eliminar un número bajo de parásitos está relacionado con mayor probabilidad de éxito terapéutico (5). Otros aspectos que deben tenerse en cuenta como desventajas de este tipo de quimioprofilaxis son: 1. Que requiere dosis diarias durante la estadía en zona endémica y hasta un mes después de la salida de ella, lo que hace que estos esquemas sean costosos y difíciles de cumplir, 2. Que promueve el desarrollo de la resistencia por las dosis sub terapéuticas que son administradas y 3. Que no evitan el desarrollo de hipnozoítos.

El desarrollo de compuestos híbridos que tengan la actividad profiláctica de los medicamentos del tipo 8 aminoquinolinas, evitarían la infección hepática por todas las especies de *Plasmodium* y el desarrollo de hipnozoítos de *P. vivax*, contribuyendo de esta forma con los planes de eliminación planteados por la OMS, sin embargo entre las características que deberían tener estos compuestos deberían estar:

1. Que inhiban el 100% de la infección hepática, pues una protección inferior corresponde necesariamente a un portador del parásito con una alta probabilidad de ser un caso de malaria y fuente de infección para otros. En nuestro estudio, QX6 no evitó el desarrollo de parasitemia en los ratones, por ende no cumple con este parámetro.
2. Compuestos con actividad hepática y pensados para usarse como profilácticos causales no deberían tener acción sobre formas sanguíneas, ya que las dosis sub terapéuticas que caracterizan este tipo de tratamiento, traerían consigo una alta probabilidad de que el parásito desarrolle resistencia, lo que se convertiría en un problema para el control de la enfermedad. QX6 tiene moderada actividad sobre formas sanguíneas, lo que lo hace un buen compuesto QC.

6. CONCLUSIONES

Los resultados de este estudio nos permiten concluir lo siguiente:

1. QX6 fue el único híbrido primaquina-quinoxalina evaluado que presentó actividad profiláctica causal al inhibir la parasitemia en el día 4 hasta en un 95,97% con respecto al control no tratado y extiende el periodo pre patente de la parasitemia aproximadamente en 24 horas. Sin embargo, este compuesto es menos activo que la primaquina, medicamento licenciado actualmente para el tratamiento profiláctico de la malaria. Los híbridos primaquina-quinoxalina, como QX6 pueden considerarse una alternativa terapéutica para la malaria, sin embargo hace falta investigar en aspectos farmacocinéticos y farmacodinámicos.
2. El momento en el que el compuesto QX6 muestra su máxima actividad sobre las formas hepáticas y que se ve reflejado en la reducción de la parasitemia con relación al control no tratado (95,97% para el esquema de 4 dosis y 72,34% para el de 3 dosis), es de 48 y 96 horas, respectivamente, después de la última dosis de tratamiento, lo que puede estar relacionado con su farmacocinética. Este hallazgo debe tenerse en cuenta para proponer en futuros estudios, otros esquemas terapéuticos con el híbrido, con el fin de contribuir al desarrollo de nuevos fármacos con actividad antiplasmodial.
3. La prueba de citotoxicidad *in vitro* del compuesto QX6 demostró que este híbrido es menos citotóxico que la primaquina (CC₅₀: QX6:33,46 µg/mL y primaquina: 18,38 µg/mL). Estos resultados se corroboraron *in vivo*, cuando a los ratones a los que se les administraron 500 mg/kg del compuesto, presentaron menos toxicidad que los tratados con la primaquina dada a la misma concentración. QX6 es una molécula no tóxica a una concentración de 300 mg/mL en los ratones Balb/c, lo que

permite evaluar dosis superiores a las dadas en este estudio (100 mg/mL).

4. Las sustituciones en la posición R7 de la quinoxalina en los híbridos evaluados hacen que estos sean menos activos a nivel quimioproláctico causal, pues el único híbrido no sustituido (QX6), fue el más activo en nuestro estudio.

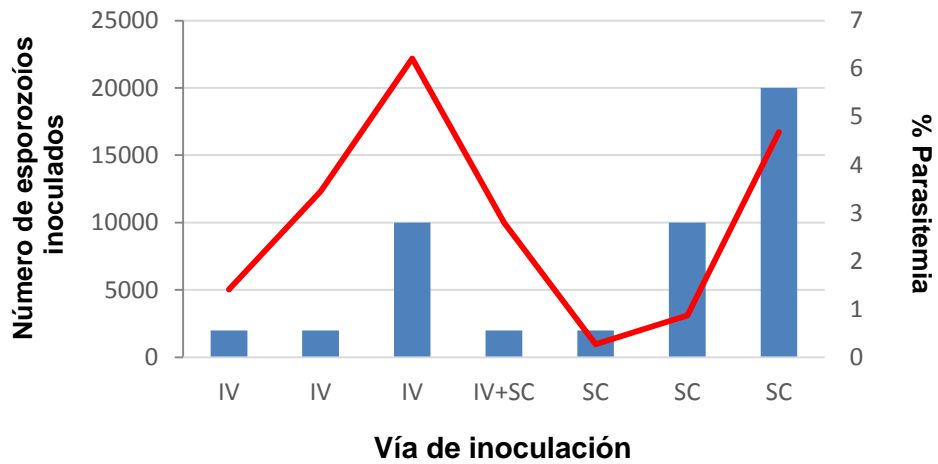
En conclusión, este trabajo de investigación describe por primera vez la capacidad de los híbridos primaquina- quinoxalinas para inhibir las formas preeritrocíticas de *Plasmodium yoelii* 17XNL. Nuestros datos constituyen una importante contribución en la exploración de compuestos novedosos para el tratamiento de la malaria y que podrían posibilitar la implementación de estrategias quimioprolácticas para el control, la eliminación y erradicación del paludismo.

