



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Facultad de Química

**“ INVESTIGACION DEL EFECTO TERAPEU-
TICO DEL PRINCIPIO AMARGO DE Tabebuia
rosea SOBRE Plasmodium berghei yoelii ”**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE :

QUIMICO FARMACEUTICO BILOGO

P R E S E N T A :

Silvia Elena Palacios Burgos

MEXICO, D. F.

1983



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

C O N T E N I D O

	Página
OBJETIVO	1
INTRODUCCION	2
MATERIAL Y METODOS	10
RESULTADOS	35
DISCUSION	87
CONCLUSIONES	89
BIBLIOGRAFIA	93

OBJETIVO

En vista de que en el sureste de México, principalmente en los Estados de Tabasco y Chiapas, existen antecedentes de que la infusión acuosa de la corteza de Tabebuia rosea (macuilis) se usa popularmente como agente antiinfeccioso, al cual se le atribuyen en especial propiedades antipalúdicas, a las que relacionan con el sabor amargo del "té", y de que actualmente ya se conoce el proceso de obtención y la estructura del principio amargo de la corteza de esta planta, se consideró la oportunidad de aislar esta sustancia para verificar su potencialidad antipalúdica, lo cual constituye el motivo de este trabajo.

INTRODUCCION

El paludismo es una infección causada por esporozoarios del género Plasmodium y transmitida en la naturaleza por mosquitos. Se caracteriza por paroxismos periódicos de fiebre, escalofríos y sudoración, asociados con anemia, esplenomegalia y recaídas de curso crónico (1,2).

Esta enfermedad es la causa de considerable mortalidad infantil en los países en que se presenta, debido a que los infantes sufren la forma aguda de la misma. En adultos algunas veces ocurre como epidemia, pero la mayoría de las veces es insidiosa en su efecto; reduce el vigor de las comunidades y debido a esto, su presencia continua es causa de retardo en el desarrollo social y económico, por lo que ha sido objeto de preocupación de médicos, ingenieros sanitarios, sociólogos e higienistas (3).

La especie humana ha padecido esta mal probablemente desde que se diferenció de la especie que le precedió. Los parásitos causantes de tal enfermedad y los insectos que la transmiten existieron desde mucho antes de la aparición del hombre en la Tierra (1). Todas las edades, sexos y razas parecen ser igualmente susceptibles a la enfermedad, excepto los negros con anemia falciforme, quienes presentan protección parcial contra malaria por P. falciparum y muchos negros que carecen de ciertos determinantes sanguíneos del grupo Duffy, quienes están protegidos contra infecciones causadas por P. vivax (4).

Hasta el siglo XIX la enfermedad se atribuía al efecto de emanaciones insalubres de pantanos y aguas estancadas, por lo que se le llamó fiebre de los pantanos, paludismo o malaria (mal aria).

En forma natural el hombre contrae la enfermedad por picadura de un mosquito infectado con esporozoítos, los cuales son las formas infectantes del parásito. A su vez el mosquito se infecta cuando, de una persona infectada, toma sangre conteniendo gametocitos, los cuales son las formas sexuales del parásito.

Se conocen cuatro especies de parásitos causantes de paludismo humano: Plasmodium falciparum, P. vivax, P. malariae y P. ovale; P. falciparum y P. vivax son responsables del mayor número de casos de malaria en el mundo, siendo P. vivax la de más amplia distribución.

En los últimos años se ha obtenido una gran variedad de agentes quimioterapéuticos más eficaces y con un espectro de acción más amplio que la quinina, pero se han presentado dificultades a causa de los efectos secundarios y de la aparición de parásitos resistentes, por lo cual se hace necesaria la búsqueda de nuevos medicamentos.

La resistencia a los fármacos se convirtió en un problema después de la introducción de pirimetamina y otros antimetabolitos. Poco después de la introducción de proguanil se observó resistencia a este medicamento, tanto

en malaria por P. falciparum como en malaria por P. vivax, pero la presencia de resistencia a estos fármacos no se consideró como un problema serio, ya que los parásitos resistentes todavía eran sensibles a otros fármacos, tales como: cloroquina, quinacrina y quinina. Sin embargo, la situación se hizo realmente alarmante después de 1960, cuando se reportaron muchos casos de infecciones por P. falciparum resistentes a cloroquina (5).

La preparación de nuevos fármacos para el tratamiento del paludismo humano depende, por supuesto, de los resultados de las pruebas iniciales y secundarias que tienen lugar una vez que el químico ha sintetizado un "posible" antipalúdico antes de experimentar el compuesto en infecciones provocadas en el hombre, para evaluarlo posteriormente en la práctica. En el laboratorio, la investigación de nuevos medicamentos se realiza en dos fases:

- 1) Identificación de la actividad antipalúdica de compuestos hasta entonces no estudiados, y
- 2) Determinación del alcance de esa actividad en función de su aplicación al tratamiento de los distintos tipos de paludismo humano.

Por razones obvias, la segunda de estas fases implica la realización de estudios sobre pautas y dosis, sobre tolerancia y reacciones secundarias y sobre márgenes de seguridad.

Hasta ahora, para la identificación primaria de la actividad antipalúdica se ha utilizado el paludismo de aves y roedores, mientras que el paludismo de monos ha servido para una determinación posterior más precisa. Desde que se demostró que P. berghei puede provocar graves infecciones en numerosas cepas de ratones y ratas de laboratorio, se ha utilizado mucho este parásito en la búsqueda de mejores antipalúdicos (6). Si se tiene debidamente en cuenta el tipo de roedor utilizado (que por lo general es un ratón) y la edad y dieta del huésped, pueden emplearse con bastante precisión las infecciones por trofozoítos de P. berghei.

Todas las pruebas que son eslabones importantes en la preparación de posibles agentes terapéuticos antes del estudio definitivo de la acción de éstos en el paludismo humano, se basan en la infección por Plasmodium en monos.

Para investigaciones de rutina, se puede usar un rango de dosis y fijar una dosis, expresada como miligramos por kilogramo de peso corporal, requerida para producir un efecto particular, por ejemplo, la dosis mínima curativa o la dosis mínima que prologará el tiempo medio de supervivencia de los animales tratados por un período dado más allá que el de los controles, es decir, una dosis mínima efectiva. Alternativamente, el resultado se puede expresar como un porcentaje de los eritrocitos parasitados a diferentes tiempos después de la administración del compuesto, o como la dosis necesaria para suprimir la parasitemia a un nivel dado.

En lo que respecta a la selección y evaluación de plantas con posible actividad biológica, es frecuente recurrir a la información relacionada con su aplicación empírica. Aunque no hay duda de que muchos de los fármacos usados hoy en día fueron descubiertos por el estudio de las plantas señaladas como activas por la medicina tradicional, los estudios químicos no siempre conducen a la obtención de principios activos. La baja retribución de compuestos activos, con respecto al volumen de vegetales estudiados, es causada principalmente por el uso de procedimientos inadecuados para la extracción de las sustancias, y por la carencia de metodología adecuada para la evaluación de la actividad biológica de los extractos y fracciones obtenidas de los mismos.

La selección de Tabebuia rosea estuvo basada principalmente en la información etnobotánica de su uso como agente antiinfeccioso. Martínez (7) se refiere a esta planta como: "Arbol de madera industrial. El cocimiento de la corteza y las hojas se considera como febrífugo. También para clorosis y poluciones (?) se usa el cocimiento de la corteza y la raíz, por agua de uso".

A continuación se resumen los datos principales, tomados de Pennenngton (8).

Tabebuia rosea pertenece a la tribu Tecomeae de la familia Bignoniaceae. En México se encuentra en la vertiente

del Golfo desde el Sur de Tamaulipas y el Norte de Puebla y Veracruz hasta el Norte de Chiapas y Sur de Campeche; en la vertiente del Pacífico desde Nayarit hasta Chiapas. Se presenta indiferentemente en suelos de origen calizo, ígneo o aluvial, pero en general, con algunos problemas de drenaje. Alcanza sus mayores desarrollos en Tabasco, Campeche y Chiapas.

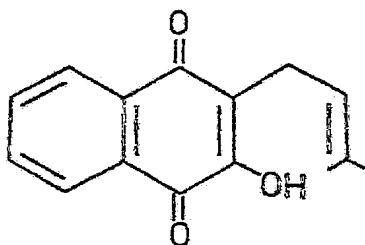
En nuestros climas cálidos se destaca este árbol por sus flores muy vistosas y grandes que aparecen cuando han caído las hojas. Es un árbol hasta de 20 metros de altura, con hojas compuestas de 5 folíolos lanceolados y elípticos, siendo los dos anteriores más pequeños y el terminal más grande. Los árboles de esta especie pierden las hojas de marzo a junio. Las flores se producen en corimbos y su corola es de 7 a 10 cm de largo, de color rosado o violáceo, a veces casi blanco. El fruto es alargado, de 20-35 cm de largo por 12 cm de ancho. Es el árbol nacional en El Salvador.

Los datos que se proporcionan a continuación fueron obtenidos de Compadre C. (9):

Los estudios fitoquímicos previos sobre Tabebuia rosea efectuados en hojas, madera, raíz y corteza, indican la presencia de quinonas, β -sitosterol y quercetina. En otras especies de la misma familia se han encontrado quinonas, polifenoles, compuestos iridoides, glucósidos, dibenzantonas y alcaloides.

Existen varios estudios acerca del efecto biológico de diversas especies de Tabebuia, así como de plantas de géneros afines, habiéndose estudiado sus efectos antimicrobianos, antitumorales, espasmolíticos y diuréticos. En la mayoría de las veces la actividad biológica se ha relacionado con la presencia de compuestos quinoides; en especial, de T. rosea se han aislado: lapachol, deshidro- α -lapachol, deshidro-isolapachol y lapachona, principalmente.

El lapachol y los compuestos relacionados se han estudiado por su actividad antimicrobiana, antineoplásica y antipalúdica. En este último caso Thompson (10) reporta que se ha encontrado efecto en paludismo de aves, pero no en paludismo de humanos y afirma que la carencia de actividad de las naftoquinonas en el paludismo de humanos se ha atribuido a problemas de baja absorción oral, fijación o prefección y desactivación por oxidación de la cadena terminal.



Lapachol

De las consideraciones anteriores pudiera suponerse que la actividad antiinfecciosa atribuida a la corteza de T. rosea estuviera parcialmente justificada por la presencia de lapachol y compuestos relacionados. Sin embargo, el uso de la infusión acuosa sugiere la posibilidad de la presencia de otros compuestos de mayor polaridad que el lapachol, que presenten características tales que confieran a la corteza propiedades antipalúdicas.

Por otro lado, la posibilidad de contrastar la creencia popular sobre la relación sabor amargo-efecto biológico, se ve facilitada por el aislamiento del principio amargo de la corteza.

MATERIAL Y METODOS

Recolección de la corteza de Tabebuia rosea

La corteza fue recolectada en el poblado de Bajadas Grandes, Chiapas, en el Km 85 de la carretera Villahermosa-Palenque.

Disolventes

Se emplearon metanol, cloroformo y acetato de etilo de grado industrial, que se destilaron dos veces antes de usarlos.

Cromatografía

Para la de capa fina se utilizaron placas Merck con gel de sílice tipo 60 F₂₅₄ de 0.25 mm de espesor. El sistema eluyente fue CHCl₃: CH₃OH, 8:2.

Para la de columna se utilizó sílica gel 60 con un tamaño de partícula de 0.063 - 0.200 mm, marca Merck.

Punto de fusión

Fue determinado en un aparato Fisher-Johns y las lecturas se expresan en grados centígrados.

Espectroscopía

Los espectros UV fueron tomados en un espectrofotómetro Perkin Elmer mod. 202.

Los espectros IR fueron corridos en un espectrofotómetro -- Perkin Elmer 337.

Para la espectrometría de RMN se usaron disolventes deuterados marca Merck; los espectros se corrieron en un aparato -- Varian EM 390 a 90 MHz.

Sustancias

El antipalúdico empleado como referencia fue la sal pura de difosfato de cloroquina, conteniendo un 62% de la base -- activa, proporcionada por el Dr. Francisco López Antuñano, - del Georgas Memorial Institute of Panama, Panamá.

El extracto metanólico fue obtenido de la corteza molida de Tabebuia rosea.

El 6-p-cumaroilcatalpol es el principio amargo de la cor^{te}za de Tabebuia rosea, obtenido a partir del extracto metanólico de la misma.

Material Biológico

Los animales empleados fueron ratones blancos cepa CD-1, - de ambos sexos, con un peso promedio entre 25 y 30 gramos, los cuales fueron proporcionados por el Bioterio de la Facultad de Medicina de la UNAM.

La cepa de Plasmodium berghei yoelii es mantenida en el - Laboratorio de Malariología desde 1969 por pases ratón-ratón. - Esta cepa fue obtenida de la Escuela de Medicina Tropical de -- Londres por cortesía del Profesor P.C.C. Garnham y del Dr. -- Davis.

Preparación del extracto metanólico

Se tomaron 600 g de corteza de T. rosea seca y previamente molida, los cuales se dejaron macerar en metanol durante 24 hrs., después de lo cual se decantó el líquido sobrenadante y se evaporó a sequedad; esta operación se repitió 5 veces, obteniendo al final 59 g de un sólido café oscuro, de sabor amargo.

Obtención de 6-p-cumaroilcatalpol

Del extracto metanólico se tomaron 30 g, los cuales fueron sometidos a 3 extracciones con hexano en frío y 2 en caliente (a reflujo), ambas con agitación continua, durante 20 min. cada una, procediendo a recolectar las muestras líquidas en un sólo recipiente. El líquido se evaporó hasta un volumen aproximado de 100 ml, del cual se tomó una alícuota de 10 ml. y se le agregaron 5 ml de hidróxido de amonio al 10%, con agitación vigorosa. La ausencia de una coloración roja en la fase acuosa fue indicativa de que no había Lapachol (quinona) en el extracto metanólico.

El extracto metanólico extraído con hexano se evaporó a sequedad y se le agregó metanol recién destilado, en una cantidad mínima suficiente para disolverlo completamente. Se repartió este concentrado en 2 frascos de centrifuga de 1000 ml, y a cada uno se le agregaron poco a poco y con agitación, 700 ml de acetato de etilo, observando la formación de un precipitado color marfil, que corresponde a fracciones polares más solubles en metanol que en acetato de etilo. Los frascos se taparon y se centrifugaron durante 15 min a 2000 rpm. Se separaron por decantación los líquidos sobrenadantes de ambos frascos y se recolectaron en un mismo recipiente. Sobre el residuo de cada frasco se volvieron a agregar 700 ml de acetato de etilo, se agitaron, se centrifugaron separando posteriormente los sobrenadantes, los cuales se mezclaron con los obtenidos anteriormente y se evaporaron a sequedad, obteniendo un polvo café oscuro de sabor amargo. La fracción que quedó en los frascos de centrifuga se evaporó a sequedad y se

obtuvo un polvo color marfil, de sabor dulce y muy higroscópico, que cuando se humedece adquiere un color amarillo obscuro.

