



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
**POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

FACULTAD DE MEDICINA  
BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

**EVALUACIÓN DEL EFECTO GENOTÓXICO Y ANTIMALÁRICO**  
**DEL METAVANADATO DE SODIO EN UN MODELO DE**  
**MALARIA LETAL MURINA**

**TESIS**

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
**MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

PRESENTA:

**BIÓL. CASARRUBIAS TABAREZ BRENDA**

**TUTORA PRINCIPAL DE TESIS: DRA. TERESA IMELDA FORTOUL VAN DER GOES**  
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM.

**COMITÉ TUTOR: DR. MARIO AGUSTÍN ALTAMIRANO LOZANO**  
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA, UNAM.

**DRA. NORMA RIVERA FERNÁNDEZ**  
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM.

**CD. MX., MAYO, 2019**



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.





**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
**POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

FACULTAD DE MEDICINA  
BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

**EVALUACIÓN DEL EFECTO GENOTÓXICO Y ANTIMALÁRICO**  
**DEL METAVANADATO DE SODIO EN UN MODELO DE**  
**MALARIA LETAL MURINA**

**TESIS**

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
**MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

PRESENTA:

**BIÓL. CASARRUBIAS TABAREZ BRENDA**

**TUTORA PRINCIPAL DE TESIS: DRA. TERESA IMELDA FORTOUL VAN DER GOES**  
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM.

**COMITÉ TUTOR: DR. MARIO AGUSTÍN ALTAMIRANO LOZANO**  
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA, UNAM.

**DRA. NORMA RIVERA FERNÁNDEZ**  
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM.

**MÉXICO, CD. MX., MAYO, 2019**



OFICIO CPCB/415/2019

Asunto: Oficio de Jurado para Examen de Grado.

M. en C. Ivonne Ramírez Wence  
Directora General de Administración Escolar, UNAM  
Presente

Me permito informar a usted que el Subcomité de Biología Experimental y Biomedicina del Posgrado en Ciencias Biológicas, en su sesión ordinaria del día 18 de febrero de 2019, aprobó el siguiente jurado para la presentación del examen para obtener el grado de **MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS** de la alumna **CASARRUBIAS TABAREZ BRENDA** con número de cuenta **308028720**, con la tesis titulada **"EVALUACIÓN DEL EFECTO GENOTÓXICO Y ANTIMALÁRICO DEL METAVANADATO DE SODIO EN UN MODELO DE MALARIA LETAL MURINA"**, realizada bajo la dirección de la **DRA. TERESA IMELDA FORTOUL VAN DER GOES**:

Presidente: DRA. GUILLERMINA ÁVILA RAMÍREZ  
Vocal: DRA. SANDRA LUZ GÓMEZ ARROYO  
Secretario: DRA. NORMA RIVERA FERNÁNDEZ  
Suplente: DRA. ANA MARÍA SALAZAR MARTÍNEZ  
Suplente: DRA. MARÍA ISABEL GARCÍA PELÁEZ

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE  
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"  
Cd. Universitaria, Cd, Mx., a 04 de abril de 2019

DR. ADOLFO GERARDO NAVARRO SIGÜENZA  
COORDINADOR DEL PROGRAMA



## **AGRADECIMIENTOS**

Al Posgrado en Ciencias Biológicas, UNAM.

A CONACYT por la beca recibida (CVU 817592).

A la Dra. Teresa I. Fortoul van der Goes tutora principal de este proyecto, al Dr. Mario Agustín Altamirano Lozano y la Dra. Norma Rivera Fernández miembros del comité tutor.

## AGRADECIMIENTOS

● **A mi tutora:** la Dra. Teresa Imelda Fortoul van der Goes por darme la oportunidad de realizar mi trabajo de maestría en el laboratorio a su cargo y por su valiosa ayuda para la realización y culminación de este trabajo.