7. PERSPECTIVAS

1. Los resultados que obtuvimos con la realización de esta investigación nos permiten sugerir para futuros estudios relacionados con la evaluación de la actividad de compuestos quimioprofilácticos para malaria: estandarizar antes del inicio de los ensayos de AQC, la capacidad infectiva de la cepa de *Plasmodium* murino que se vaya a utilizar en los ensayos de AQC, junto con la tasa curativa de la primaquina para la cepa del parásito, pues esto permitiría optimizar los controles y ajustar las condiciones del ensayo a las características infectivas de la cepa de *Plasmodium* en particular.
2. Con respecto al desarrollo de compuesto híbridos primaquina-quinoxalina, se sugiere utilizar otros sustituyentes en la posición R7 del híbrido o no hacer sustituciones y emplear otros conectores hidrolizables que permitan la separación de los compuestos híbridos y la acción de sus componentes por separado.
3. Para continuar con la evaluación de la actividad quimioprofiláctica causal del híbrido QX6 es necesario determinar su perfil farmacocinético, para implementar nuevos esquemas terapéuticos donde se administre el compuesto a dosis más altas y/o más frecuentes durante las 48 horas que tarda la esquizogonia hepática y hacer estudios farmacodinámicos que permitan determinar modos de acción y posibles blancos terapéuticos del híbrido.
4. Nuevos esquemas terapéuticos del híbrido QX6 podrían evaluarse en ratones humanizados infectados con *Plasmodium* de humanos como *P. falciparum*, para así obtener resultados más extrapolables a la población a la que se desea impactar.

ANEXOS

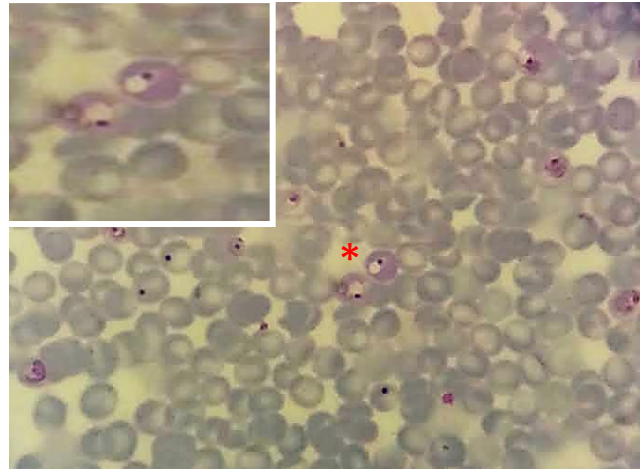
Anexo 1. Parasitemia desarrollada en los ratones Balb/c infectados con *P. yoelii* 17XNL el día 5 de seguimiento, en función de la vía de administración y el número de esporozoítos inoculados



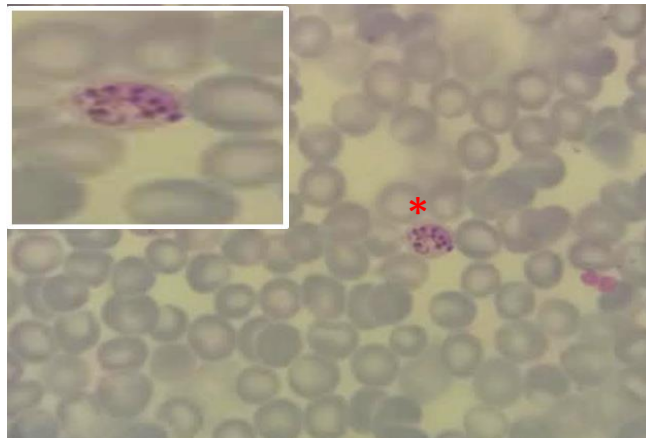
Barras azules: cantidad de esporozoítos inoculados en cada ratón (n=7). Línea roja: parasitemia alcanzada al día 5 pos inoculación.