El polvo café obscuro se cromatografió en columna sobre sílica gel inactivada al 13% de humedad (100 g de gel húmedo por gramo de extracto) usando primero cloroformo puro como eluyente y - aumentando poco a poco la polaridad de acuerdo con el siguiente esquema:

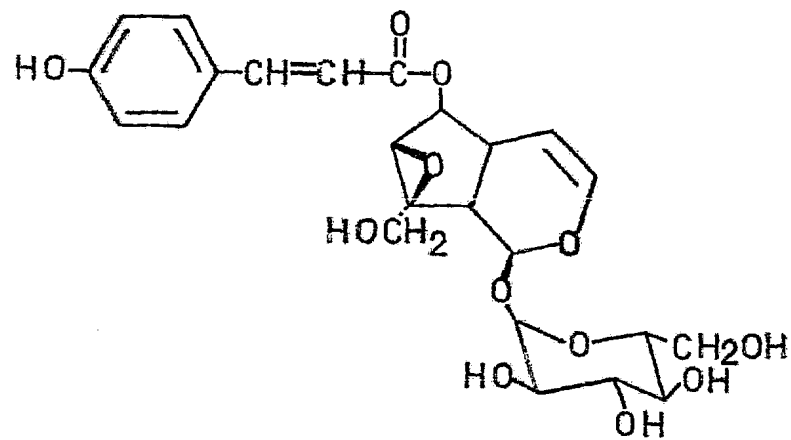
CHCl_3	:	CH_3OH
100		0
98		2
96		4
94		6
92		8
90		10

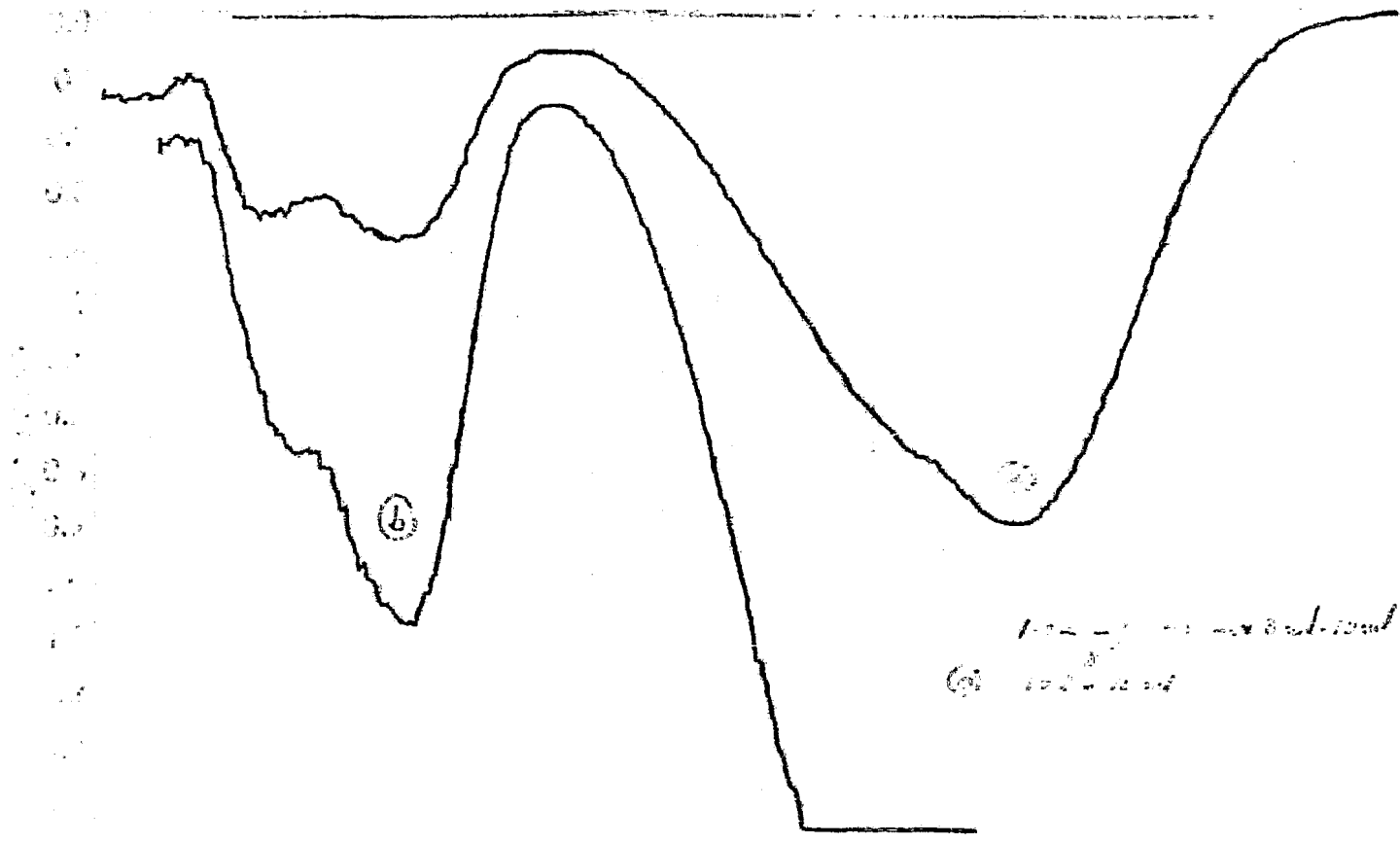
El desarrollo de la cromatografía en columna se siguió por cromatografía en capa fina hasta que con el sistema CHCl_3 : -- CH_3OH , 90:10 se obtuvo una fracción que mostró una mancha con un R_f de 0.23, que corresponde al compuesto buscado, el cual se trató con carbón activado y se recristalizó de agua, dando unos cristales blancos con punto de fusión de 242-243°C y sabor amargo. Este compuesto se encuentra en aproximadamente un 10% con respecto al extracto metanólico seco.

Los espectros UV, IR y de RMN de esta sustancia son iguales a los señalados por César Compadre [9], y corresponden al -- compuesto denominado 6-p-cumaroilcatalpol.

14.

6-p-Cumaroilcatalpol



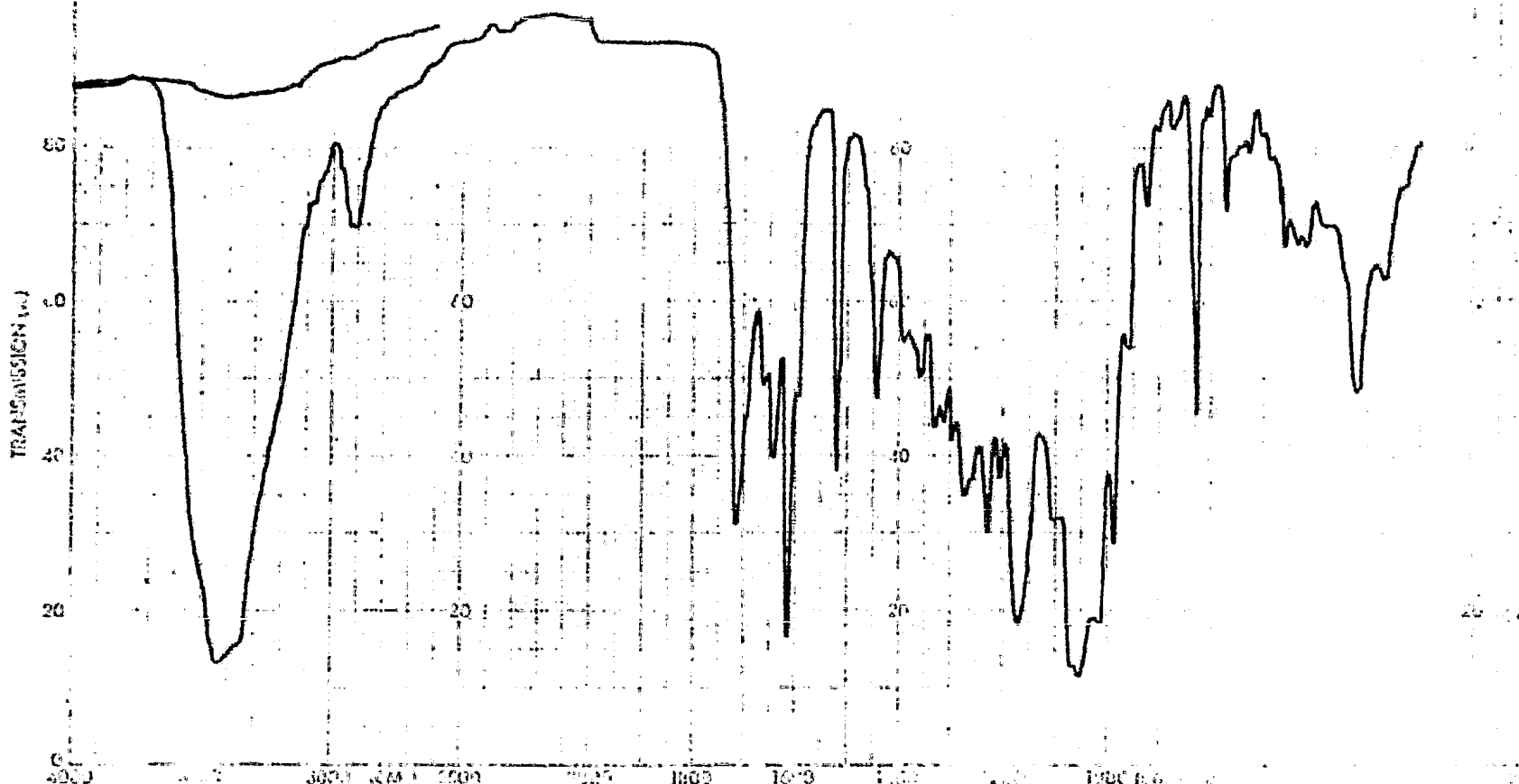


100 - 100 = 0
 (b) 100 - 100 = 0

100 - 100 = 0
 (b) 100 - 100 = 0

100 - 100 = 0
 (b) 100 - 100 = 0

100 - 100 = 0
 (b) 100 - 100 = 0



APPROXIMATE	COORDINATE	SCANNING TIME	PERCENT
EXPANSION	1ST	2ND PROGRAM	3RD
SAMPLE	REMARKS	SOLVENT	CONCENTRATION
SP-782	position	KBr	
SP-782			

START OF SWEEP

>-f->

END OF SWEEP

10ppm

900Hz

750

600

450

300

150

5ppm

450

375

300

225

150

75

2ppm

180

150

120

90

60

30

ppm (δ)

10

9

8

7

6

5

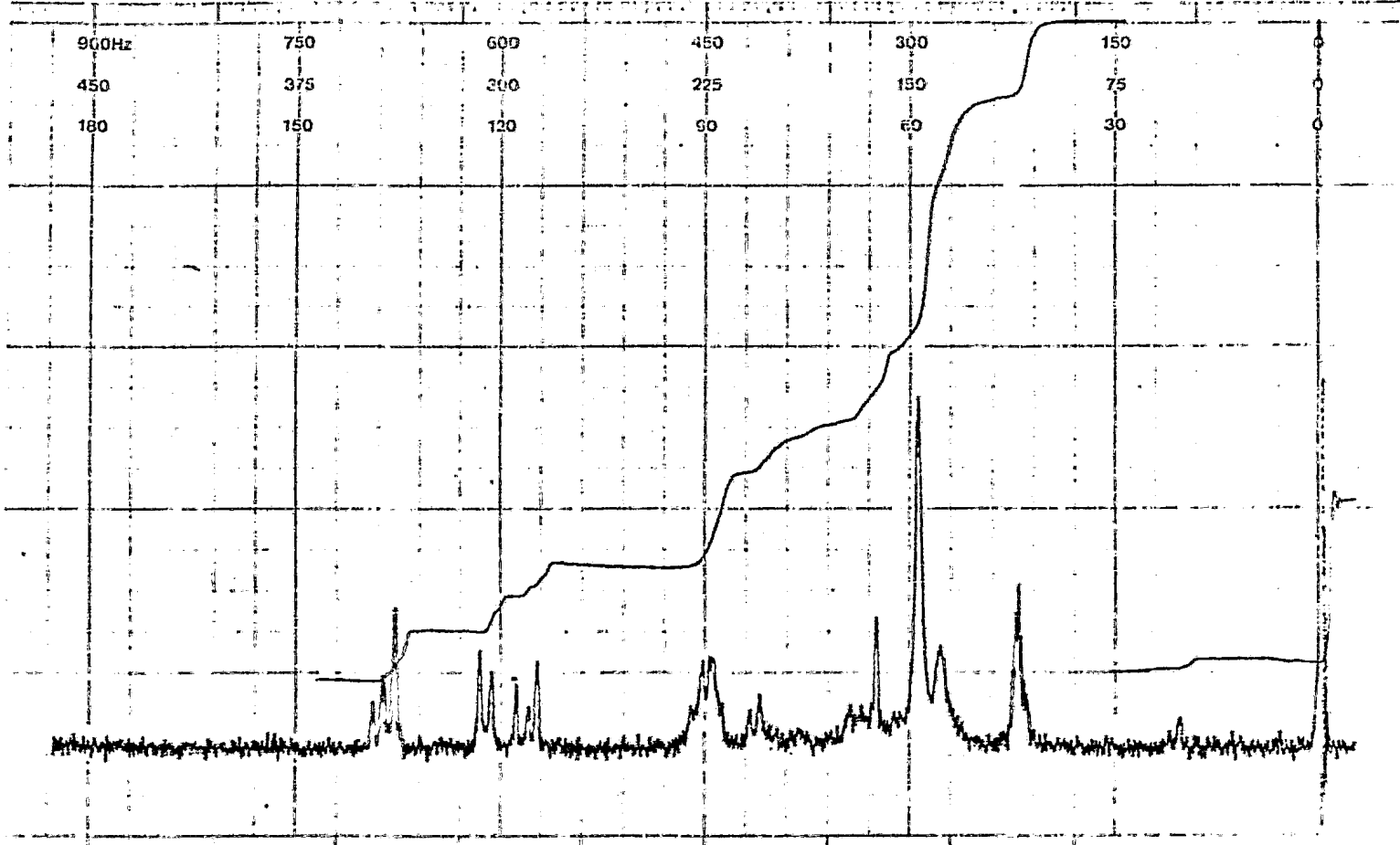
4

3

2

1

0



EXPERIMENTO I. ESTUDIO PRELIMINAR.

Se realizó con el fin de investigar la posible actividad biológica del extracto metanólico de la corteza de Tabebuia rosea sobre Plasmodium berghei yoelii, y comprende cuatro estudios, que son los siguientes:

- a) Prueba de toxicidad del extracto metanólico.
- b) Efecto de una sola dosis del extracto metanólico.
- c) Efecto de dos dosis (una diaria) del extracto metanólico.
- d) Efecto de tres dosis (una diaria) del extracto metanólico.

a) Prueba de toxicidad del extracto metanólico.

Se realizó con el objeto de estudiar la dosis máxima no tóxica del extracto metanólico adecuada para ser aplicada en la experimentación. Se llevó a cabo trabajando con un lote de 10 ratones machos. Se preparó una serie de 10 concentraciones diferentes de extracto metanólico y a cada ratón se le inyectó una dosis única de 1.0 ml por vía intraperitoneal, después de lo cual se procedió a estimar diariamente el estado clínico de los ratones: reflejos nerviosos (depresión o excitación), frecuencia respiratoria (acelerada o abatida), aspecto del pelo (erizado o no erizado), palidez, cianosis y movimientos involuntarios.

Transcurridos diez días a partir de la fecha en que los ratones recibieron el extracto metanólico, los animales sobrevivientes fueron sacrificados y se realizó la observación macroscópica de hígado, bazo, riñones, corazón, pulmones y cerebro, con el fin de detectar posibles cambios que indicaran daño tisular reflejado en alteraciones del tamaño, forma, color y/o presencia de hemorragias o necrosis.

Preparación de las diferentes concentraciones del extracto metanólico.

Tubo	ssí (ml) + extracto metanólico	Concentración g/ml	Ratón
1	1 1 g	1.0	1
2	2 1 g	0.5	2
3	1 1 ml	0.25	3
4	1 1 ml	0.125	4
5	1 1 ml	0.0625	5
6	1 1 ml	0.0312	6
7	1 1 ml	0.0156	7
8	1 1 ml	0.0078	8
9	1 1 ml	0.0039	9
10	1 1 ml	0.0019	10

NOTA: Los valores de las concentraciones son aproximados, ya que, a pesar de que el extracto metanólico es muy soluble en agua, al preparar las dos primeras concentraciones no se logró disolución total, por lo que fue necesario calentar hasta cerca de 60°C durante 5 minutos y posteriormente centrifugar a 2000 rpm, 5 min. para eliminar las partículas insolubles.

En los ensayos b, c y d siguientes se emplearon en cada uno 3 lotes de 10 ratones machos. Los lotes se denominaron: LOTE I, LOTE II y LOTE III.

El LOTE I fue inoculado con Plasmodium berghei yoelii y recibió "tratamiento con extracto metanólico (Lote problema).

El LOTE II fue inoculado con Plasmodium berghei yoelii y no recibió ningún tratamiento (Lote testigo de inóculo)

El LOTE III recibió el mismo tratamiento con extracto metanólico que el LOTE I pero no recibió parásitos (Lote testigo de extracto metanólico).

Los inóculos de Plasmodium berghei yoelii se prepararon poco antes de usarlos. Cada ratón recibió como inóculo 3 gotas de sangre obtenida de un ratón infectado, diluidas en 0.5 ml de solución salina isotónica estéril para el LOTE I y en 1.5 ml de la misma solución para el LOTE II, ya que esta última dilución iguala el volumen total de líquidos inyectados a los animales del LOTE I (0.5 ml de inóculo y 1.0 ml de solución de extracto metanólico).

No se creyó necesario en estas etapas contar con inóculos cuantificados siempre y cuando se tuviera cierto grado de certeza de que todos los animales recibieran aproximadamente la misma cantidad de parásitos.

La solución de extracto metanólico inyectada a los ratones de los LOTES I y III siempre se preparó inmediatamente antes de usarla. El procedimiento de preparación de esta solución incluye calentamiento y centrifugación, como ya se indicó anteriormente, teniendo al final una concentración aproximada de

30 mg de extracto metanólico/ml de solución salina isotónica estéril.

Tanto la suspensión de sangre con parásitos como la solución del extracto metanólico se administraron siempre por vía intraperitoneal.

La estimación de la parasitemia se realizó mediante la observación de extensión de sangre fijada con metanol absoluto y teñida con Giemsa, contando el número de eritrocitos parasitados en 500 eritrocitos y expresando la parasitemia como por ciento de -- eritrocitos parasitados.

El registro de la parasitemia de cada ratón de los LOTES I y II se inició 24 ó 48 horas después de haber inoculado los parásitos (tiempo en el cual ésta se empieza a hacer patente mediante observación microscópica) y se continuó determinando diariamente durante tiempos variables en cada experimento

b) Efecto de una sola dosis del extracto metanólico.

LOTE I (Lote problema)

1. A cada ratón se le inyectó 0.5 ml de suspensión de sangre parasitada.
2. Después de media hora cada ratón recibió una inyección de -- 1.0 ml de solución del extracto metanólico.
3. Las parasitemias se determinaron a partir de las 24 horas, -- hasta que se igualaron o tuvieron valores muy similares las del lote problema y las del lote testigo, después de lo cual sólo se procedió a registrar tiempo de muerte. Con esto -- cubriríamos los dos parámetros que nos permitieran medir alguna actividad del extracto metanólico: diferencias en la velocidad de reproducción de los parásitos y diferencias en la sobrevivencia de los ratones entre animales tratados y no -- tratados.

LOTE II (Lote testigo de inóculo).