**A los miembros de mi comité tutor,** por todo el apoyo brindado para la realización de este proyecto:

Dra. Norma Rivera Fernández

Dr. Mario Agustín Altamirano Lozano

● **Al jurado revisor** por sus valiosas aportaciones a la escritura de esta tesis:

Dra. Guillermina Ávila Ramírez

Dra. Sandra Luz Gómez Arroyo

Dra. Norma Rivera Fernández

Dra. Ana María Salazar Martínez

Dra. María Isabel García Peláez

- A la Dra. Marcela Roja Lemus, del Departamento de Biología Celular y Tisular, Facultad de Medicina, UNAM. Por el apoyo brindado para la realización y culminación de este trabajo.
- A la Dra. Elba Carrasco Ramírez, del Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Medicina, UNAM. Por su apoyo para el mantenimiento de la cepa *Plasmodium yoelii yoelii* e infección de los ratones utilizados en este trabajo.
- Al Biól. Armando Zepeda Rodríguez y al Biól. Francisco Pasos Nájera, del Departamento de Biología Celular y Tisular, Facultad de Medicina, UNAM. Por su apoyo en la obtención y el procesamiento de las imágenes.
- Al Dr. Enrique Pinzón Estrada y al Dr. Ismael Torres Saldaña, personal del bioterio de la Facultad de Medicina por su apoyo en la obtención, cuidado y manejo de los animales experimentales.
- A la técnica Académico Raquel Guerrero Alquicira del Laboratorio de Técnica Histológica del Departamento de Biología Celular y Tisular, Facultad de Medicina, UNAM.
- A los miembros del Laboratorio de Biología Celular y Tisular de la Facultad de Medicina, UNAM por el apoyo para la realización de esta tesis.

## ÍNDICE

### Cuadro de abreviaturas

|  |    |
|--|----|
| Resumen .....  | 1  |
| Abstract .....   | 3  |
| 1. Introducción .....  | 5  |
| 1.1 Malaria.....   | 5  |
| 1.1.2 Características de <i>Plasmodiumyoeliiyoelii</i> y evaluación de riesgo..... | 5  |
| 1.2 Epidemiología .....  | 7  |
| 1.2.1 Epidemiología mundial .....  | 7  |
| 1.2.2 Epidemiología en México .....  | 8  |
| 1.3 Ciclo biológico.....   | 9  |
| 1.4 Cuadro clínico .....   | 11 |
| 1.5 Diagnóstico .....  | 12 |
| 1.6 Estrategias para el control de la malaria .....                                | 13 |
| 1.6.1 Control biológico.....   | 13 |
| 1.6.2 Control químico/tratamiento .....  | 14 |
| 1.7 Resistencia a fármacos .....   | 16 |
| 2. Propuesta de nuevos fármacos .....  | 17 |
| 2.1 Antecedentes: metales vs parásitos.....  | 17 |
| 3. Generalidades del vanadio .....   | 22 |
| 3.1 Propuesta del vanadio con fines terapéuticos .....                             | 23 |
| 4. Criterios de la fase preclínica para la propuesta de nuevos fármacos.....       | 23 |
| 5. Detección de citotoxicidad: viabilidad celular por fluorocromos .....           | 24 |
| 6. Detección de genotoxicidad .....  | 25 |
| 6.1 Ensayo cometa pH13 .....   | 25 |
| 6.2 Ensayo de micronúcleos con naranja de acridina .....                           | 26 |
| 7. Justificación .....   | 28 |
| 8. Hipótesis .....   | 28 |
| 9. Objetivos.....  | 28 |
| 9.1 Objetivo general .....   | 28 |
| 9.2 Objetivos particulares.....  | 28 |
| 9.2.1 Fase 1: curva dosis-respuesta.....   | 28 |
| 9.2.2 Fase 2: evaluación antimalárica y genotóxica (protocolo de 4 días) .....     | 28 |
| 9.2.3 Fase 3: sobrevida .....  | 29 |
| 10. Metodología .....  | 29 |
| 10.1 Modelo experimental: ratón cepa CD1 .....                                     | 29 |
| 10.2 Grupos experimentales .....   | 30 |