Anexo 2. Formas sanguíneas de *P. yoelii* 17XNL en sangre periférica coloreada con Giemsa.

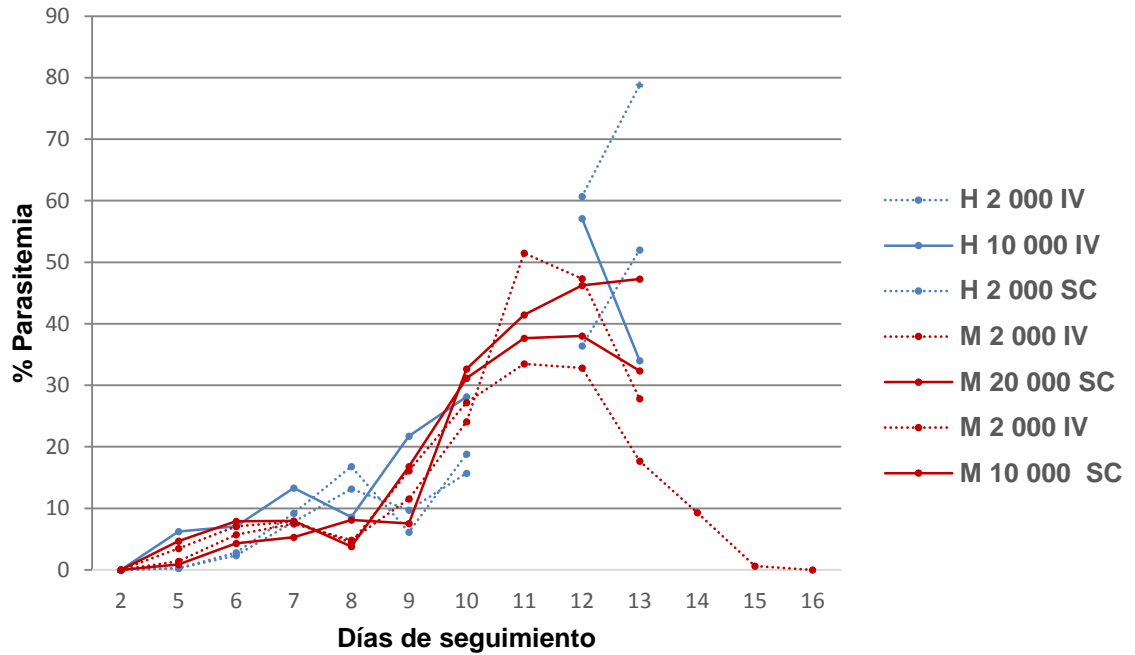
A. Recuadro: * Trofozoítos dentro de reticulocitos de ratón Balb/c



B. Recuadro: *Esquizonte dentro de un reticulocito de ratòn Balb/c

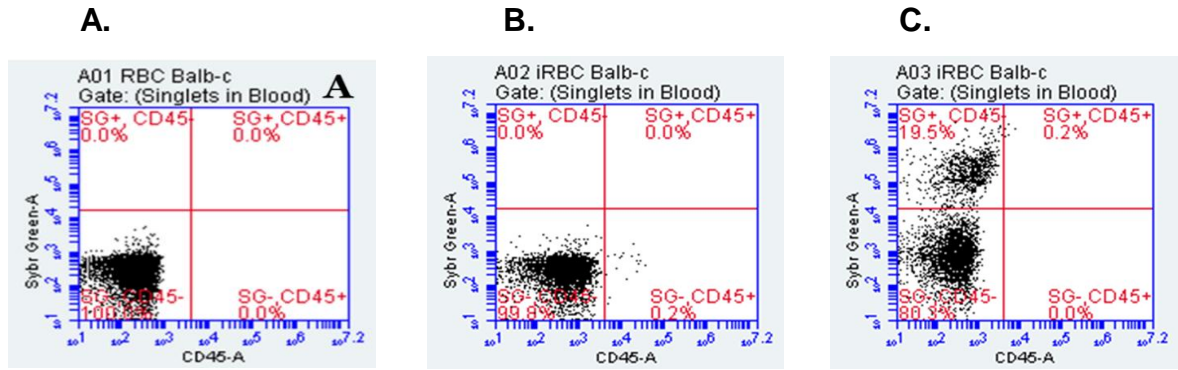


Anexo 3. Cinética de la parasitemia entre los días 2 y 16 de seguimiento de los ratones Balb/c infectados con *P. yoelii* 17XNL