1. A cada ratón se le inyectó 1.5 ml de suspensión de sangre pa_{ra} rasitada.
2. Se determinó la parasitemia de cada animal igual que en el lote anterior.

LOTE III (Lote testigo de extracto metanólico).

1. A cada ratón se le inyectó 1.0 ml de la solución del extracto metanólico.
2. Diariamente se observó el estado clinico de estos animales - hasta que murieron todos los de los LOTES I y II.
3. Se procedió a sacrificar a estos animales para realizar la - observación macroscópica de hígado, brazo, riñones, pulmones, corazón y cerebro, con el fin de verificar si en un número - mayor de animales la dosis usada no producía efectos tóxicos reflejados en alteraciones visibles macroscópicamente.

c) Efecto de dos dosis (una diaria) del extracto metanólico.

LOTE I (Lote problema).

1. A cada ratón se le inyectó 0.5 ml de suspensión de sangre pa_{ra} rasitada.
2. Después de media hora cada ratón recibió una inyección de -- 1.0 ml de solución del extracto metanólico.
3. 24 horas después de la inculación de parásitos se adminis-- tró una segunda dosis del extracto metanólico.
4. A partir de las 48 horas se registró diariamente la parasite_{ria} individual hasta la muerte del último ratón.

En el experimento anterior se dió por hecho que el efecto -- del extracto metanólico, en términos de parasitemia, está - dado por la diferencia que se puede demostrar entre el núme-- ro de parásitos de problema y testigo, y que cuando deja de-- existir tal diferencia, dicho efecto ya no es medible con es-- te parámetro, quedando en su lugar un segundo parámetro de -

medida que corresponde a tiempo de sobrevivencia comparado entre animales tratados y no tratados. Sobre estas bases se dejó de estimar la parasitemia en aquel experimento al 50. día, registrando sólo las muertes. En este segundo -- experimento, sin embargo, continuamos la estimación de la parasitemia hasta la muerte de tales animales, para corroborar si teníamos o no razón en nuestro planteamiento.

LOTE II (Lote testigo de inóculo)

1. Se inyectó a cada ratón 1.5 ml de suspensión de sangre parasitada.
2. Después de 48 horas se inició el registro de la parasitemia y éste se continuo diariamente hasta la muerte del último - ratón.

LOTE III (Lote testigo de extracto metanólico)

1. Se inyectó a cada ratón 1.0 ml de la solución extracto metanólico (Sin inyectar parásitos). Después de 24 horas se -- inyectó otra dosis igual de extracto metanólico.
2. Diariamente se observó el estado clinico de los animales hasta que murieron todos los ratones de los LOTES I y II.
3. Los ratones fueron sacrificados y se realizó la observación macroscópica de hígado, bazo, riñones, corazón, pulmones y - cerebro.

3) Efecto de 3 dosis (una diaria de extracto metanólico)

LOTE I (Lote problema)

1. Se inyectó a cada ratón 0.5 ml de suspensión de sangre parasitada.
2. Después de media hora se inyectó 1.0 ml de solución del extracto metanólico.
3. 24 horas después de la inoculación de parásitos se administró una segunda dosis del extracto metanólico.

4. 48 horas después de la inoculación de parásitos se administró una tercera dosis de extracto metanólico y se inició el registro diario de la parasitemia hasta la muerte del último ratón.

LOTE II (Lote testigo de inóculo).

1. Se inyectó a cada ratón 1.5 ml de suspensión de sangre parasitada.
2. A partir de las 48 horas después de la inoculación de parásitos se inició el registro de la parasitemia y se realizó diariamente hasta la muerte del último ratón.

LOTE III (Lote testigo de extracto metanólico).

1. Se inyectó a cada ratón 1.0 ml de la solución de extracto metanólico.
2. 24 horas después se les aplicó una segunda dosis y des -- pués de 48 horas se aplicó una tercera dosis.
3. Diariamente se observó el estado clínico de los ratones -- hasta que murieron todos los animales de los LOTES I y II.
4. Los ratones fueron sacrificados y se realizó la observa -- ción macroscópica de hígado, bazo, riñones, corazón, pul -- mones y cerebro.

Para los siguientes experimentos se consideró la necesi -- dad de realizar las siguientes modificaciones para ser aplica -- das en los ensayos del 6-p-cumaroilcatalpol:

1. El inóculo de Plasmodium berghei yoelii que se vaya a ad -- ministrar debe ser cuantificado y debe prepararse una mis -- ma suspensión para todos los lotes inmediatamente antes -- de usarla. Esto es con el fin de estandarizar el procedi -- miento, en vista de que las gotas de sangre tomadas de un -- ratón donador no siempre son del mismo volumen, por lo -- que no se podría tener la certeza de que los volúmenes ad -- ministrados a cada ratón fueran iguales.

2. No iniciar la administración del tratamiento media hora - después de la inoculación de parásitos, sino al menos después de 48 horas, en que ya se tiene una parasitemia factible de cuantificar y, además, con el objeto de evitar un posible contacto directo entre las sustancias administradas y los parásitos.
3. Se debe introducir un lote control tratado con un antipalúdico de referencia para hacer comparaciones entre la eficacia y la potencia de la sustancia en estudio.
4. Además de la determinación de la parasitemia, expresada como por ciento de eritrocitos parasitados, es conveniente contar con otro parámetro, ya que se ha observado que generalmente, después de que se alcanza la máxima parasitemia, los valores registrados tienden a disminuir y aumentar en forma variable, independientemente del estado clínico del animal. Se consideró que la determinación paralela de hemoglobina podría ser un buen parámetro para estimar el desarrollo de la infección (11).

EXPERIMENTO 2. ESTANDARIZACION DEL INOCULO CON MEDICION DE -- PARASITEMIA-HEMOGLOBINA.

La finalidad de este experimento fue la de poder definir el número de parásitos que debería contener cada inóculo para que fuera mortal en animales no tratados en un tiempo no mayor de 10 días. Para ésto se emplearon dos lotes de 5 ratones machos, los cuales recibieron inóculos diferentes de Plasmodium berghei-yoelii, y el curso de la infección fue determinado mediante la cuenta de eritrocitos parasitados y la determinación de niveles de hemoglobina.

Considerando que la determinación diaria de hemoglobina requiere el sangrado diario del animal en cuestión, sentimos la necesidad de saber si dicho sangrado extra no modifica por sí mismo los niveles de hemoglobina. Esto último nos obligó a la introducción de un lote más, en el que se investigaría si el hecho -

de tomar una pequeña cantidad de sangre de los ratones, en forma constante, tiene algún efecto sobre los niveles de hemoglobina.

Existen reportes en la literatura (10, 12, 13) en los que el tamaño del inóculo varía desde 1×10^4 hasta 15×10^6 - eritrocitos parasitados, por lo que decidimos investigar un inóculo de 5×10^5 y otro de 1×10^6 eritrocitos parasitados.

La preparación de los inóculos se realizó determinando el número de eritrocitos parasitados por cada 100 y estimando la cantidad total de eritrocitos/mm³ de sangre de un ratón infectado (ratón donador). La sangre de este ratón se diluyó para obtener finalmente 5×10^5 eritrocitos parasitados en 1.0 ml de solución salina isotónica estéril en un caso, y 1×10^6 eritrocitos-parasitados/ml de solución salina isotónica estéril en el otro.

La determinación de los niveles de hemoglobina se hizo por el método de la cianometahemoglobina (14). El día en que se inició el experimento se realizó una cuantificación de hemoglobina en todos los ratones de los tres lotes, y después cada tercer día hasta que murieron todos los animales de los LOTES I y II.

LOTE I

Cada ratón recibió un inóculo de 5×10^5 eritrocitos parasitados. Se cuantificó hemoglobina y se determinó % de eritrocitos parasitados.

LOTE II

Cada ratón recibió un inóculo de 1×10^6 eritrocitos parasitados. Se cuantificó hemoglobina y se determinó % de eritrocitos parasitados.

LOTE III

No recibió parásitos; solamente se cuantificó hemoglobina.

PRUEBAS CON DIFOSFATO DE CLOROQUINA COMO ANTIPALUDICO
DE REFERENCIA

Para efectos de comparación se consideró que un antipalúdi-
co ideal sería aquel que lograra una curación del 100% de los -
animales tratados. Este antipalúdico no existe, al menos en pa-
ludismo de roedores, por lo que seleccionamos a la cloroquina -
(difosfato de cloroquina) como droga de referencia, por ser el
antipalúdico de mayor uso y mejor acción.

En experiencias previas hechas por otros autores (13) se -
reporta un 20% de sobrevivencia de ratones infectados con --
Plasmodium berghei cuando se tratan con 0.03 mg de cloroquina/g
de peso X día X 5 días. Tomando como base estos datos, se hizo
necesario:

- a) Reconocer el grado de toxicidad de cloroquina en ratones -
CD-1 (que constituyen nuestro modelo), tanto a dosis de -
0.03 mg/g de peso, como dos dosis superiores.
- b) Observar si cualquiera de estas dosis de cloroquina por sí -
sola modifica los niveles de hemoglobina.
- c) Reconocer (en caso de que la toxicidad de cloroquina lo per-
mita), si la aplicación de dosis mayores de la misma mejora-
ese 20% de sobrevivencia.

Con este propósito se realizaron los dos ensayos que a --
continuación se describen.

EXPERIMENTO 3. TOXICIDAD DE CLOROQUINA-EFECTO SOBRE NIVELES DE HEMOGLOBINA.

En este estudio se emplearon 4 lotes de 5 ratones machos. A cada uno de tres lotes se les administró una dosis distinta de cloroquina diariamente durante 5 días consecutivos. El otro lote se utilizó como control de niveles de hemoglobina, recibiendo en lugar de cloroquina 1.0 ml de solución salina isotónica estéril. En todos los casos, las soluciones de cloroquina se prepararon poco antes de usarlas.

Para el LOTE I se preparó una solución conteniendo 0.09 mg de cloroquina/ml de solución salina isotónica, equivalente a -- 0.03 mg/g de peso de ratón para un animal de 30 g de peso.

Para el LOTE II se preparó una solución conteniendo 1.8 mg de cloroquina/ml de solución salina isotónica, equivalente a -- 0.06 mg/g de peso de ratón para un animal de 30 g de peso.

Para el LOTE III se preparó una solución conteniendo 2.7 mg de cloroquina/ml de solución salina isotónica, equivalente a 0.09 mg/g de peso de ratón para un animal de 30 g de peso.

En todos los casos las soluciones de hemoglobina se administraron por vía intraperitoneal.

LOTE I

Cada ratón recibió una dosis diaria de difosfato de cloroquina de 0.03 mg/g de peso X día X 5 días.

LOTE II

Cada ratón recibió una dosis diaria de difosfato de cloroquina de 0.06 mg/g de peso X día X 5 días.

LOTE III

Cada ratón recibió una dosis diaria de difosfato de cloroquina de 0.09 mg/g de peso X día X 5 días.

LOTE IV

Cada ratón recibió diariamente 1.0 ml de solución salina -- isotónica estéril durante 5 días consecutivos.

En todos los animales se determinó el nivel de hemoglobina dos días antes de aplicar la cloroquina o la solución salina isotónica estéril; después se tomó otra muestra de sangre inmediatamente antes de la segunda y quinta aplicación, y la última determinación se realizó tres días después de la última aplicación.

Los ratones de los LOTES I, II y III fueron sacrificados 10 días después de la última aplicación de cloroquina; se les hizo necropsia y se observó macroscópicamente el hígado, bazo, riñones, corazón, pulmones y cerebro.

EXPERIMENTO 4. EFECTO TERAPEUTICO DE UNA DOSIS DIARIA DE 0.06 mg DE DIFOSFATO DE CLOROQUINA/g DE PESO DE RATON ADMINISTRADA DURANTE 5 DIAS.

El estudio se llevó a cabo empleando dos lotes de ratones machos. Tanto los parásitos como el difosfato de cloroquina se aplicaron por vía intraperitoneal.

LOTE I

10 ratones recibieron un inóculo de 1×10^6 eritrocitos parasitados. Después de 72 horas de la administración del inóculo se inició el tratamiento con difosfato de cloroquina, aplicando una dosis diaria de 0.06 mg/g de peso X día X 5 días.

LOTE II

5 ratones recibieron un inóculo de 1×10^6 eritrocitos parasitados y se les administró 1.0 ml de solución salina isotónica estéril, en vez de cloroquina, bajo el mismo esquema.

En los ratones de ambos lotes se cuantificó hemoglobina antes de la inoculación de parásitos, y diariamente a partir de las 72 horas hasta 45 días (en los animales sobrevivientes) después de iniciado el experimento.

La determinación de la parasitemia se realizó diariamente a partir de las 48 horas, hasta 45 días después de iniciado el experimento.

Todos los experimentos anteriores fueron realizados básicamente con el propósito de encontrar los parámetros más adecuados para la construcción de un modelo de estudio, cuyo último fin es medir la actividad biológica del principio amargo de Tabebuia rosea sobre Plasmodium berghei yoelii.

Para estudiar la actividad de este compuesto fue necesario elegir primeramente una dosis del mismo e investigar su toxicidad en ratones sanos. La dosis de trabajo se eligió tomando en cuenta las siguientes consideraciones:

- a) El principio amargo de la corteza de Tabebuia rosea se encuentra en una proporción aproximada del 10% del extracto metanólico.
- b) En el estudio preliminar se empleó una dosis de 30 mg de extracto metanólico aplicada a cada ratón de aproximadamente 30 g de peso, lo cual equivale a una dosis de 1.0 mg/g de peso de ratón.

Si se considera el 10% de 1.0 mg, se tendrá una dosis de 0.10 mg de 6-p-cumarcilcatalpol/g de peso de ratón, que es la que se eligió como dosis de trabajo en los ensayos siguientes.

EXPERIMENTO 5. TOXICIDAD DEL 6-p-CUMAROILCATAIPOL.

Se trabajó con un lote de 10 ratones machos. Se inyectó a cada uno, por vía intraperitoneal, 0.10 mg de 6-p-cumaroilcatalpol X día X 5 días.

Se determinaron los niveles de hemoglobina de los ratones - el día en que se inició el experimento y hasta 10 días después - de la primera administración de 6-p-cumaroilcatalpol. Durante to do el experimento se registró el estado clínico general de los ratones. Después de 15 días de iniciado el experimento, todos -- los animales fueron sacrificados y necropsiados, revisando --- macroscópicamente el hígado, bazo, riñones, corazón, pulmones y cerebro.

Con todos los datos recabados hasta este punto, nuestro mo delo de trabajo para el estudio final se hizo empleando en cada experimento 3 lotes, de 5 ratones cada uno en las siguientes -- condiciones:

- a) En todos los casos el inóculo administrado fue de 1×10^6 - eritrocitos parasitados, inyectados por vía intraperitoneal.
- b) Los diferentes tratamientos se administraron por vía intrape ritoneal durante 5 días consecutivos a partir de las 48 hrs. de haber inoculado los parásitos.
- c) La dosis empleada de 6-p-cumaroilcatalpol fue de 0.10 mg/g - de peso de ratón.
- d) La dosis empleada de difosfato de cloroquina fue de 0.05 -- mg/g de peso de ratón.
- e) La determinación de la parasitemia, expresada como % de eri trocitos parasitados se inició 48 horas después de la inocu lación de los parásitos y se continuó hasta el fin de cada- experimento.
- f) En todos los casos, antes de inocular los parásitos, se de- terminó la hemoglobina de todos los animales y posteriormen te se continuó diariamente esta determinación hasta el fin - de cada experimento.
- g) El estudio consistió de 3 experimentos que cumplen con to - das las especificaciones señaladas.

EXPERIMENTO 6.

Se emplearon 3 lotes, con 5 ratones machos en cada uno.

LOTE I (Lote problema)

Ratones infectados con Plasmodium berghei yoelii y tratados con 0.10 mg de 6-p-cumaroilcatalpol/g de peso de ratón X -- día X 5 días.

LOTE II (Testigo de cloroquina)

Ratones infectados con Plasmodium berghei yoelii y tratados con 0.05 mg de difosfato de cloroquina/g de peso de ratón X día X 5 días.

LOTE III (Testigo de inóculo)

Ratones infectados con Plasmodium berghei yoelii. No recibieron tratamiento antipalúdico; solamente se les inyectó 1.0 ml de solución salina isotónica estéril X día X 5 días.

EXPERIMENTO 7.

Se realizó de la misma manera que el experimento anterior.

EXPERIMENTO 8.

Se realizó de la misma manera que el experimento anterior, con la única diferencia de que se emplearon ratones herbaras en vez de machos.

RESULTADOS

EXPERIMENTO 1

a) Prueba de toxicidad del extracto metanólico

Observaciones clínicas

El ratón 1, que recibió una dosis de 1.0 g de extracto metanólico murió aproximadamente 5 minutos después de haberle inyectado, y el ratón 2, que recibió una dosis de 0.5 g de extracto metanólico murió aproximadamente 15 minutos después de la inyección.. El ratón 3, que recibió una dosis de 0.25 g de extracto metanólico, mostró reflejos abatidos y respiración acelerada, los cuales fueron disminuyendo paulatinamente y desaparecieron por completo después de 6 días, en que el animal mostró completa recuperación. El ratón 4, que recibió una dosis de 125 mg de extracto metanólico, presentó los mismos síntomas que el anterior y se recuperó cuatro días después de la infección.

Necropsias

Tanto en el ratón 1 como en el 2 el hígado mostró bordes -- amarillentos y los pulmones se encontraron enrojecidos. En el ratón 3 se encontró el hígado disminuido en tamaño y los pulmones enrojecidos; en todos los demás órganos no se detectaron alteraciones visibles macroscópicamente. En el ratón 4 solamente se encontraron pulmones ligeramente enrojecidos y todos los demás órganos normales. A partir del ratón 5 no se detectaron alteracio-

nes macroscópicamente visibles en los órganos observados. Estos resultados se correlacionan con las observaciones clínicas de los ratones 1 a 4, ya que éstos se vieron afectados en mayor o menor grado en su estado clínico, lo cual concuerda con las observaciones macroscópicas en las que se detectaron alteraciones en hígado y/o pulmones. Véase cuadro 1.

b) Efecto de una sola dosis del extracto metanólico

Parasitemia

Durante los 3 primeros días después de la inyección del extracto metanólico se observó una notable diferencia entre las parasitemias registradas en los animales que recibieron tratamiento y las de aquellos que no recibieron ningún tratamiento. Los ratones del LOTE I, tratados con extracto metanólico, mostraron una parasitemia menor que los del LOTE II, que no recibieron tratamiento. A partir del 4º día las parasitemias de problemas y testigos no mostraron una diferencia substancial, por lo que se suspendió la estimación de las mismas. Véanse Tablas 1 y 2.

Sobrevivencia

Al principio el número de muertes en animales no tratados fue mayor que en animales tratados, pero esta diferencia tendió a desaparecer en días subsiguientes. Para mayores detalles, véase la Gráfica 1.

Se encontró, además, que el ratón 2 del LOTE I no desarrolló parasitemia, aún cuando 24 horas después de la aplicación del inóculo se observaron parásitos extracelulares muy escasos. Después de 48 horas, y en los días sucesivos, ya no se observaron parásitos en la sangre de este animal, el cual permaneció vivo durante todo el experimento.

Estado clínico y necropsias de los ratones del LOTE III

Clínicamente no se observó efecto tóxico alguno del extracto metanólico. Sin embargo, al realizar la autopsia de todos estos animales se observó un cambio en la forma del hígado, que aparentó ser más pequeño, dando la apariencia de una consistencia más compacta y presentando los lóbulos parcialmente fusionados en 7 ratones y totalmente fusionados en 3. En los demás órganos no se observaron alteraciones.

c) Efecto de dos dosis (una diaria) del extracto metanólico.

Parasitemia

entre el segundo y quinto día después de la infección se observó una marcada diferencia en las parasitemias entre los animales de los LOTES I y II. Los ratones del LOTE I, tratados con extracto metanólico mostraron una parasitemia menor que los del LOTE II, que no recibieron tratamiento. A partir del 5° día las parasitemias de problema y testigo mostraron una notable tendencia a igualarse. Véanse Tablas 3 y 4.

Sobrevivencia

En el 4° día después de la infección aún estaban vivos todos los animales de los LOTES I y II. En el 5° día murieron 8 ratones del LOTE II, mientras que del LOTE I no había muerto ninguno, pero al día siguiente murieron 8 animales del LOTE I, y para el 7° día ya habían muerto todos los ratones de ambos lotes. En este caso la sobrevivencia de 24 horas de los animales del LOTE I en relación a la de los del LOTE II no se considera significativa. Para mayores detalles, véase la Gráfica 2.

Estado clínico y autopsias de los ratones del LOTE III

Clínicamente no se observaron efectos tóxicos del extracto metanólico. Sin embargo, durante la observación macroscópica de los órganos internos se encontraron, en todos los animales, alteraciones en la forma del hígado, que presentaban un tamaño menor que el normal, consistencia más compacta y lóbulos totalmente fusionados. En los demás órganos no se observaron alteraciones.

c) Efecto de tres dosis (una diaria) del extracto metanólico.

Parasitemia

Hasta el 4° día después de la inyección del inóculo se observó una marcada diferencia entre las parasitemias de los LOTES I y II. Los ratones del LOTE I, tratados con extracto metanólico mostraron una parasitemia menor que la de los del LOTE II, que no recibieron tratamiento. A partir del 5° día las para-

itemias de problemas y testigos mostraron una notable tendencia a igualarse. En las Tablas 5 y 6 se puede observar que la determinación de parasitemias, expresada como porciento de eritrocitos parasitados, no se vuelve muy confiable en ciertos animales una vez que se han alcanzado altos niveles de parasitemia, ya que se aprecian variaciones irregulares en la proporción de eritrocitos parasitados, y tomando en cuenta que muchos parásitos pueden ser extracelulares.

Sobrevivencia

Las muertes se iniciaron en el 5° día, notándose nuevamente que al principio murieron más animales no tratados, pero que conforme transcurren los días, esta diferencia se pierde, de tal suerte que en este caso, para el 11° día, ya no había sobrevivientes en ambos lotes (Gráfica 3).

Estado clínico

Uno de los ratones del LOTE III, pocos minutos después de aplicar la tercera dosis del extracto metanólico mostró signos de depresión, con disminución en la frecuencia respiratoria, y murió dos días después. Al realizar la necropsia de este animal se observó hemorragia pulmonar intensa e hígado totalmente fusionado en todos sus lóbulos, de tamaño menor al normal y consistencia endurecida.

Al día siguiente después de administrar la tercera dosis, todos los animales de los LOTES I y III se observaron deprimidos, y 6 ratones del LOTE I, y 9 del LOTE III padecieron diarrea, la cual cesó 4 días después.

Necropsias de los animales del LOTE III

Doce días después de iniciado el experimento, los 9 ratones de este LOTE fueron sacrificados y se encontró que 7 tenían el hígado con todos sus lóbulos totalmente fusionados y de tamaño muy reducido; los dos restantes tenían los lóbulos hepáticos parcialmente fusionados.

EXPERIMENTO 2.

Parasitemia

Se observó que los niveles de parasitemia de los animales que recibieron 5×10^5 y los que recibieron 1×10^6 eritrocitos parasitados fueron muy similares a lo largo del experimento, no encontrándose diferencias significativas entre ambos lotes, presentándose la muerte de todos los animales entre el 6° y 7° día. Véase Tabla 7.

Niveles de hemoglobina

Los niveles de hemoglobina de los ratones infectados fueron descendiendo a medida que avanzaba la infección, mientras que en los animales del LOTE III se mantuvieron estables en todo el experimento. Véase Tabla 8.

EXPERIMENTO 3.

Niveles de hemoglobina

Los niveles de hemoglobina en todos los animales de los cuatro lotes se mostraron sin cambio significativo a lo largo del experimento. Véase Tabla 9.

Estado clínico y necropsias

Ningún ratón del LOTE I presentó signos o síntomas de toxicidad. Un ratón del LOTE II murió súbitamente pocos minutos después de administrada la segunda inyección de cloroquina, y del LOTE II murieron, también súbitamente, dos ratones, uno pocos minutos después de la segunda inyección y el otro después de la tercera. Poco antes de morir los animales presentaron movimientos involuntarios con saltos bruscos que los proyectaban contra las paredes de la jaula. Su necropsia no reveló alteraciones visibles de los órganos internos.

Todos los animales de los LOTES I, II y III se mantuvieron bajo observación hasta 10 días después de haberles administrado la última dosis de difosfato de cloroquina. Ninguno de ellos murió en ese tiempo y su estado clínico no pareció revelar la acción de efectos tóxicos del medicamento. Sus necropsias tampoco revelaron alteraciones macroscópicas visibles de los órganos internos.

EXPERIMENTO 4.

Parasitemia

En los animales tratados se observó que la multiplicación de los parásitos se mantuvo abatida durante el tiempo que los ratones estuvieron recibiendo el tratamiento con difosfato de cloroquina, ya que se observó que 8 días después de la infección (es decir, 24 horas después de la última administración), el valor promedio de eritrocitos parasitados para los ratones tratados fue aproximadamente de 7% (contra el 30 % para los animales que no recibieron tratamiento) y que una vez suspendida la administración de la droga, la parasitemia inició su recuperación, que alcanzó un máximo promedio el día 19, para después iniciar un descenso brusco y recuperación total de los animales que no habían muerto. Murieron 4 animales, uno de los cuales es atribuible a la acción tóxica de la cloroquina, pues murió algunos minutos después de administrar la segunda dosis de este medicamento (ratón 7); los otros tres murieron en la cúspide de la parasitemia, cuando los demás iniciaban su recuperación. Véase Tabla 10.

En los animales no tratados la respuesta a la infección fue dispareja, distribuyéndose las muertes entre el 7° y 16° día. Véase Tabla 11.

Niveles de hemoglobina

Los datos de la determinación de los niveles de hemoglobina siguen un curso temporal en relación inversa al desarrollo de la parasitemia, es decir, que conforme la parasitemia progresa, los

niveles de hemoglobina disminuyen, y cuando se presenta una mejoría en la enfermedad, los niveles de hemoglobina tienden a alcanzar su valor normal. En este estudio se observó que 8 días después de la infección, el valor promedio de hemoglobina de los animales tratados fue aproximadamente de 9 g/dl, mientras que para los animales no tratados fue de 4.5 g/dl. Después de 19 días de iniciado el experimento, en los animales tratados se observaron los niveles más bajos de hemoglobina, los cuales corresponden a los niveles más altos de parasitemia determinados en estos animales. Posteriormente se observó una rápida elevación hasta alcanzar niveles normales en los 6 ratones sobrevivientes de este lote.

Los niveles de hemoglobina correspondientes a los ratones que no recibieron tratamiento mostraron un descenso continuo en los mismos, hasta la muerte. Véanse Tablas 12 y 13.

EXPERIMENTO 5.

Niveles de hemoglobina

No se observó cambio significativo alguno en los niveles de hemoglobina. Véase Tabla 14.

Estado clínico y necropsias

Todos los ratones sobrevivieron a las 5 dosis de 6-p-cumaroilcatalpol, y durante los 10 días de observación de los mismos no se denotaron alteraciones en su estado clínico general que indicaran acción tóxica del compuesto en estudio.

Los órganos observados en la necropsia no mostraron alteraciones macroscópicas.

EXPERIMENTO 6.

Parasitemia

LOTE I

Se observó un aumento gradual de la parasitemia entre el día 2o. y 5o. de la infección. En el 6o. día se observó una disminución de la misma. La parasitemia máxima promedio, de aproximadamente 32% de eritrocitos parasitados, se alcanzó en el 9o. día de infección y las muertes de 4 animales de este lote se presentaron entre los días 12 y 13 de la infección. En este lote se presentó la muerte de un ratón al séptimo día de la infección y extrañamente este animal murió con una parasitemia muy baja, que no explica su muerte. Ver Tabla 15.

LOTE II

Se observó que durante los días de tratamiento con difosfato de cloroquina, el desarrollo de los parásitos se inhibió marcadamente, y que después de la terminación del tratamiento se presentó una tendencia de aumento de la parasitemia hasta el 14° día, en que esta se dejó de determinar, debido a que para este día ya habían muerto todos los demás animales de los LOTES I y III. Ver Tabla 16.

LOTE III

En este lote se presentó el mismo fenómeno que en el LOTE I, en el que en el 6° día de la infección se apreció una parasitemia menor que en los días anteriores; posteriormente la parasitemia siguió aumentando hasta alcanzar un valor máximo promedio de 32% de eritrocitos parasitados - en el 10° día de infección. Las muertes de todos los animales se presentaron entre los días 12 y 13 de la infección. Ver Tabla 17.

Niveles de hemoglobina**LOTE I**

Los niveles de hemoglobina disminuyeron día a día con el avance de la infección. Los 4 animales que murieron -- entre los días 12 y 13 de la infección presentaron valores promedio de hemoglobina de 4.2 g/dl, y es de notar -- que el ratón 1 que murió el 7° día de la infección con -- una parasitemia de 3.8% de eritrocitos parasitados, presentó un nivel de hemoglobina de 3.7 g/dl, mientras que -- para ese día los demás ratones tenían una concentración -- de hemoglobina entre 6.5 y 7.0 g/dl. Ver Tabla 18.

LOTE II

En este caso también se observó una disminución gradual -- en los niveles de hemoglobina, aunque mucho menor que la observada en los otros lotes. Para el 13° día, en que ya habían muerto todos los ratones de los LOTES I y III, el valor promedio de hemoglobina fue de 5.8 g/dl. Ver Tabla 19.

LOTE III

Los niveles de hemoglobina disminuyeron día a día con el avance de la infección y los animales murieron con un valor promedio de hemoglobina de 3.7 g/dl. Ver Tabla 20.

EXPERIMENTO 7.

Parasitemia

LOTE I

En todos los animales aumentó gradualmente la parasitemia hasta el 9° día de la infección, en que alcanzó un valor máximo promedio de aproximadamente 45% de eritrocitos parasitados. El ratón 1 murió e el 7° día de la infección con una parasitemia del 22% y los demás murieron entre los días 11 y 13 de la infección. Ver Tabla 21.

LOTE II

En este caso la determinación de la parasitemia se continuó hasta la muerte del último animal de este lote. Ningún ratón se curó de la infección. Se observó que durante los días de tratamiento con difosfato de cloroquina, el desarrollo de los parásitos se inhibió marcadamente, para presentar una tendencia de aumento de la parasitemia después de la terminación del tratamiento hasta la muerte de todos los animales, ocurrida entre los días 17 y 24 después de la infección. Ver Tabla 22.

LOTE III

En todos los animales la parasitemia fue aumentando gradualmente hasta el 9° día de la infección, en que se alcanzó un valor máximo promedio de 44% de eritrocitos parasitados y, en ese mismo día, murió el primer animal. En los días siguientes la parasitemia varió entre 32 y 38% de eritrocitos parasitados y los 4 ratones restantes murieron entre los días 14 y 18 de la infección. Ver Tabla 23.

Niveles de hemoglobina

LOTE I

La hemoglobina fue descendiendo gradualmente conforme aumentaba la infección y alcanzó valores mínimos promedio de 3.6 g/dl cuando murieron los ratones entre los días 11 y 13 de la infección. El ratón 1, que murió en el 7° día, tenía 5.3 g/dl de hemoglobina. Ver Tabla 24.

LOTE II

En este caso se observó que durante los días de tratamiento con difosfato de cloroquina hubo una ligera disminución de los niveles de hemoglobina hasta el 6° día de la infección, para mostrar después una ligera tendencia al aumento hasta el 9° día, en el que los valores de hemoglobina aún se encontraban entre los límites normales de 12 a 16 g/dl. A partir del 10° día la disminución fue más rápida, hasta alcanzar niveles mínimos de 3.7 g/dl. Ver Tabla 25.

LOTE III

Los niveles de hemoglobina disminuyeron día a día con el avance de la infección y los animales murieron con niveles de hemoglobina entre 2.2 y 3.9 g/dl. Ver Tabla 26.

EXPERIMENTO 8.

Parasitemia

LOTE I

Se presentaron diferencias muy marcadas en las parasitemias de los animales de este lote:

En el ratón 1 la parasitemia aumentó progresivamente hasta un máximo de 61% de eritrocitos parasitados en el 17° día de infección, después de lo cual, se presentó una disminución brusca de la parasitemia con desaparición total de la misma hacia el día 23° de la infección y recuperación completa del animal.

En el ratón 2 la parasitemia aumentó progresivamente hasta alcanzar un máximo de 39% de eritrocitos parasitados en el

día 17° de la infección, muriendo el animal 21 días después de iniciado el experimento.

En el ratón 3 la parasitemia aumentó progresivamente hasta alcanzar un máximo de 42% de eritrocitos parasitados en el 17° día de la infección, con una notable disminución hacia el día 23, lo cual corresponde también con una tendencia al aumento del nivel de hemoglobina en ese mismo día, en el que la parasitemia fue de 0.8% de eritrocitos parasitados. Sin embargo, este animal no pudo recuperarse de la infección y murió al día siguiente.

En el ratón 4 la parasitemia aumentó progresivamente hasta alcanzar un máximo de 75% de eritrocitos parasitados en el 21° día de infección, después de lo cual disminuyó la parasitemia hasta desaparecer totalmente hacia el 32° día de la infección, con la recuperación completa de este animal.

En el ratón 5 la parasitemia aumentó progresivamente hasta alcanzar un máximo de 33% de eritrocitos parasitados en el 6° día de la infección, muriendo el animal en el 11° día.- Ver Tabla 27.

LOTE II

Se observó que entre el 2° y 7° día de la infección el desarrollo de los parásitos se inhibió marcadamente por el efecto del difosfato de cloroquina.

En los ratones 1, 3 y 5 se observó un aumento gradual de la parasitemia, que alcanzó un valor máximo hacia el 21° día de infección, para disminuir bruscamente y desaparecer por completo entre los días 28 y 30, con la consiguiente recuperación de estos animales.

En los ratones 2 y 4 el desarrollo de la parasitemia, a partir del 7° día, fue más rápido, alcanzando un nivel

máximo el 15° día, con 70 y 40% de eritrocitos parasitados respectivamente. El día 19° murió el ratón 4 y el día -- 21° el ratón 2. Ver Tabla 28.

LOTE III

En todos los animales se presentó un aumento gradual de la parasitemia, alcanzando valores máximos de 51 a 64% de eritrocitos parasitados entre los días 17° y 21° de la infección. Todos los animales de este lote murieron entre los días 17 y 30 . Ver Tabla 29.