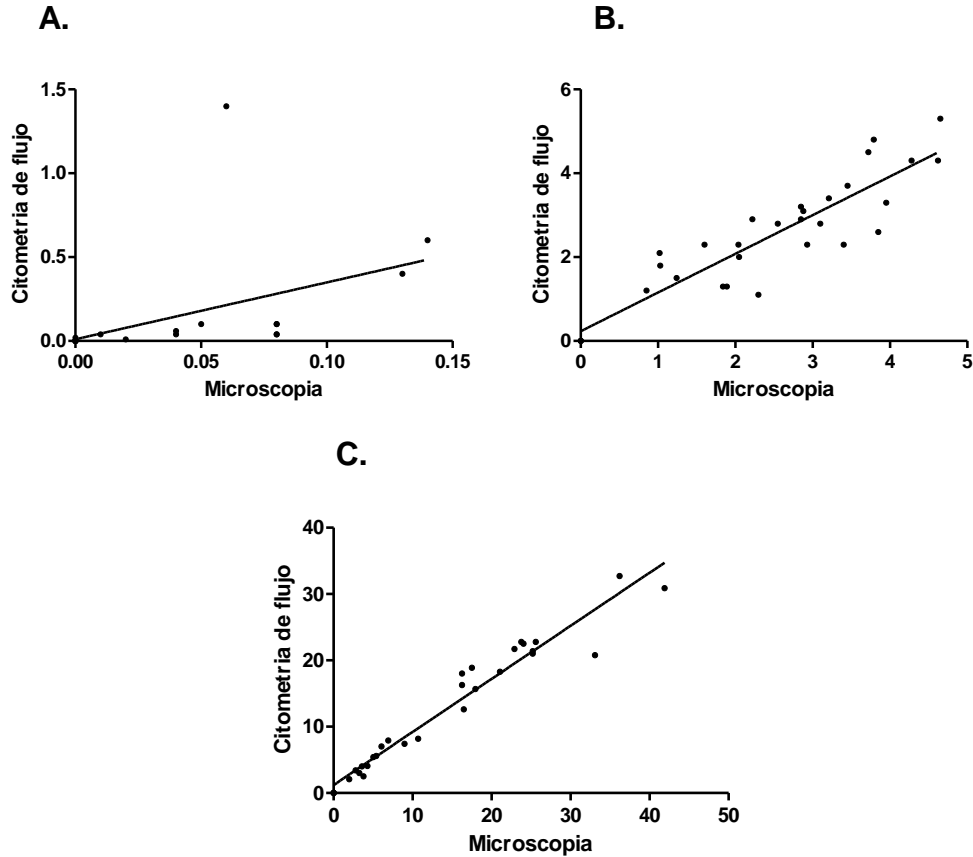
Ratones machos (líneas rojas), hembras (líneas azules). Infectados con 2 000 esporozoítos (línea discontinua) y 10 000 o 20 000 (línea continua).

Anexo 4. Análisis por citometría de flujo de la sangre de ratones Balb/c.



A. sangre de un ratón no infectado (control). **B** Población celular CD45+ (leucocitos) en un ratón no infectado. **C.** Eritrocitos parasitados (19,5%). Sybr green positivos + CD45 negativos; SG+,CD45-.

Anexo 5. Correlación entre microscopía y citometría de flujo para la determinación de la parasitemia en los días 4, 7 y 14 de seguimiento.



Análisis de correlación de rangos en **A: día 4 de seguimiento:** $n=20$ (pendiente=1,084. $r^2: 0,8910$). **B: día 7 de seguimiento:** $n=20$ (pendiente= 0,2950, $r^2=0,8704$). **C: día 14 de seguimiento:** $n=30$ (pendiente= 1,250, $r^2=0,9724$).