Niveles de hemoglobina

LOTE I

Ratón 1. La hemoglobina disminuyó constantemente hasta el día 19° de la infección, en que se observó el nivel mínimo de 2.4 g/dl, después de lo cual la concentración de hemoglobina empezó a aumentar hasta alcanzar valores dentro de los límites normales entre los días 28 y 37 (Tabla 30)

Ratón 2. La hemoglobina disminuyó constantemente hasta el 19° día, en que alcanzó un valor mínimo de 1.4 g/dl, muriendo el animal al día siguiente (Tabla 30).

Ratón 3. La hemoglobina disminuyó constantemente hasta el 17° día, en que alcanzó un valor mínimo de 3 g/dl, tendiendo después al aumento hasta un valor de 6.2 g/dl en el 23° día. Sin embargo, este animal no se recuperó de la infección y murió el día 25° (Tabla 30).

Ratón 4. La hemoglobina disminuyó constantemente hasta el día 23° de la infección, con un nivel mínimo de 2.1 g/dl, después de lo cual la concentración empezó a aumentar hasta alcanzar valores dentro de los límites normales entre los días 35° y 37° de la infección (Tabla 30).

Ratón 5. La hemoglobina disminuyó constantemente hasta el 10° día, en que alcanzó un valor mínimo de 3.3 g/dl, muriendo el animal el 11° día (Tabla 30).

LOTE II

Para los ratones 1, 3 y 5 los niveles de hemoglobina se mantuvieron dentro de límites normales hasta el 10° de infección, después de lo cual disminuyeron hasta niveles mínimos entre 2.7 y 3.0 g/dl, entre los días 21° y 23°, para aumentar posteriormente hasta llegar a niveles normales entre los días 35 y 37. En los otros dos ratones, que murieron entre los días 19 y 21, la concentración de hemoglobina disminuyó hasta niveles de 3.0 y 3.7 g/dl (Tabla-31).

LOTE III

Los niveles de hemoglobina disminuyeron día a día con el avance de la infección y los animales murieron con concentraciones de hemoglobina entre 1.5 y 3.2 g/dl. Ver Tabla-32.

Cuadro I. Resultados de la observación macroscópica de los órganos internos de ratones tratados con dosis diferentes del extracto metanólico.

Ratón	Dosis Administrada (mg)	Tiempo de vida	Hígado	Bazo	Riñones	Pulmones	Corazón	Cerebro
1	1000	5 min	Bordes amarillentos	Normal	Normales	Enrojecidos	Normal	Normal
2	500	15 min	Bordes amarillentos	Normal	Normales	Enrojecidos	Normal	Normal
3	250	Sobreviviente*	Disminuido de tamaño	Normal	Normales	Enrojecidos	Normal	Normal
4	125	Sobreviviente*	Normal	Normal	Normales	Enrojecidos	Normal	Normal
5	62.5	Sobreviviente*	Normal	Normal	Normales	Normales	Normal	Normal
6	31.25	Sobreviviente*	Normal	Normal	Normales	Normales	Normal	Normal
7	15.62	Sobreviviente*	Normal	Normal	Normales	Normales	Normal	Normal
8	7.81	Sobreviviente*	Normal	Normal	Normales	Normales	Normal	Normal
9	3.90	Sobreviviente*	Normal	Normal	Normales	Normales	Normal	Normal
10	1.95	Sobreviviente*	Normal	Normal	Normales	Normales	Normal	Normal

* Significa que sobrevivió hasta el término del experimento (10 días) y fue sacrificado.

TABLA 1. Parasitemia de 10 ratones del LOTE I inoculados con Plasmodium berghei yoelii y tratados con una sola dosis de 30 mg de extracto retanólico por ratón.

Días después de la inoculación	% de eritrocitos parasitados en los ratones del LOTE I											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Promedio	
1	0.1	0.0	0.1	0.3	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
2	0.8	0.0	0.1	2.3	0.5	0.6	0.6	0.1	0.7	0.7	0.6	0.6
3	15.0	0.0	5.4	13.0	9.6	7.6	4.2	6.0	10.0	8.2	7.9	7.9
4	60.0	0.0	3.7	40.0	38.0	28.0	50.0	28.0	21.0	36.0	33.8	33.8
5	X	0.0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
6		0.0	-	-	-	-	X	-	-	X		
7		0.0	-	-	X	-		-	X			
8		0.0	-	X		-		-				
9		0.0	X			X		X				
10		0.0										

- El animal está vivo, pero no se investigaron datos de parasitemia.

X Muerte del animal.

TABLA 2. Parasitemia de 10 ratones del LOTE II inoculados con Plasmodium berghei yoelii que no recibieron tratamiento.

Días después de la inoculación	% de eritrocitos parasitados en los ratones del LOTE II										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Promedio
1	0.2	0.8	0.1	0.2	0.6	0.6	0.9	0.8	0.4	0.4	0.5
2	3.6	4.7	2.3	1.4	6.1	4.9	4.7	2.0	3.6	4.0	3.7
3	13.0	15.0	13.0	14.0	44.0	29.0	28.0	11.0	21.0	32.0	22.1
4	31.0	37.0	57.0	35.0	66.0	47.0	63.0	29.0	66.0	22.0	45.3
5	-	-	-	-	X	X	X	-	X	X	
6	X	X	X	-				-			
7				-				-			
8				-				X			
9				X							

- El animal está vivo, pero no se investigaron datos de parasitemia

X Muerte del animal

Gráfica 1. Comparación del % de sobrevivencia de ratones infectados con Plasmodium berghei yoelii, tratados con extracto metanólico (LOTE I) y no tratados (LOTE II).

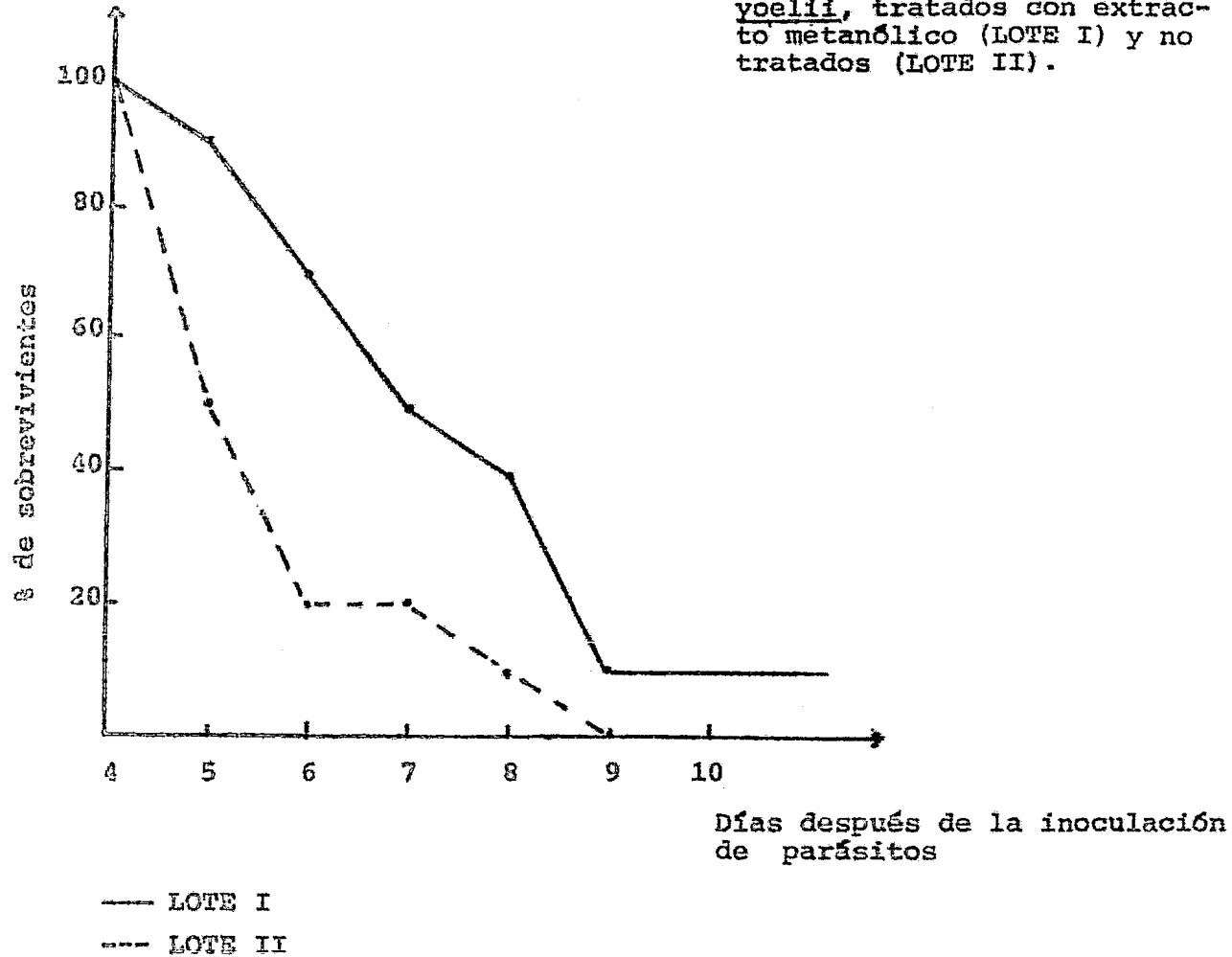


TABLA 3. Parasitemia de 10 ratones del LOTE I inoculados con Plasmodium berghei yoelii y tratados con 30 mg de extracto metanólico X ratón X día X 2 días.

Días después de la inoculación	% de eritrocitos parasitados en los ratones del LOTE I										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Promedio
2	0.6	0.4	0.4	0.1	1.6	0.2	0.1	2.8	1.2	0.9	0.8
3	14.0	11.0	4.6	8.0	14.0	10.0	4.6	14.0	13.0	8.5	10.2
4	45.0	38.0	31.0	46.0	44.0	47.0	24.0	64.0	54.0	43.0	43.6
5	75.0	85.0	62.0	90.0	80.0	71.0	78.0	83.0	86.0	75.0	78.5
6	X	X	76.0	X	X	X	X	X	X	79.0	77.5
7			X							X	

x Muerte del animal

TABLA 4. Parasitemia de 10 ratones del LOTE II inoculados con Plasmodium berghei yoelii, que no recibieron tratamiento.

Días después de la inculación	% de eritrocitos parasitados en los ratones del LOTE II										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Promedio
2	5.5	0.8	6.2	2.2	2.4	2.0	2.2	6.3	1.8	1.4	3.1
3	44.0	26.0	31.0	36.0	43.0	24.0	28.0	41.0	43.0	22.0	33.8
4	92.0	71.0	88.0	82.0	76.0	84.0	76.0	86.0	79.0	62.0	79.6
5	X	X	X	X	X	X	82.0	X	X	81.0	81.5
6							X			64.0	
7										X	

X Muerte del animal

Gráfica 2. Comparación del % de sobrevivientes de ratones infectados con Plasmodium berghei yoelii tratados con extracto metanólico (LOTE I) y no tratados (LOTE II).

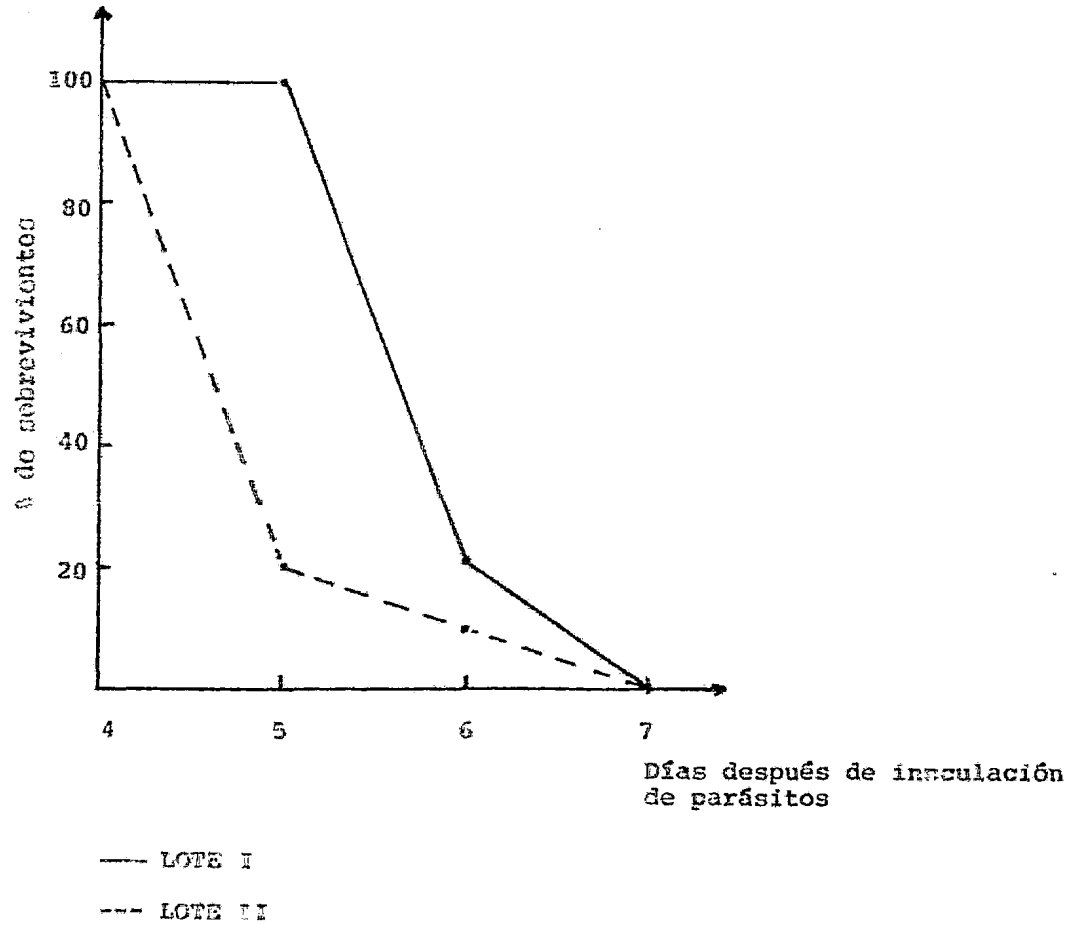


Tabla 5. Parasitemia de 10 ratones inoculados con *Plasmodium berghei yacalli* y tratados con tres dosis de extracto metanólico (LOTE I) expresada como % de eritrocitos parasitados.

Días Después de la ino- culación	% de eritrocitos parasitados en los ratones del LOTE I										Promedio
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
2	0.3	1.6	0.3	0.1	0.1	0.1	0.1	0.2	0.2	0.2	0.3
3	7	6	11	1.8	7.6	24	2.6	8.5	3.0	2.8	5.3
4	21	50	49	12	39	34	11	28	21	28	28.1
5	58	79	63	16	35	39	30	21	34	41	40.3
6	51	X	X	30	40	44	46	14	46	25	39
7	34			22	X	21	X	13	36	11	25.2
8	X			11		6		44	19	27	18.2
9				13		X		48	22	40	27.5
10				13				50	30	X	33.2
11				X				X	X		

X Muerte del animal

TABLA 6. Parasitemia de 10 ratones inoculados con Plasmodium berghei yoelii y tratados con tres dosis de extracto metanólico (LOTE I) expresada como % de eritrocitos parasitados.

Días después de la inoculación	% de eritrocitos parasitados en los ratones del LOTE I										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Promedio
2	1.1	3.8	6.6	5.4	5.6	7.2	3.4	3.8	4.6	3.2	4.5
3	9	35	40	28	39	15	20	20	20	18	25.6
4	36	37	53	59	50	67	49	52	53	18	47.4
5	62	26	48	69	47	X	55	37	54	20	46.4
6	X	17	X	X	26		X	5	21	16	17
7		22			X			X	X	10	16
8		37								41	39
9		58								27	42.5
10		41								29	35
11		X								X	

X Muerte del animal

Gráfica 3. Comparación del % de sobrevivientes de ratones infectados con *Plasmodium berghei yoelii* - tratados con extracto metanólico (LOTE I) y no tratados (LOTE II).