BIBLIOGRAFÍA

1. Repeto M, Sanz P. GLOSARIO DE TERMINOS USADOS EN TOXICOLOGIA. Recomendaciones de la IUPAC. In: EAET, editor. España: Asociación Española de Toxicología; 1995. p. 1-77.
2. Guidelines for the treatment of malaria, third edition, WHO, 2015. Available from: http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/162441/1/9789241549127_eng.pdf?ua=1&ua=1.
3. Snow RW, Omumbo JA, Lowe B, Molyneux CS, Obiero JO, Palmer A, et al. Relation between severe malaria morbidity in children and level of Plasmodium falciparum transmission in Africa. Lancet (London, England). 1997;349(9066):1650-4.
4. Bruce-Chwatt J RHC, Craig J, David F, Wernsdorfer W, Walther H. . Preventive use of antimalarials drugs. Monograph. Chemoteraphy of Malaria 2nd ed ed. Geneva: World Health Organization; 1986. p. 151-65.
5. Baird JK. Suppressive chemoprophylaxis invites avoidable risk of serious illness caused by Plasmodium vivax malaria. Travel medicine and infectious disease. 2013;11(1):60-5.
6. 423 Acute Oral Toxicity – Acute Toxic Class Method 2001. In: OECD GUIDELINE FOR TESTING OF CHEMICALS [Internet]. Organisation for Economic Co-operation and Development. 17th. Available from: <http://www.oecd.org/chemicalsafety/testing/>.
7. World Health Organization. World Malaria Report 2015 Geneva 2016 [cited 2017 11 Abril]. Switzerland. Available from: http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/200018/1/9789241565158_eng.pdf?ua=1.
8. Graham, P. Malaria parasites of man: life-cycles and morphology (excluding ultrastructure). In: W W, Sir I McGregor, editor. Malaria principles and Practice of Malariology. First edition ed. Edinburgh: Churchill Livingstone1988. p. 60-6.
9. Black RH, Canfield CJ, Clyde DF, Peters W, Wernsdorfer WH. Preventive use of antimalarials drugs. In: Chemoteraphy of Malaria [Internet]. 2nd ed. Bruce-Chwatt LJ, editor. Geneva: WHO; 1986. p. 151-65 [cited 2016 Apr 27]. Available from:http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/38605/1/WHO_MONO_27_%28ed%29.pdf
10. Recht J, Ashley E, White N. Safety of 8-Aminoquinoline antimalarial medicines [Internet]. Geneva: WHO; 2014 [cited 2016 Apr 27]. Available from: http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/112735/1/9789241506977_eng.pdf?ua=1.
11. Grewal RS. Pharmacology of 8-aminoquinolines. Bulletin of the World Health Organization. 1981;59(3):397-406.
12. Soto J, Toledo J, Rodriguez M, Sanchez J, Herrera R, Padilla J, et al. Primaquine prophylaxis against malaria in nonimmune Colombian soldiers: efficacy and toxicity. A randomized, double-blind, placebo-controlled trial. Annals of internal medicine. 1998;129(3):241-4.
13. Schwartz E, Regev-Yochay G. Primaquine as prophylaxis for malaria for nonimmune travelers: A comparison with mefloquine and doxycycline. Clinical infectious

- diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America. 1999;29(6):1502-6.
14. Fryauff DJ, Baird JK, Basri H, Sumawinata I, Purnomo, Richie TL, et al. Randomised placebo-controlled trial of primaquine for prophylaxis of falciparum and vivax malaria. *Lancet* (London, England). 1995;346(8984):1190-3.
 15. Baird JK, Lacy MD, Basri H, Barcus MJ, Maguire JD, Bangs MJ, et al. Randomized, parallel placebo-controlled trial of primaquine for malaria prophylaxis in Papua, Indonesia. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*. 2001;33(12):1990-7.
 16. Baird JK, Hoffman SL. Primaquine therapy for malaria. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*. 2004;39(9):1336-45.
 17. John GK, Douglas NM, von Seidlein L, Nosten F, Baird JK, White NJ, et al. Primaquine radical cure of *Plasmodium vivax*: a critical review of the literature. *Malaria journal*. 2012;11:280.
 18. Schwartz E. Prophylaxis of malaria. *Mediterranean journal of hematology and infectious diseases*. 2012;4(1):e2012045.
 19. Dembele L, Gego A, Zeeman AM, Franetich JF, Silvie O, Rametti A, et al. Towards an in vitro model of *Plasmodium* hypnozoites suitable for drug discovery. *PLoS one*. 2011;6(3):e18162.
 20. Burrows JN, van Huijsduijnen RH, Mohrle JJ, Oouvray C, Wells TN. Designing the next generation of medicines for malaria control and eradication. *Malaria journal*. 2013;12:187.
 21. MESA Alliance. Barcelona, España: WHO. Available from: <http://www.malariaeradication.org/>.
 22. Organización Mundial de la Salud. Estrategia Técnica Mundial Contra la Malaria 2016-2030. Ginebra 2015.
 23. Beutler E. Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency: a historical perspective. *Blood*. 2008;111(1):16-24.
 24. Mazier D, Renia L, Snounou G. A pre-emptive strike against malaria's stealthy hepatic forms. *Nature reviews Drug discovery*. 2009;8(11):854-64.
 25. Siu E, Ploss A. Modeling malaria in humanized mice: opportunities and challenges. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2015;1342:29-36.
 26. Hall N, Karras M, Raine JD, Carlton JM, Kooij TW, Berriman M, et al. A comprehensive survey of the *Plasmodium* life cycle by genomic, transcriptomic, and proteomic analyses. *Science* (New York, NY). 2005;307(5706):82-6.
 27. Agarwal D, Gupta RD, Awasthi SK. Antimalarial hybrid molecules: a close reality or a distant dream? *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2017.
 28. Muregi FW, Ishih A. Next-Generation Antimalarial Drugs: Hybrid Molecules as a New Strategy in Drug Design. *Drug development research*. 2010;71(1):20-32.
 29. Capela R, Cabal GG, Rosenthal PJ, Gut J, Mota MM, Moreira R, et al. Design and evaluation of primaquine-artemisinin hybrids as a multistage antimalarial strategy. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2011;55(10):4698-706.

30. Lodige M, Lewis MD, Paulsen ES, Esch HL, Pradel G, Lehmann L, et al. A primaquine-chloroquine hybrid with dual activity against Plasmodium liver and blood stages. *International journal of medical microbiology* : IJMM. 2013;303(8):539-47.
31. Quiliano M, Pabon A, Ramirez-Calderon G, Barea C, Deharo E, Galiano S, et al. New hydrazine and hydrazide quinoxaline 1,4-di-N-oxide derivatives: In silico ADMET, antiplasmodial and antileishmanial activity. *Bioorganic & medicinal chemistry letters*. 2017;27(8):1820-5.
32. Ta TH, Hisam S, Lanza M, Jiram AI, Ismail N, Rubio JM. First case of a naturally acquired human infection with Plasmodium cynomolgi. *Malaria journal*. 2014;13:68.
33. Instituto Nacional de Salud- Dirección de Vigilancia y Análisis del Riesgo en Salud Pública: Instituto Nacional de Salud, Colombia; 2016 [cited 2017 19 Abril]. Available from: <http://www.ins.gov.co/boletin-epidemiologico/Boletn%20Epidemiolgico/2016%20Bolet%C3%ADn%20epidemiol%C3%B3gico%20semana%2052%20-.pdf>.
34. Raphemot R, Posfai D, Derbyshire ER. Current therapies and future possibilities for drug development against liver-stage malaria. *The Journal of clinical investigation*. 2016;126(6):2013-20.
35. Black RH CC, Clyde DF, Peters W, Wernsdorfer WH. Preventive use of antimalarials drugs. *Chemoteraphy of Malaria 2nd ed ed*. Geneva: WHO; 1986. p. 151-65
36. Baird JK, Fryauff DJ, Hoffman SL. Primaquine for prevention of malaria in travelers. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*. 2003;37(12):1659-67.
37. Organización Mundial de la Salud. Estrategia Tecnica Mundial Contra La Malaria 2016–2030 Ginebra2015. Available from: http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/186671/1/9789243564999_spa.pdf?ua=1.
38. Arnold J, Alving AS, Hockwald RS, Clayman CB, Dern RJ, Beutler E, et al. The effect of continuous and intermittent primaquine therapy on the relapse rate of Chesson strain vivax malaria. *The Journal of laboratory and clinical medicine*. 1954;44(3):429-38.
39. Arnold J, Alving AS, Hockwald RS, Clayman CB, Dern RJ, Beutler E, et al. The antimalarial action of primaquine against the blood and tissue stages of falciparum malaria (Panama, P-F-6 strain). *The Journal of laboratory and clinical medicine*. 1955;46(3):391-7.
40. Peters W. *Chemotherapy and drug resistance in malaria*. London and New York: Academic Press; 1970.
41. Fink E. Assessment of causal prophylactic activity in Plasmodium berghei yoelii and its value for the development of new antimalarial drugs. *Bulletin of the World Health Organization*. 1974;50(3-4):213-22.
42. Ploemen IH, Prudencio M, Douradinha BG, Ramesar J, Fonager J, van Gemert GJ, et al. Visualisation and quantitative analysis of the rodent malaria liver stage by real time imaging. *PloS one*. 2009;4(11):e7881.
43. Greenberg J, Coatney GR, Trembley HL. Relationship between time of administration, dose, and prophylactic activity of pyrimethamine on sporozoite-induced Plasmodium gallinaceum infections. *The American journal of tropical medicine and hygiene*. 1954;3(4):672-5.