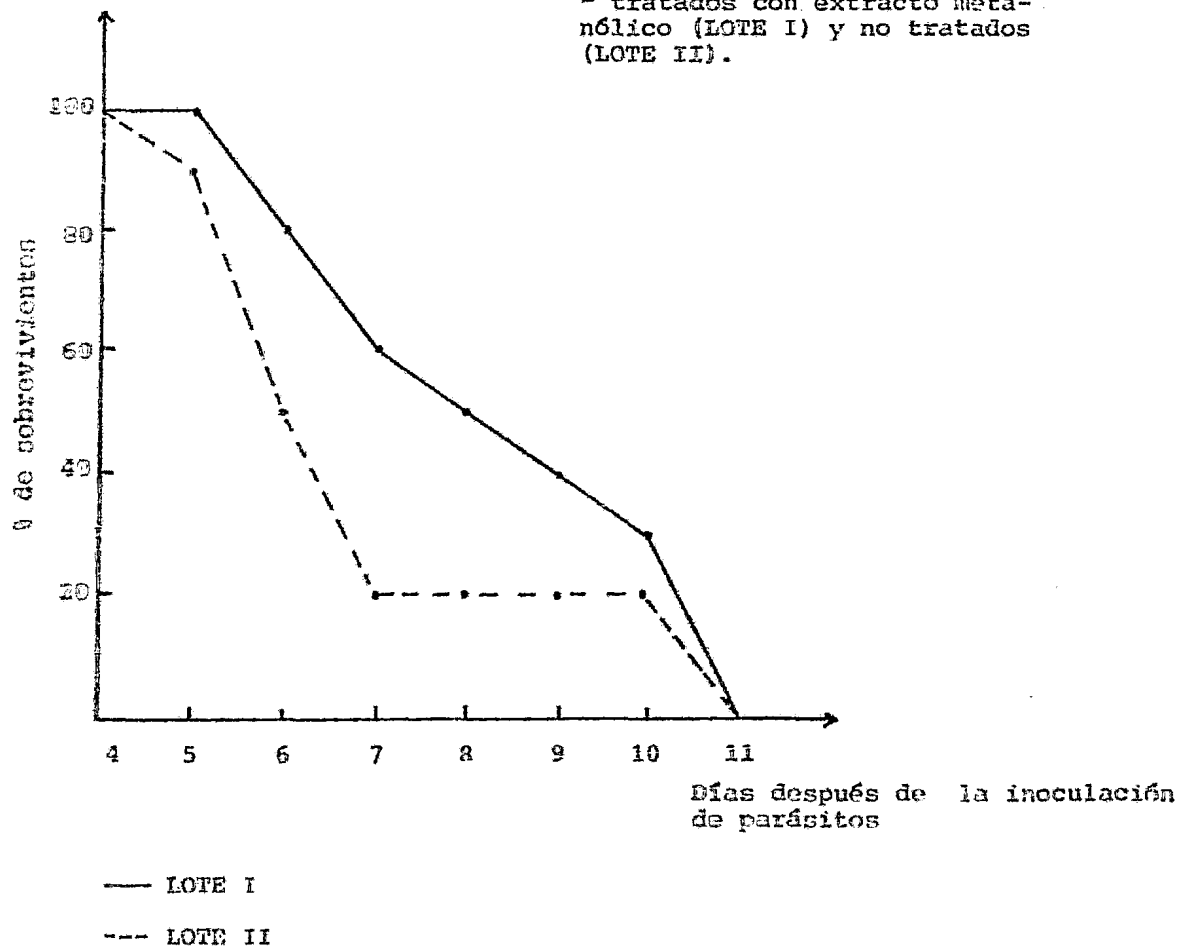


TABLA 7. Parasitemia de 5 ratones del LOTE I inoculados con 5×10^5 eritrocitos parasitados con *Plasmodium berghei yoelii* y de 5 ratones del LOTE II inoculados con 1×10^6 eritrocitos parasitados.

Días después de la inoculación	% de eritrocitos parasitados en los ratones del LOTE I						% de eritrocitos parasitados en los ratones del LOTE II					
	1	2	3	4	5	PROMEDIO	1	2	3	4	5	PROMEDIO
2	0.2	0.1	0.1	0.1	0.3	0.2	0.1	0.3	0.2	0.1	0.7	0.3
3	3.4	5.0	8.6	6.8	5.2	5.8	7.2	5.0	10.4	5.8	20.8	7.8
4	24.6	32.4	13.3	47.0	30.0	29.5	44.0	9.6	35.0	39.6	23.8	30.4
5	37.2	45.2	24.8	37.4	43.8	34.7	47.2	16.6	38.4	43.6	54.0	40.0
6	43.5	X	11.4	50.5	31.0	34.1	26.0	17.0	46.3	X	57.3	36.7
7	X		X	X	X		X	X	X		X	

X Muerte del animal

TABLA 8. Niveles de hemoglobina de 5 ratones del LOTE I inoculados con 5×10^5 eritrocitos parasitados; de 5 ratones del LOTE II inoculados con 1×10^6 eritrocitos parasitados y de 5 ratones sanos que no fueron infectados.

(Valores normales: 12 a 16 g/dl).

Días después de la inoculación	Hemoglobina individual en ratones del LOTE I						Hemoglobina individual en ratones del LOTE II						Hemoglobina individual en ratones del LOTE III					
	1	2	3	4	5	PROMEDIO	1	2	3	4	5	PROMEDIO	1	2	3	4	5	PROMEDIO
0	11.6	13.9	11.9	11.6	10.8	12.0	12.3	10.1	10.3	12.4	11.3	11.3	13.4	11.5	10.8	12.8	11.6	12.0
2	11.5	12.2	10.3	10.9	9.1	10.8	11.1	9.2	10.7	12.1	9.2	10.5	13.2	10.9	10.2	11.6	12.2	11.6
4	11.2	11.8	9.6	9.9	10.5	10.6	10.9	9.1	10.1	11.1	8.6	10.0	13.0	11.4	12.4	13.7	12.3	12.6
6	3.9	X	5.8	3.1	4.9	4.4	5.1	5.1	3.0	X	3.9	4.3	13.6	12.3	12.3	13.9	11.8	12.8
7	X		X	X	X		X	X	X		X							

X Muerte del animal

TABLA 9. Niveles de hemoglobina en g/dl de ratones de los LOTES I, II y III que recibieron diferentes tratamientos con difosfato de cloroquina, y del LOTE IV que no fueron tratados. (valores normales: 12 a 16 g/dl).

		1a	2a	3a	4a
		Determinación	Determinación	Determinación	Determinación
Hemoglobina ratones LOTE I	1	15.4	14.5	15.1	14.7
	2	12.9	13.6	13.7	14.3
	3	16.1	15.7	14.1	14.3
	4	14.6	13.8	14.6	14.6
	5	15.2	14.1	13.6	13.8
Hemoglobina ratones LOTE II	1	15.2	15.6	14.6	15.6
	2	15.5	14.2	14.4	14.6
	3	15.2	15.5	—	—
	4	14.9	14.2	14.3	14.7
	5	14.5	14.6	14.8	14.7
Hemoglobina ratones LOTE III	1	15.7	14.9	14.7	14.8
	2	16.2	15.7	—	—
	3	15.2	14.9	14.7	14.6
	4	15.0	14.8	14.6	15.1
	5	15.2	15.5	—	—
Hemoglobina ratones LOTE IV	1	13.9	14.3	14.2	14.2
	2	14.7	13.2	13.3	14.4
	3	15.8	15.7	15.5	15.7
	4	15.3	13.9	14.8	14.6
	5	14.7	14.0	14.2	14.1

— No se tiene datos de hemoglobina debido a muerte del animal.

- LOTE I Cada ratón recibió una dosis diaria de 0.03 mg/g de peso durante 5 días consecutivos
- LOTE II Cada ratón recibió una dosis diaria de 0.06 mg/g de peso durante 5 días consecutivos
- LOTE III Cada ratón recibió una dosis diaria de 0.09 mg/g de peso durante 5 días consecutivos
- LOTE IV Cada ratón recibió 1.0 ml de ssi estéril 5 días consecutivos
- 1a. Determinación Dos días antes de la primera dosis de cloroquina
- 2a. Determinación Inmediatamente antes de la segunda dosis de cloroquina (difosfato)
- 3a. Determinación Inmediatamente antes de la quinta dosis de cloroquina (difosfato)
- 4a. Determinación Tres días después de la última dosis de cloroquina (difosfato)

TABLA 10. Parasitemia de 10 ratones del LOTE I inoculados con 1×10^6 eritrocitos parasitados y tratados durante 5 días consecutivos con una dosis diaria de difosfato de cloroquina de 2.06 mg/g de peso, a partir del tercer día después de la inoculación de Plasmodium berghei yoelii.

Días después de la inoculación	% de eritrocitos parasitados en los ratones del LOTE I										Promedio
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
2	0.2	0.5	0.7	0.6	0.8	0.1	0.1	0.3	0.2	0.4	0.4
* 3	6.4	3.8	6.6	1.6	6.4	2.6	6.2	6.6	2.6	3.2	4.6
* 4	3.0	5.8	2.8	5.4	6.8	2.6	2.0	7.0	2.2	1.4	3.9
* 5	5.8	4.4	4.2	3.2	6.8	4.2	X	2.8	3.6	1.6	4.1
* 6	6.4	7.4	5.8	2.8	2.6	4.8		4.2	6.6	2.4	4.8
* 7	6.2	10.6	9.8	2.0	3.2	9.4		6.8	5.8	4.6	6.5
8	6.4	7.6	9.8	2.8	4.0	4.0		9.6	5.2	12.6	6.9
10	10.0	8.0	10.8	8.4	8.0	10.2		17.4	7.0	14.6	10.5
11	9.8	8.0	11.0	9.0	4.8	22.2		17.6	4.8	11.0	10.9
12	13.4	9.0	30.0	15.4	10.0	9.0		22.4	8.6	11.2	14.3
13	15.2	7.5	23.0	16.8	8.0	15.0		31.0	9.6	18.0	16.0
14	19.2	12.0	31.0	20.2	18.8	21.0		24.0	12.0	22.0	20.0
15	22.6	14.4	22.4	31.6	22.4	27.2		21.0	19.0	23.0	22.6
16	26.0	15.4	33.0	30.8	21.0	50.0		17.0	18.0	19.0	25.0
19	49.6	12.0	18.0	34.0	29.0	44.8		4.0	16.0	37.6	27.2
21	49.0	0.8	3.2	21.0	19.2	50.6		0.0	9.0	46.4	22.1
23	36.8	0.0	0.4	1.0	1.8	X		0.0	2.0	X	7.3
24	X	0.0	0.0	0.0	0.6			0.0	0.0		0.6
26		0.0	0.0	0.0	0.0			0.0	0.0		0.0
28		0.0	0.0	0.0	0.0			0.0	0.0		0.0
30		0.0	0.0	0.0	0.0			0.0	0.0		0.0
32		0.0	0.0	0.0	0.0			0.0	0.0		0.0
34		0.0	0.0	0.0	0.0			0.0	0.0		0.0
36		0.0	0.0	0.0	0.0			0.0	0.0		0.0
38		0.0	0.0	0.0	0.0			0.0	0.0		0.0
40		0.0	0.0	0.0	0.0			0.0	0.0		0.0
42		0.0	0.0	0.0	0.0			0.0	0.0		0.0
44		0.0	0.0	0.0	0.0			0.0	0.0		0.0
46		0.0	0.0	0.0	0.0			0.0	0.0		0.0

* Días de tratamiento con difosfato de cloroquina

X Muerte del animal

TABLA 11. Parasitemia de 5 ratones del LOTE II inoculados con 1×10^6 eritrocitos parasitados que recibieron una inyección diaria de 1.0 ml de solución salina isotónica estéril durante 5 días consecutivos a partir del tercer día después de la inoculación de Plasmodium berghei yoelii.

Días después de la inoculación	% de eritrocitos parasitados ratones del LOTE II					Promedio
	1	2	3	4	5	
2	0.2	0.3	0.7	0.2	0.4	0.4
* 3	3.4	3.4	6.4	5.8	16.6	7.1
* 4	7.8	27.4	19.2	7.6	31.8	18.8
* 5	16.6	53.6	30.2	8.0	23.8	26.4
* 6	14.2	43.6	37.4	7.4	37.2	28.0
* 7	17.0	X	43.8	23.8	34.2	29.7
8	13.4		X	19.0	56.2	29.5
10	23.0			34.0	34.5	30.5
11	28.4			35.2	55.4	39.7
12	37.4			46.0	X	41.7
13	42.4			41.0		41.7
14	47.4			X		47.4
15	79.5					79.5
16	X					

* Días en que se le inyectó a cada ratón 1.0 ml de solución salina isotónica estéril

X Muerte del animal

TABLA 12 Niveles de hemoglobina en g/dl de 10 ratones del LOTE I inoculados con 1×10^6 eritrocitos parasitados y tratados durante 5 días consecutivos con una dosis diaria de difosfato de cloroquina de 0.06 mg/g de peso a partir del tercer día después de la inoculación de Plasmodium berghei yoelii.
(Valores normales: 12-16 g/dl).

Días Después de la ino- culación	Niveles de hemoglobina (g/dl) en los ratones del LOTE I										Promedio
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
0	15.3	14.3	11.4	13.8	14.2	12.8	15.5	12.5	14.1	14.9	13.9
* 3	14.7	12.0	10.4	13.9	13.3	12.6	12.6	11.3	12.8	13.6	12.7
* 4	10.9	9.9	10.3	12.3	11.8	11.4	9.5	12.2	12.2	10.9	11.1
* 5	10.9	10.6	9.9	12.2	10.7	10.2	X	8.6	11.0	9.9	10.4
* 6	11.1	10.8	9.2	10.8	9.4	9.5		8.5	9.5	9.2	9.8
* 7	11.1	10.3	8.6	11.4	9.6	9.0		8.9	9.9	9.8	9.8
8	9.6	10.8	7.7	11.1	8.3	8.3		8.4	9.0	9.5	9.2
11	8.3	7.8	6.7	9.0	7.1	7.0		6.1	7.1	6.7	7.3
12	7.1	7.1	5.4	6.4	5.2	5.3		5.4	5.4	6.3	6.0
13	6.0	6.3	4.6	5.9	5.5	5.2		4.2	5.4	4.6	5.3
14	5.3	5.3	4.2	5.9	5.2	5.2		4.2	3.2	4.8	5.0
15	4.2	5.0	3.3	4.2	4.9	4.5		3.5	5.2	3.7	4.3
16	4.1	4.8	3.3	5.2	4.1	4.2		3.9	4.7	4.2	4.3
19	3.3	3.9	3.2	4.2	3.7	2.7		6.5	4.2	3.1	3.9
21	3.2	4.2	4.6	4.0	3.5	2.2		8.0	3.1	2.9	4.0
23	2.2	8.1	7.0	5.1	5.5	X		10.2	6.4	X	6.4
24	X	8.5	7.0	6.0	6.3			10.6	6.8		7.5
26		12.4	8.2	8.0	9.0			11.7	9.2		9.9
28		12.8	10.9	10.0	10.7			12.9	11.2		11.4
30		13.9	11.8	10.9	11.2			13.1	11.8		12.0
37		15.5	15.2	14.3	14.2			14.4	14.4		14.7
43		15.7	14.1	14.3	15.2			14.1	14.4		14.6
45		15.6	14.8	14.5	14.4			14.1	14.6		14.7

* Días de tratamiento con difosfato de cloroquina

X Muerte del animal.

TABLA 13. Niveles de hemoglobina en g/dl de 5 ratones del LOTE II inoculados con 1×10^6 eritrocitos parasitados y que recibieron una inyección diaria de 1.0 ml de solución salina isotónica estéril durante 5 días consecutivos a partir del tercer día después de la inoculación de *Plasmodium berghei yoelii*. (Valores normales: 12 a 16 g/dl).

Días después de la inoculación	Niveles de hemoglobina (g/dl) en los ratones del LOTE II					
	1	2	3	4	5	Promedio
0	9.7	14.7	14.9	15.0	12.8	13.4
* 3	7.1	14.6	14.4	12.4	10.5	11.8
* 4	7.2	12.4	12.3	9.0	5.6	9.3
* 5	6.7	6.7	8.2	6.7	4.5	6.6
* 6	5.9	3.3	6.5	6.4	3.6	5.1
* 7	5.2	X	4.2	6.0	3.5	4.7
8	4.8		X	5.2	3.6	4.5
11	4.0			3.9	3.2	3.7
12	3.7			3.2	X	3.4
13	3.6			3.0		3.3
14	3.3			X		3.1
15	3.1					
16	X					

* Días en que se le inyectó a cada ratón 1.0 ml de solución salina isotónica estéril

X Muerte del animal

TABLA 14. Niveles de hemoglobina en g/dl de 5 ratones sanos que recibieron durante 5 días consecutivos una dosis diaria de 0.10 mg de 6-p-cumaroilcatalpol/g de peso de ratón.
(Valores normales: 12 a 16 g/dl)

Días	Niveles de hemoglobina en g/dl					
	1	2	3	4	5	Promedio
* 1	14.6	13.6	14.2	15.4	15.2	14.6
* 2	13.9	14.4	14.8	15.8	15.7	14.9
* 3	14.2	13.8	13.7	14.9	15.9	14.5
* 4	13.7	13.6	14.3	15.2	14.8	14.3
* 5	14.5	14.2	14.7	15.7	15.2	14.9
6	14.1	13.7	14.6	15.8	15.4	14.7
7	13.9	14.6	14.5	14.6	14.7	14.5
8	14.4	14.2	14.3	15.6	15.4	14.8
9	14.9	13.9	14.5	15.2	15.7	14.8
10	14.5	14.1	14.1	15.7	15.7	14.8

* Días de tratamiento del 6-p-cumaroilcatalpol

TABLA 15. Parasitemia de 5 ratones del LOTE I inoculados con 1×10^6 eritrocitos parasitados y tratados durante 5 días consecutivos con una dosis diaria de 0.10 mg de 6-p-cumaroilcatalpol/g de peso de ratón, a partir del segundo día después de la inoculación de Plasmodium berghei yoelii.

Días después de la inoculación	% de eritrocitos parasitados ratones del LOTE I					
	1	2	3	4	5	Promedio
* 2	0.3	0.4	0.0	0.1	0.3	0.2
* 3	2.2	2.6	3.0	4.4	3.8	3.2
* 4	6.6	6.4	9.2	9.0	7.6	7.8
* 5	8.6	6.5	7.2	10.4	5.8	7.7
* 6	3.8	4.6	3.0	4.0	2.2	3.5
7	X	4.8	11.8	4.4	5.0	6.5
8		21.0	21.0	9.2	12.2	15.8
9		45.8	30.6	20.2	32.8	32.3
10		28.8	23.8	20.0	6.6	19.8
12		X	22.6	11.4	23.0	19.0
13			X	X	X	

* Días de tratamiento con 6-p-cumaroilcatalpol

X Muerte del animal

TABLA 16. Parasitemia de 5 ratones del LOTE II inoculados con 1×10^6 eritrocitos parasitados y tratados durante 5 días consecutivos con una dosis diaria de 0.05 mg de difosfato de cloroquina/g de peso de ratón, a partir del segundo día después de la inoculación de Plasmodium berghei ycelii.