44. Rios-Orrego A, Blair-Trujillo, S, Pabon-Vidal A. Avances en la búsqueda y desarrollo de quimioprofilácticos causales para malaria. 2017;30(2):171-86.
45. World Health Organization. Guidelines for the treatment of malaria . Geneva: WHO; 2015 [cited 2017 19 Abril]. 3rd ed:[Available from: http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/162441/1/9789241549127_eng.pdf
46. Waters N, Edstein M. 8-Aminoquinolines: Primaquine and Tafenoquine. In: S SHaK, editor. Treatment and prevention of malaria Antimalarial drug: chemistry, action and use. First edition. ed: Springer Basel. p. 69-94.
47. Vasquez-Vivar J, Augusto O. Hydroxylated metabolites of the antimalarial drug primaquine. Oxidation and redox cycling. The Journal of biological chemistry. 1992;267(10):6848-54.
48. Thomas D, Tazerouni H, Sundararaj KG, Cooper JC. Therapeutic failure of primaquine and need for new medicines in radical cure of Plasmodium vivax. Acta tropica. 2016;160:35-8.
49. McKeage K, Scott L. Atovaquone/proguanil: a review of its use for the prophylaxis of Plasmodium falciparum malaria. Drugs. 2003;63(6):597-623.
50. Ling J, Baird JK, Fryauff DJ, Sismadi P, Bangs MJ, Lacy M, et al. Randomized, placebo-controlled trial of atovaquone/proguanil for the prevention of Plasmodium falciparum or Plasmodium vivax malaria among migrants to Papua, Indonesia. Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America. 2002;35(7):825-33.
51. Recht J, Ashley E, White N. Safety of 8-Aminoquinoline antimalarial medicines [Internet]. Geneva: WHO; 2014 [cited 2016 Apr 27]. Available from: http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/112735/1/9789241506977_eng.pdf?ua=1
52. Walsh DS, Wilairatana P, Tang DB, Heppner DG, Jr., Brewer TG, Krudsood S, et al. Randomized trial of 3-dose regimens of tafenoquine (WR238605) versus low-dose primaquine for preventing Plasmodium vivax malaria relapse. Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America. 2004;39(8):1095-103.
53. Kuhlen KL, Chatterjee AK, Rottmann M, Gagaring K, Borboa R, Buenviaje J, et al. KAF156 is an antimalarial clinical candidate with potential for use in prophylaxis, treatment, and prevention of disease transmission. Antimicrobial agents and chemotherapy. 2014;58(9):5060-7.
54. White NJ, Duong TT, Uthaisin C, Nosten F, Phyo AP, Hanboonkunupakarn B, et al. Antimalarial Activity of KAF156 in Falciparum and Vivax Malaria. The New England journal of medicine. 2016;375(12):1152-60.
55. Cox FE. History of the discovery of the malaria parasites and their vectors. Parasites & vectors. 2010;3(1):5. Warrel D, Chwatt's B. Essential Malariology. Fourth edition ed. Londres; 2002.
56. MacCallum WG. ON THE HAEMATOZOAN INFECTIONS OF BIRDS. The Journal of experimental medicine. 1898;3(1):117-36.
57. Landau YB. Life Cycles and Morphology. 1978. In: Rodent Malaria [Internet]. London: Elsevier Inc; [54-84].
58. Vincke IH, Lips M. [Not Available]. Annales de la Societe belge de medecine tropicale (1920). 1948;28(1):97-104.

59. Carter R. Infectiousness and gamete immunization in malaria. 1980. In: Malaria [Internet]. Columbus, Ohio: Julius P. Kreera; [263-93]. Available from: https://books.google.com.co/books?id=mJniBQAAQBAJ&printsec=frontcover&dq=malaria:+immunology+and+immunization&hl=en&sa=X&ved=0ahUKEwiwld_lkbPTAhUOziYKHxh3C-EQ6AEIjAA#v=onepage&q=malaria%3A%20immunology%20and%20immunization&f=false.
60. Gruner AC, Hez-Deroubaix S, Snounou G, Hall N, Bouchier C, Letourneur F, et al. Insights into the *P. y. yoelii* hepatic stage transcriptome reveal complex transcriptional patterns. *Molecular and biochemical parasitology*. 2005;142(2):184-92.
61. Botero L, Gomez R. Uso de animales de laboratorio en Colombia: reflexiones sobre aspectos normativos y éticos [Animal laboratory use in Colombia. *Rev Fac Med Vet Zoot*. 2013;60(3):213-9.
62. Comisión Nacional de Bioética . Código de Nuremberg. Normas éticas sobre experimentación en seres humanos México; 2014 [cited 2017 28 Abril]. Available from: http://www.conbioetica-mexico.salud.gob.mx/descargas/pdf/normatividad/normatinternacional/2.INTL_Cod_Nuremberg.pdf.
63. O'Flaherty K, Maguire J, Simpson JA, Fowkes FJI. Immunity as a predictor of anti-malarial treatment failure: a systematic review. *Malaria journal*. 2017;16(1):158.
64. Saadeh HA, Mubarak MS. Hybrid Drugs as Potential Combatants Against Drug-Resistant Microbes: A Review. *Current topics in medicinal chemistry*. 2017;17(8):895-906.
65. Kaur H, Machado M, de Kock C, Smith P, Chibale K, Prudencio M, et al. Primaquine-pyrimidine hybrids: synthesis and dual-stage antiplasmodial activity. *European journal of medicinal chemistry*. 2015;101:266-73.
66. Palos I, Rivera G. 1,4-Dióxido de quinoxalina; una opción viable para el desarrollo de fármacos antituberculosos. *Revista mexicana de ciencias farmacéuticas*. 2015;46:17-23.
67. Gil A, Pabon A, Galiano S, Burguete A, Perez-Silanes S, Deharo E, et al. Synthesis, biological evaluation and structure-activity relationships of new quinoxaline derivatives as anti-*Plasmodium falciparum* agents. *Molecules (Basel, Switzerland)*. 2014;19(2):2166-80.
68. Cheng G, Sa W, Cao C, Guo L, Hao H, Liu Z, et al. Quinoxaline 1,4-di-N-Oxides: Biological Activities and Mechanisms of Actions. *Front Pharmacol*. 2016;7:64.
69. Brizuela M, Huang HM, Smith C, Burgio G, Foote SJ, McMorrin BJ. Treatment of erythrocytes with the 2-cys peroxiredoxin inhibitor, Conoidin A, prevents the growth of *Plasmodium falciparum* and enhances parasite sensitivity to chloroquine. *PloS one*. 2014;9(4):e92411.
70. Jin X, Chen Q, Tang SS, Zou JJ, Chen KP, Zhang T, et al. Investigation of quinocetone-induced genotoxicity in HepG2 cells using the comet assay, cytokinesis-block micronucleus test and RAPD analysis. *Toxicology in vitro : an international journal published in association with BIBRA*. 2009;23(7):1209-14.