Días después de la inoculación	% de eritrocitos parasitados de los ratones del LOTE II					Promedio
	1	2	3	4	5	
* 2	0.4	0.0	0.0	0.3	0.4	0.2
* 3	0.6	0.2	0.0	0.3	0.4	0.3
* 4	0.6	0.1	0.0	0.1	0.3	0.2
* 5	1.0	0.2	0.1	0.1	0.8	0.4
* 6	1.6	0.3	0.2	0.0	1.0	0.6
7	3.4	1.8	0.2	0.0	1.2	1.3
8	12.6	5.6	0.7	0.2	9.2	5.7
9	7.6	10.0	4.4	5.0	19.6	9.3
10	4.4	19.4	4.6	14.6	11.0	10.8
12	22.0	16.0	3.0	12.2	10.2	12.7
13	39.2	29.0	7.6	10.6	16.2	20.5
14	41.4	45.0	14.0	10.2	14.4	25.0

* Días de tratamiento con difosfato de cloroquina

TABLA 17. Parasitemia de 5 ratones del LOTE III inoculados con 1×10^6 eritrocitos parasitados que recibieron una inyección diaria de 1.0 ml de solución salina isotónica estéril durante 5 días consecutivos, a partir del segundo día después de la inoculación de Plasmodium berghei yoelii.

Días después de la inoculación	% de eritrocitos parasitados en los ratones del LOTE III					
	1	2	3	4	5	Promedio
* 2	0.5	0.6	0.3	0.2	0.2	0.4
* 3	5.8	6.6	4.2	2.4	3.8	4.6
* 4	12.4	9.8	7.4	5.2	3.6	7.7
* 5	7.4	15.4	6.6	2.8	3.0	7.0
* 6	5.6	3.8	2.2	3.2	4.6	3.9
7	8.0	15.0	6.0	4.4	5.8	7.8
8	32.4	25.0	17.2	7.6	25.4	21.5
9	29.2	40.2	20.8	19.2	38.6	29.6
10	28.8	60.4	21.6	20.8	29.6	32.2
12	X	X	15.2	X	19.6	17.4
13			X		X	

* Días de inyección de solución salina isotónica esteril

X Muerte del animal

TABLA 18. Niveles de hemoglobina en g/dl de 5 ratones del LOTE I inoculados con 1×10^6 eritrocitos parasitados y tratados durante 5 días consecutivos con una dosis diaria de 0.10 mg de 6-p-cumaroilcatalpol/g de peso de ratón, a partir del segundo día después de la inoculación de Plasmodium berghei yoelii. (Valores normales: 12-16 g/dl).

Días después de la inoculación	Niveles de hemoglobina en g/dl en los ratones del LOTE I					
	1	2	3	4	5	PROMEDIO
0	15.3	16.2	15.8	14.8	15.8	15.6
1	16.9	16.5	15.6	15.5	16.2	16.1
* 2	15.8	14.8	14.8	14.9	15.8	15.2
* 3	16.5	13.7	15.5	14.4	14.8	15.0
* 4	13.0	10.6	9.9	10.9	10.6	11.0
* 5	6.0	6.2	6.8	6.8	6.7	6.5
* 6	3.7	7.0	6.4	6.5	6.5	6.0
7	X	6.0	6.2	6.4	6.6	6.3
8		5.8	5.7	6.1	6.4	6.0
9		4.6	4.6	5.0	6.0	5.1
10		3.2	4.4	4.1	4.4	4.0
11		3.1	4.4	3.9	4.3	4.2
12		X	4.3	3.9	4.4	4.2
13			X	X	X	

* Días de tratamiento con 6-p-cumaroilcatalpol
 X Muerte del animal

TABLA 19. Niveles de hemoglobina en g/dl de 5 ratones del LOTE II inoculados con 1×10^6 eritrocitos parasitados y tratados durante 5 días consecutivos con una dosis diaria, de 0.05 mg de difosfato de cloroquina, g de peso de ratón a partir del segundo día después de la inoculación de Plasmodium berghei yoelii.
(Valores normales: 12-16 g/dl)

Días después de la inoculación	Niveles de hemoglobina (g/dl) en los ratones del LOTE II					
	1	2	3	4	5	Promedio
0	12.5	15.8	16.6	15.9	15.2	15.2
1	12.3	16.2	16.6	16.9	15.5	15.5
* 2	11.6	16.2	16.5	15.5	14.8	14.9
* 3	11.6	15.1	14.4	14.8	14.8	14.1
* 4	9.8	13.0	12.3	12.7	12.0	12.0
* 5	9.9	10.6	12.0	11.3	10.6	10.9
* 6	10.2	10.6	12.0	11.6	10.6	11.0
7	10.2	12.5	13.0	12.0	10.0	11.5
8	8.8	11.7	13.0	12.3	10.7	11.3
9	7.8	11.7	13.8	11.6	10.2	11.0
10	6.0	7.3	12.8	11.4	8.9	9.3
11	5.9	6.2	9.7	5.5	7.8	7.0
12	5.7	5.6	8.5	6.0	6.8	6.5
13	4.6	4.3	7.5	6.3	6.4	5.8

* Días de tratamiento con difosfato de cloroquina

TABLA 20. Niveles de hemoglobina en g/dl de 5 ratones del LOTE III inoculados con 1×10^6 eritrocitos parasitados y que recibieron una inyección diaria de 1.0 ml de solución salina isotónica estéril durante 5 días consecutivos a partir del segundo día después de la inoculación de Plasmodium berghei ycelii.
(Valores normales: 12-16 g/dl)

Días después de la inoculación	Niveles de hemoglobina (g/dl) en los ratones del LOTE III					
	1	2	3	4	5	Promedio
0	15.8	15.9	15.9	15.5	15.8	15.8
1	15.5	15.8	15.8	15.5	15.7	15.7
* 2	15.2	14.1	15.8	14.4	15.5	15.0
* 3	14.1	14.1	15.8	14.1	14.4	14.5
* 4	9.5	11.3	13.4	10.9	9.5	10.9
* 5	5.6	7.3	8.8	7.6	7.3	7.3
* 6	5.3	5.3	7.9	5.9	7.0	6.3
7	5.3	5.6	7.2	4.9	6.2	5.8
8	5.2	5.3	7.3	6.7	5.6	6.0
9	3.5	4.6	6.6	4.2	3.9	4.6
10	3.6	3.4	4.6	3.2	3.6	3.7
11	X	X	4.0	X	3.6	3.8
12			3.6		3.7	3.7
13			X		X	

* Días de inyección de solución salina isotónica estéril
X Muerte del animal

TABLA 21. Parasitemia de 5 ratones del LOTE I inoculados con 1×10^6 eritrocitos parasitados y tratados durante 5 días consecutivos con una dosis diaria de 0.10 mg de 6-p-cumaroilcatalpol/g de peso de ratón, a partir del segundo día después de la inoculación de Plasmodium berghei yoelii.

Días después de la inoculación	% de eritrocitos parasitados de los ratones del LOTE I					Promedio
	1	2	3	4	5	
* 2	0.4	0.8	0.5	0.5	0.7	0.6
* 3	8.4	17.6	5.8	6.8	5.6	8.8
* 4	20.8	22.2	13.8	13.4	9.2	15.9
* 5	32.4	20.4	13.0	10.4	14.6	18.2
* 6	22.0	18.0	15.2	7.6	10.0	14.6
7	X	33.0	40.0	34.6	14.6	30.6
8		30.4	32.8	23.4	31.4	29.5
9		42.3	42.6	45.6	48.6	44.8
10		28.0	30.8	25.0	43.6	31.9
11		36.4	X	40.4	X	38.4
13				X		

* Días de tratamiento con 6-p-cumaroilcatalpol

X Muerte del animal

TABLA 22. Parasitemia de 5 ratones del LOTE II inoculados con 1×10^6 eritrocitos parasitados y tratados durante 5 días consecutivos con una dosis diaria de 0.05 mg de difosfato de cloroquina/g de peso de ratón, a partir del segundo día después de la inoculación de Plasmodium berghei yoelii.

Días después de la inoculación	% de eritrocitos parasitados de los ratones del LOTE II					Promedio
	1	2	3	4	5	
* 2	0.6	0.5	0.2	0.6	0.0	0.4
* 3	1.4	0.4	0.0	0.8	0.0	0.5
* 4	1.0	0.4	0.4	0.2	0.0	0.4
* 5	1.4	0.1	0.2	0.6	0.1	0.5
* 6	0.9	0.1	0.3	0.8	0.1	0.4
7	8.8	0.4	0.7	1.4	0.3	2.3
8	5.4	0.5	1.4	2.8	0.4	2.1
9	5.0	2.2	6.2	4.2	2.4	4.0
10	11.0	5.8	16.0	6.6	11.8	10.2
11	11.6	12.2	15.4	11.6	23.6	14.9
13	37.8	11.8	10.0	12.6	17.4	17.9
14	56.4	11.4	26.2	10.4	17.8	24.4
16	76.4	37.2	27.2	29.8	37.4	41.6
17	X	38.0	57.6	36.0	38.2	42.5
18		39.0	77.0	X	34.0	50.0
19		33.5	53.0		45.0	43.8
22		41.0	X		45.0	43.0
23		25.0			39.0	32.0
24		X			X	

* Días de tratamiento con difosfato con cloroquina

X Muerte del animal

TABLA 23. Parasitemia de 5 ratones del LOTE III inoculados con 1×10^6 eritrocitos parasitados y que recibieron una inyección diaria de 1.0 ml de solución salina isotónica estéril durante 5 días consecutivos a partir del segundo día después de la inoculación de Plasmodium berghei yoelii.

Días después de la inoculación	% de eritrocitos parasitados de los ratones del LOTE III					
	1	2	3	4	5	Promedio
* 2	0.4	0.3	0.6	0.3	0.2	0.4
* 3	5.4	7.6	6.0	11.8	5.6	7.3
* 4	12.4	25.0	8.2	20.2	9.8	15.1
* 5	8.6	19.6	7.6	17.2	9.2	12.4
* 6	6.2	11.0	22.2	19.2	8.4	13.4
7	13.4	21.0	27.4	45.0	10.8	23.5
8	11.8	19.0	17.2	39.0	14.6	20.3
9	17.8	X	56.8	64.0	37.8	44.1
10	24.4		41.0	48.4	14.2	32.0
11	25.2		41.6	76.8	20.6	41.1
13	21.0		48.0	51.4	23.2	35.9
14	X		54.4	31.4	22.2	36.0
16			X	45.0	24.2	34.6
17				38.0	X	38.0
18				X		

* Días de inyección de solución salina isotónica estéril
 X Muerte del animal

TABLA 24. Niveles de hemoglobina en g/dl de 5 ratones del LOTE I inoculados con 1×10^6 eritrocitos parasitados y tratados durante 5 días consecutivos con una dosis diaria de 0.10 mg de 6-p-cumarcilcatalpol/g de peso de ratón, a partir del segundo día después de la inoculación de Plasmodium berghei yoelii. (Valores normales: 12-16 g/dl).

Días después de la inoculación	Niveles de hemoglobina en g/dl en los ratones del LOTE I					
	1	2	3	4	5	Promedio
1	11.5	11.9	12.8	14.9	14.6	13.1
* 2	12.0	12.1	12.5	14.8	13.9	13.1
* 3	11.0	10.0	10.5	12.5	10.8	11.0
* 4	7.6	7.6	8.5	9.8	8.1	8.3
* 5	5.1	5.4	5.3	7.2	5.2	5.6
* 6	5.3	4.3	5.0	5.8	4.1	4.9
7	X	4.7	5.6	5.9	4.2	5.1
8		3.7	4.2	4.9	4.4	4.3
9		4.2	4.6	4.7	4.2	4.4
10		2.9	3.4	4.2	3.8	3.6
11		X	3.4	X	3.8	3.6
13			X		X	

* Días de tratamiento con 6-p-cumarcilcatalpol

X Muerte del animal

TABLA 25. Niveles de hemoglobina en g/dl de 5 ratones del LOTE II inoculados con 1×10^6 eritrocitos parasitados y tratados durante 5 días consecutivos con una dosis diaria de 0.05 mg de difosfato de cloroquina/g de peso de ratón, a partir del segundo día después de la inoculación de Plasmodium berghei yoelii. (Valores normales: 12-16 g/dl).

Días después de la inoculación	Niveles de hemoglobina en g/dl en los ratones del LOTE II					
	1	2	3	4	5	Promedio
1	14.8	14.6	16.2	15.2	14.1	15.0
* 2	13.5	12.5	15.6	14.7	13.6	14.0
* 3	12.8	12.8	15.4	14.5	12.9	13.7
* 4	11.9	10.6	12.5	12.2	11.7	11.8
* 5	12.0	12.7	12.2	12.1	12.4	12.3
* 6	11.3	13.2	12.4	13.8	12.7	12.7
7	11.8	14.3	13.4	14.8	13.5	13.6
8	11.1	13.7	14.0	13.2	13.3	13.1
9	10.0	13.5	14.3	13.0	14.6	13.1
10	7.2	11.7	11.1	11.0	12.3	10.7
11	5.8	12.0	9.4	10.6	11.3	9.8
13	4.5	9.0	5.8	8.4	5.9	6.7
14	4.8	6.2	5.1	6.3	5.3	5.5
16	3.9	6.1	4.4	4.9	4.4	4.7
17	X	5.1	3.7	4.0	4.4	4.6
18		4.4	3.6	X	3.6	3.9
19		3.6	3.5		3.9	3.7
22		3.2	X		4.2	3.7
23		3.2			4.2	3.7
24		X			X	

* Días de tratamiento con difosfato de cloroquina

X Muerte del animal

TABLA 26. Niveles de hemoglobina en g/dl de 5 ratones del LOTE III inoculados con 1×10^6 eritrocitos parasitados y que recibieron una inyección diaria de 1.0 ml de solución salina isotónica estéril durante 5 días consecutivos a partir del segundo día después de la inoculación de Plasmodium berghei yoelii. (Valores normales: 12:16 g/dl).

Días después de la inoculación	Niveles de hemoglobina en g/dl de los ratones del LOTE III					
	1	2	3	4	5	Promedio
1	15.2	14.5	15.6	12.8	15.0	14.6
* 2	15.0	13.5	14.8	12.8	14.0	14.0
* 3	12.7	12.7	12.8	11.0	13.1	12.5
* 4	9.9	10.9	11.2	8.8	10.8	10.3
* 5	6.8	6.1	10.0	5.6	7.7	7.2
* 6	5.1	3.4	7.4	5.0	7.5	5.7
7	5.6	3.4	7.6	4.3	7.1	5.6
8	4.6	3.4	7.1	4.0	6.8	5.2
9	3.8	X	6.2	4.0	5.9	5.0
10	3.6		6.5	3.1	5.7	4.7
11	3.6		6.3	3.0	5.6	4.6
13	2.2		4.8	2.9	5.1	3.8
14	X		5.7	2.7	4.4	4.3
16			4.3	2.2	3.5	3.3
17			3.9	2.1	X	3.0
18			X	X		

* Días de inyección de solución salina isotónica estéril

X Muerte del animal

Tabla 27. Parasitemia de 5 ratones del LOTE I inoculados con 1×10^6 eritrocitos parasitados y tratados durante 5 días consecutivos con una dosis diaria de 0.10 mg de 6-p-cumaroilcatalpol/g de peso de ratón, a partir del segundo día después de la inoculación Plasmodium berghei yoelii.

Días después de la inoculación	% de eritrocitos parasitados de los ratones del LOTE I					Promedio
	1	2	3	4	5	
* 2	0.2	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
* 3	1.6	0.4	0.4	0.1	0.6	0.6
* 4	3.4	2.8	1.0	0.4	0.6	1.6
* 5	5.8	15.2	6.6	5.2	6.8	7.9
* 6	6.2	5.2	8.6	7.2	33.0	12.0
7	9.0	4.6	4.6	3.2	21.8	8.6
8	10.6	10.8	5.4	6.1	22.0	11.0
9	17.6	20.2	20.0	8.4	25.6	18.4
10	15.0	24.0	14.2	27.8	26.8	21.6
11	14.0	28.0	27.0	32.0	X	25.3
12	30.0	25.0	28.0	40.0		30.8
14	32.0	37.0	41.5	59.0		42.4
15	25.0	29.0	23.5	46.0		30.9
17	61.0	39.0	42.0	60.5		50.6
19	53.0	34.0	23.5	73.0		45.9
21	12.5	X	10.0	75.0		32.5
23	2.2		0.8	52.0		18.3
25	0.4		X	50.0		25.2
28	0.0			44.0		22.0
30	0.0			4.6		2.3
32	0.0			0.0		0.0
35	0.0			0.0		0.0
37	0.0			0.0		0.0

* Días de tratamiento con 6-p-cumaroilcatalpol

X Muerte del animal

TABLA 28. Parasitemia de 5 ratones del LOTE II inoculados con 1×10^6 eritrocitos parasitados y tratados durante 5 días consecutivos con una dosis diaria de 0.05 mg de difosfato de cloroquina/g de peso de ratón, a partir del segundo día después de la inoculación de Plasmodium berghei yoelii.

Días después de la inoculación	% de eritrocitos parasitados de los ratones del LOTE II					Promedio
	1	2	3	4	5	
* 2	1.0	0.6	0.4	0.4	0.2	0.5
* 3	1.4	1.4	0.8	0.2	0.2	0.8
* 4	0.2	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
* 5	0.4	0.8	0.2	0.0	0.2	0.3
* 6	0.4	2.2	0.0	0.4	0.0	0.6
7	1.0	10.6	0.8	0.4	0.0	2.6
8	6.3	16.1	1.5	3.1	0.4	5.5
9	9.0	9.0	3.8	9.8	1.8	6.7
10	7.8	15.8	12.8	25.8	6.8	13.8
11	15.0	39.0	25.0	35.0	26.0	28.0
12	12.0	40.0	26.0	12.0	30.0	24.0
14	9.5	59.0	11.0	41.5	18.0	27.8
15	24.0	70.5	17.0	48.5	38.0	39.6
17	33.0	55.0	33.0	44.0	44.0	41.8
19	32.0	50.0	25.0	X	41.0	37.0
21	48.0	X	41.0		44.0	44.3
23	31.0		31.5		32.0	31.5
25	21.0		29.5		14.0	21.5
28	0.2		12.7		0.0	4.3
30	0.0		0.0		0.0	0.0
32	0.0		0.0		0.0	0.0
35	0.0		0.0		0.0	0.0
37	0.0		0.0		0.0	0.0

* Días de tratamiento con difosfato de cloroquina

X Muerte del animal

TABLA 29. Parasitemia de 5 ratones del LOTE III inoculados con 1×10^6 eritrocitos parasitados y que recibieron, una inyección de 1.0 ml de solución salina isotónica estéril durante 5 días consecutivos a partir del segundo día después de la inoculación de Plasmodium berghei voelii.

Días después de la inoculación	% de eritrocitos parasitados en los ratones del LOTE III					PROMEDIO
	1	2	3	4	5	
* 2	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
* 3	0.4	0.8	0.2	0.2	0.0	0.3
* 4	1.2	2.6	3.0	2.2	0.4	1.9
* 5	3.8	3.6	2.4	5.8	6.4	4.4
* 6	6.6	3.7	5.0	7.4	2.2	5.0
7	8.0	17.2	7.0	10.8	9.6	10.5
8	11.4	23.6	7.0	11.3	13.8	13.4
9	16.0	26.6	6.2	14.8	17.4	16.2
10	15.8	24.6	8.6	41.4	17.0	21.5
11	10.0	26.0	15.0	34.0	21.0	21.2
12	14.0	28.0	17.0	47.0	31.0	27.4
14	28.0	48.5	23.5	65.0	57.0	44.4
15	30.0	49.5	35.0	51.5	45.0	42.2
17	43.0	56.0	60.5	X	64.0	55.9
19	38.5	61.0	47.5		60.0	51.8
21	51.0	61.0	21.0		47.0	45.0
23	X	X	16.0		20.0	18.0
25			11.8		33.5	22.7
28			13.0		X	13.0
30			X			

* Días de inyección de solución salina isotónica estéril

X Muerte del animal

TABLA 30. Niveles de hemoglobina en g/dl de 5 ratones del LOTE I inoculados con 1×10^6 eritrocitos parasitados y tratados durante 5 días consecutivos con una dosis diaria de 0.10 mg de 6-p-cumaroilcatalpol/g de peso de ratón, a partir del segundo día después de la inoculación de Plasmodium berghei yoelii. (Valores normales: 12-16 g/dl).

Días después de la inoculación	Niveles de hemoglobina en g/dl en los ratones del LOTE I					PROMEDIO
	1	2	3	4	5	
0	16.5	15.1	15.9	17.0	15.4	16.0
1	16.6	14.2	15.4	16.4	16.0	15.7
* 2	15.6	14.4	14.2	15.1	15.0	14.9
* 3	14.5	14.0	13.0	14.4	14.3	14.0
* 4	12.4	13.1	14.2	15.8	15.2	14.1
* 5	10.0	8.3	12.2	12.5	13.5	11.3
* 6	9.4	5.3	9.3	9.8	9.4	8.6
7	9.2	5.5	8.0	7.2	5.1	7.0
8	8.2	5.6	6.8	6.8	3.4	6.2
9	6.5	5.5	7.3	6.2	3.4	5.8
10	5.1	4.1	5.1	6.0	3.3	4.7
11	3.8	3.9	4.6	5.1	X	4.4
12	4.5	3.6	4.5	5.0		4.4
14	4.1	3.4	4.5	3.4		3.9
16	3.0	2.6	3.3	2.7		2.9
17	2.4	2.3	3.0	2.5		2.6
19	2.4	1.4	5.0	2.5		2.8
21	3.4	X	5.3	2.3		3.7
23	4.9		6.2	2.1		4.4
25	10.7		X	2.4		6.6
28	13.8			4.1		9.0
30	13.6			4.9		9.3
32	14.7			5.8		10.3
35	14.5			14.5		12.9
37	15.2			14.5		14.9

* Días de tratamiento con 6-p-cumaroilcatalpol

X Muerte del animal

TABLA 31. Niveles de hemoglobina en g/dl de 5 ratones del LOTE II inoculados con 1×10^6 eritrocitos parasitados y tratados durante 5 días consecutivos con una dosis diaria de 0.05 mg de difosfato de cloroquina/g de peso de ratón; a partir del segundo día después de la inoculación de Plasmodium berghei yoelii. (Valores normales: 12-16 g/dl).

Días después de la inoculación	Niveles de hemoglobina en g/dl en los ratones del LOTE II					
	1	2	3	4	5	Promedio
0	15.9	17.5	15.7	16.7	17.1	16.6
1	15.7	16.2	16.0	15.5	16.4	16.0
2	12.4	13.6	13.5	13.1	13.9	13.3
3	11.6	11.1	11.7	10.4	10.3	11.0
4	10.4	10.0	11.0	9.7	10.1	10.2
5	11.9	10.0	11.8	9.8	10.0	10.7
6	10.7	10.6	14.4	11.1	11.6	11.7
7	12.6	9.9	13.6	12.0	12.2	12.1
8	13.8	9.1	14.3	12.3	13.5	12.6
9	12.2	7.5	14.7	12.7	14.3	12.3
10	11.0	6.3	13.0	10.8	13.2	10.9
11	9.6	5.1	10.9	5.7	11.7	8.6
12	6.9	3.7	5.8	4.2	8.2	5.8
14	5.4	4.0	5.7	4.3	5.5	5.0
16	3.9	4.1	3.6	4.0	3.8	3.9
17	3.9	4.0	3.3	3.0	3.5	3.5
19	3.6	3.7	3.3	X	3.1	3.4
21	3.0	X	3.2		3.1	3.2
23	3.8		3.4		2.7	3.3
25	3.8		3.7		2.5	3.3
28	7.0		5.2		3.3	5.2
30	9.7		6.8		5.7	7.4
32	10.3		9.1		11.2	10.2
35	12.2		13.4		14.6	13.4
37	14.8		13.4		15.3	14.5

* Días de tratamiento con difosfato de cloroquina

X Muerte del animal

TABLA 32. Niveles de hemoglobina en g/dl de 5 ratones del LOTE III inoculados con 1×10^6 eritrocitos parasitados y que recibieron una inyección diaria de 1.0 ml de solución salina isotónica estéril durante 5 días consecutivos a partir del segundo día después de la inoculación de Plasmodium berghei voelii.
(Valores normales: 12-16 g/dl).

Días después de la inoculación	Niveles de hemoglobina en g/dl en los ratones del LOTE III					
	1	2	3	4	5	Promedio
0	15.9	14.6	14.5	16.2	16.8	15.6
1	15.3	14.4	14.7	16.4	17.2	15.6
* 2	14.5	13.6	14.3	14.6	14.5	14.3
* 3	12.6	11.2	11.4	11.5	12.3	11.8
* 4	12.8	10.9	12.7	10.8	12.3	11.9
* 5	11.1	9.5	10.7	11.1	12.1	10.9
* 6	10.4	9.2	9.6	9.3	9.9	9.7
7	8.6	7.2	6.9	7.7	9.6	8.0
8	8.4	5.9	6.6	6.4	7.6	7.0
9	6.8	5.3	5.9	5.3	7.0	6.1
10	6.1	4.9	5.2	4.4	6.8	5.5
11	5.5	4.3	4.2	6.0	5.9	5.2
12	4.9	3.9	4.1	4.0	5.2	4.4
14	3.6	3.4	4.2	4.0	5.6	4.2
16	2.7	2.5	2.7	2.6	3.2	2.7
17	2.9	2.1	2.6	X	3.2	2.7
19	1.6	1.9	1.6		2.9	2.0
21	1.5	1.4	2.2		3.2	2.1
23	X	X	2.2		3.2	2.7
25			2.2		3.2	2.7
28			2.0		X	2.0
30			X			X

* Días de inyección de solución salina isotónica estéril

X Muerte del animal

DISCUSION

Los experimentos del 1 al 5 se realizaron con la finalidad de caracterizar los parámetros necesarios para el establecimiento de un modelo de estudio, cuyo fin sería la investigación del efecto terapéutico del 6-p-cumaroilcatalpol sobre Plasmodium berghei yoelii.

En el EXPERIMENTO 1 la inhibición inicial de la reproducción de los parásitos con sólo la primera dosis, es posible que se deba al contacto directo de los parásitos con el extracto metanólico, ya que éste se administró, por la misma vía, media hora después de la inoculación de Plasmodium berghei yoelii. Sin embargo, también es posible que el inóculo administrado en este experimento hubiera sido lo suficientemente masivo como para que la cloroquina tampoco hubiera podido ejercer un efecto terapéutico, ya que, conjuntamente con los 3 últimos experimentos, se introdujeron lotes de ratones inoculados con 1×10^6 eritrocitos parasitados, que fueron tratados con dosis de 0.5 mg de extracto metanólico/g de peso de ratón X día X 5 días, a partir de las 48 horas de la inoculación de parásitos, y se obtuvieron resultados que muestran notable actividad antipalúdica del extracto metanólico, la cual no radica en el principio amargo de la corteza de Tabebuia rosea.

En los EXPERIMENTOS 6, y y 8, los ratones infectados con Plasmodium berghei yoelii que fueron tratados con 6-p-

cumaroilcatalpol mostraron un desarrollo de parasitemia muy similar al de los animales que no recibieron tratamiento. Aun cuando en el EXPERIMENTO 8, dos ratones tratados con 6-p-cumaroilcatalpol se recuperaron completamente de la infección, no se puede afirmar que dicha sustancia haya sido la causante de esta curación, ya que en este experimento se observó que en todos los lotes, incluyendo el LOTE III de animales no tratados, el desarrollo de la parasitemia fue mucho más lento que en los dos experimentos anteriores, lo cual pudo haber dado lugar, en estos dos animales, a la aparición de una respuesta probablemente de tipo inmunológico.

CONCLUSIONES

EXPERIMENTO 1.

a) Prueba de toxicidad del extracto metanólico

Con base en los resultados, se eligió, para ser aplicada en los siguientes estudios, una dosis de 30 mg de extracto metanólico para cada ratón, dos dosis por debajo de la última que mostró signos macroscópicos de toxicidad, con el fin de tener un buen margen de seguridad.

b) c) y d) Efecto de una, dos y tres dosis del extracto metanólico.

El extracto metanólico muestra cierta actividad retardando la reproducción de los parásitos, la cual se traduce en una mayor proporción de sobrevivientes entre ratones tratados con el extracto metanólico, comparada con la de los que no recibieron tratamiento, observadas en un mismo día.

La aplicación de más de una dosis de 30 mg de extracto metanólico a cada ratón no modifica los resultados sobre niveles de parasitemia y sobrevivencia, comparados con los de una sola dosis.

Las observaciones realizadas en los hígados de los ratones de los LOTES III indican efectos tóxicos del extracto metanólico sobre este órgano.

EXPERIMENTO 2.

Tanto los ratones inculados con 5×10^5 como los inculados con 1×10^6 eritrocitos parasitados, padecen parasitemias limitadas en menos de 18 días.

No habiendo diferencias apreciables entre el uso de - inóculos de 5×10^5 y 1×10^6 eritrocitos parasitados, se eligió un inóculo de 1×10^6 eritrocitos parasitados.

El sangrado diario para la determinación de hemoglobina no modifica los niveles de la misma.

EXPERIMENTO 3.

0.03 mg de difosfato de cloroquina/g de peso de ratón, aplicada diariamente durante 5 días no produjo efectos tóxicos.

0.05 mg de difosfato de cloroquina/g de peso de ratón, aplicada diariamente durante 5 días, resulta moderadamente tóxica.

0.09 mg de difosfato de cloroquina/g de peso de ratón, aplicada diariamente durante 5 días, resulta muy tóxica.

La toxicidad del difosfato de cloroquina sólo tuvo manifestaciones clínicas atribuibles a daños del sistema nervioso central.

La concentración de hemoglobina no fue modificada por ninguna de las dosis empleadas de difosfato de cloroquina.

Se decidió valorar en el siguiente experimento la dosis de 0.06 mg de difosfato de cloroquina/g de peso de ratón.

EXPERIMENTO 4.

La administración de 0.06 mg de difosfato de cloroquina/g de peso de ratón, administrada diariamente durante 5 días, en ratones infestados 72 horas antes con Plasmodium berghei yoelii causó la curación de 60% de los animales tratados. Esta dosis mejoró substancialmente el 20% de curación, obtenido por otros autores (13), observándose, además, que la determinación de los niveles de hemoglobina es un buen indicador de los niveles de parasitemia.

Se decidió usar una dosis de 0.05 mg de difosfato de cloroquina/g de peso de ratón para disminuir el riesgo de toxicidad, e iniciar su administración 48 horas después de la inyección del inóculo, con el fin de abatir el crecimiento de los parásitos en una fase más temprana y favorecer así la sobrevivencia de los ratones.

Con los datos obtenidos en éste y en el ensayo anterior, se completó la información requerida para la construcción del ensayo del 6-p-cumaroilcatalpol, obtenido del extracto metanólico de la corteza de Tabebuia rosea, a saber: uso de inóculo cuantificado (1×10^6 eritrocitos parasitados a cada ratón) de un antipalúdico de referencia (cloroquina a dosis de 0.06 mg/g de ratón aplicada a las 48 horas después de la infección), determinación paralela de hemoglobina y parasitemia.

EXPERIMENTO 5.

A la dosis empleada, el 6-p-cumaroilcatalpol no produjo signos ni síntomas tóxicos en los animales tratados.

No produjo alteraciones en los niveles de hemoglobina.

No produjo alteraciones macroscópicas en los órganos observados a la necropsia.

Esta será la dosis que se empleará en los siguientes ensayos.

EXPERIMENTOS 6, 7 y 8.

El 6-p-cumaroilcatalpol, a la dosis administrada, y bajo las condiciones del estudio, no presentó actividad anti-palúdica.

BIBLIOGRAFIA

1. Bustamante, E. M.
La lucha antipalúdica en el Mundo y en México
Gaceta Médica de México, 110 (6): 389-420 (1976).
2. Mc Gregor, I.A.
Topical aspects of the epidemiology of malaria.
Ins. I. Med.S. 14 (5): 523 (1978)
3. Brown, N.I.
Immunological aspects of malaria infection
Adv. Immunol. VIII, 1969
4. Buttler, T., Warren, K.S. y Mahoud, A.F.
Serial Feature: Algorithms in the diagnosis and
management of exotic diseases XIII. Malaria.
J. Inf. Dis. 133 (6) (1976)
5. Rozman, R.S. y Craig, J.C.
New experimental antimalarial drugs.
Adv. Pharm. Chem. 16 (1979)
6. Informe de un Grupo Científico de la OMS.
Quimioterapia del Paludismo.
Org. Mund. Salud, Ser. Inf. Techn. No. 375 (1967)
7. Martínez, M.
Plantas Útiles de la Flora Mexicana.
Ed. Botas.
México (1959).
8. Pennington, T.D. y Sarukhan, J.
Arboles Tropicales de México.
Instituto Nacional de Investigaciones Forestales.
México (1968)

9. Compadre, C.
Actividad biológica y estudio fitoquímico de Tabebuia rosea
Tesis, Facultad de Química. UNAM (1980)

10. Thompson, P.E. y Werbel, L.M.
Antimalarial Agentes.
Academic Press.
New York (1972)

11. Roth, L. y Herman, R.
Correlation of anemia in mice infected with Plasmodium berghei (NK-65) with enhancement of in vitro erythrophagocytosis. --

12. Mourphy, J.R.
Host defenses in murine malaria: Analysis of the mechanisms of immunity to Plasmodium berghei generated in response to immunization with formalin-killed blood stage parasites. Infection and Immunity, 24 (3): 707 (1979)

13. Juna, C.H., Contreras, C.E. y Perrin, L.H.
Circulating and tissue-bound immune complex formation in murine malaria. J. Immunology, 122 (6): 2154 (1979).

14. Davidsohn, I. y Bernard, H.J.
Todd-Sanford Diagnóstico Clínico por el Laboratorio Cap. 5 pp 109-114
Quinta Edición
Salvat Editores, S.A.
España (1975).