71. Jaso A, Zarranz B, Aldana I, Monge A. Synthesis of new 2-acetyl and 2-benzoyl quinoxaline 1,4-di-N-oxide derivatives as anti-Mycobacterium tuberculosis agents. *European journal of medicinal chemistry*. 2003;38(9):791-800.
72. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of immunological methods*. 1983;65(1-2):55-63.
73. Zofou D, Tematio EL, Ntie-Kang F, Tene M, Ngemenya MN, Tane P, et al. New antimalarial hits from *Dacryodes edulis* (Burseraceae)--part I: isolation, in vitro activity, in silico "drug-likeness" and pharmacokinetic profiles. *PLoS one*. 2013;8(11):e79544.
74. Barkan D, Ginsburg H, Golenser J. Optimisation of flow cytometric measurement of parasitaemia in plasmodium-infected mice. *International journal for parasitology*. 2000;30(5):649-53.
75. Organización Mundial de la Salud. Enfermedades tropicales desatendidas: preguntas más frecuentes: ¿Qué son las enfermedades tropicales desatendidas? Suiza: OMS. Available from: http://www.who.int/topics/tropical_diseases/qa/faq/es/.
76. Estevez Y, Quiliano M, Burguete A, Cabanillas B, Zimic M, Malaga E, et al. Trypanocidal properties, structure-activity relationship and computational studies of quinoxaline 1,4-di-N-oxide derivatives. *Experimental parasitology*. 2011;127(4):745-51.
77. Burguete A, Estevez Y, Castillo D, Gonzalez G, Villar R, Solano B, et al. Anti-leishmanial and structure-activity relationship of ring substituted 3-phenyl-1-(1,4-di-N-oxide quinoxalin-2-yl)-2-propen-1-one derivatives. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*. 2008;103(8):778-80.
78. Ancizu S, Moreno E, Solano B, Villar R, Burguete A, Torres E, et al. New 3-methylquinoxaline-2-carboxamide 1,4-di-N-oxide derivatives as anti-Mycobacterium tuberculosis agents. *Bioorganic & medicinal chemistry*. 2010;18(7):2713-9.
79. Zarranz B, Jaso A, Aldana I, Monge A. Synthesis and antimycobacterial activity of new quinoxaline-2-carboxamide 1,4-di-N-oxide derivatives. *Bioorganic & medicinal chemistry*. 2003;11(10):2149-56.
80. Bejon P, Andrews L, Andersen RF, Dunachie S, Webster D, Walther M, et al. Calculation of liver-to-blood inocula, parasite growth rates, and preerythrocytic vaccine efficacy, from serial quantitative polymerase chain reaction studies of volunteers challenged with malaria sporozoites. *The Journal of infectious diseases*. 2005;191(4):619-26.
81. Zuzarte-Luis V, Sales-Dias J, Mota MM. Simple, sensitive and quantitative bioluminescence assay for determination of malaria pre-patent period. *Malaria journal*. 2014;13:15.
82. Lacrue AN, Saenz FE, Cross RM, Udenze KO, Monastyrskiy A, Stein S, et al. 4(1H)-Quinolones with liver stage activity against *Plasmodium berghei*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2013;57(1):417-24.
83. Singh N, Puri SK. Causal prophylactic activity of antihistaminic agents against *Plasmodium yoelii nigeriensis* infection in Swiss mice. *Acta tropica*. 1998;69(3):255-60.

84. Puri SK, Singh N. Azithromycin: antimalarial profile against blood- and sporozoite-induced infections in mice and monkeys. *Experimental parasitology*. 2000;94(1):8-14.
85. Coppi A, Cabinian M, Mirelman D, Sinnis P. Antimalarial activity of allicin, a biologically active compound from garlic cloves. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2006;50(5):1731-7.
86. Carraz M, Jossang A, Franetich JF, Siau A, Ciceron L, Hannoun L, et al. A plant-derived morphinan as a novel lead compound active against malaria liver stages. *PLoS Med*. 2006;3(12):e513.
87. Batista R, Silva Ade J, Jr., de Oliveira AB. Plant-derived antimalarial agents: new leads and efficient phytomedicines. Part II. Non-alkaloidal natural products. *Molecules* (Basel, Switzerland). 2009;14(8):3037-72.