|   |    |
|---|----|
| 10.3 Parásitos .....  | 30 |
| 10.3.1 Infección de ratones.....  | 30 |
| 10.4 Estrategias experimentales .....   | 30 |
| 10.4.1 Administración de los compuestos .....   | 30 |
| 10.5 Toma de muestras y obtención de los hígados.....   | 31 |
| 10.6 Estrategias experimentales .....   | 31 |
| 10.6.1 Viabilidad celular por fluorocromos en leucocitos .....  | 31 |
| 10.6.2 Ensayo cometa pH13.....  | 32 |
| 10.6.3 Ensayo de micronúcleos con naranja de acridina y evaluación de<br>citotoxicidad en reticulocitos ..... | 33 |
| 10.6.4 Evaluación de la parasitemia en frotis sanguíneo con naranja de<br>acridina .....                      | 34 |
| 10.6.5 Obtención de los hígados .....   | 35 |
| 10.7 Análisis estadístico .....   | 35 |
| 11. Resultados .....  | 36 |
| 11.1 Fase 1: curva dosis respuesta .....  | 36 |
| 11.2 Fase 2: evaluación antimalárica y genotóxica (protocolo de 4 días) .....                                 | 40 |
| 11.3 Fase 3: sobrevida .....  | 50 |
| 12. Resumen de resultados .....   | 61 |
| 13. Discusión de resultados.....  | 63 |
| 13.1 Determinación de la parasitemia y evaluación genotóxica con naranja de<br>acridina .....                 | 63 |
| 13.2 Fase 1 Curva dosis respuesta .....   | 63 |
| 13.2.1 Viabilidad celular.....  | 63 |
| 13.2.2 Índice de migración y frecuencia de MN .....   | 64 |
| 13.3 Fase 2: Evaluación antimalárica y genotóxica (protocolo de 4 días).....                                  | 64 |
| 13.3.1 Viabilidad celular.....  | 64 |
| 13.3.2 Índice de migración.....   | 65 |
| 13.3.3 Frecuencia de micronúcleos .....   | 65 |
| 13.3.4 Evaluación de la parasitemia y porcentaje de los estadios de <i>Pyy</i> .....                          | 65 |
| 13.3.5 Cambios histológicos en el hígado y presencia de hemozoína .....                                       | 66 |
| 13.4 Fase 3 Sobrevida.....  | 66 |
| 13.4.1 Sobrevida .....  | 66 |
| 13.4.2 Viabilidad celular.....  | 66 |
| 13.4.3 Índice de migración.....   | 67 |
| 13.4.4 Frecuencia de micronúcleos .....   | 67 |
| 13.4.5 Parasitemia y porcentaje de los estadios de <i>Pyy</i> .....   | 68 |
| 14. Conclusiones.....   | 70 |
| 15. Literatura citada .....   | 71 |

## Cuadro de abreviaturas

|                                      |  |
|--------------------------------------|--|
| <b><i>An. albimanus</i></b>          | <i>Anopheles albimanus</i>                     |
| <b><i>An. darlingi</i></b>           | <i>Anopheles darlingi</i>                      |
| <b><i>An. pseudopunctipennis</i></b> | <i>Anopheles pseudopunctipennis</i>            |
| <b><i>An. punctimacula</i></b>       | <i>Anopheles punctimacula</i>                  |
| <b>CQ</b>                            | Cloroquina                                     |
| <b>DNA</b>                           | Ácido desoxirribonucleico                      |
| <b>ERN</b>                           | Especies reactivas de nitrógeno                |
| <b>ERO</b>                           | Especies reactivas de oxígeno                  |
| <b>Hz</b>                            | Hemozoína                                      |
| <b>IMg</b>                           | Índice de migración                            |
| <b>MTI</b>                           | Mosquiteros tratados con insecticidas          |
| <b>MN</b>                            | Micronúcleo(s)                                 |
| <b>MV</b>                            | Metavanadato de Sodio (NaVO <sub>3</sub> )     |
| <b>NA</b>                            | Naranja de acridina                            |
| <b><i>P. falciparum</i></b>          | <i>Plasmodium falciparum</i>                   |
| <b><i>P. malariae</i></b>            | <i>Plasmodium malariae</i>                     |
| <b><i>P. ovale</i></b>               | <i>Plasmodium ovale</i>                        |
| <b><i>P. vivax</i></b>               | <i>Plasmodium vivax</i>                        |
| <b><i>Pyy</i></b>                    | <i>Plasmodium yoelii yoelii</i>                |
| <b>TCA</b>                           | Terapias combinadas basadas en la artemisinina |
| <b>RL</b>                            | Radicales libres                               |

## Resumen

La malaria es una enfermedad causada por parásitos del género *Plasmodium*. En 2016, la WHO reportó que la transmisión de esta enfermedad continúa en las zonas tropicales y subtropicales del mundo, donde se registraron, 216 millones de casos y 428,000 muertes. En México esta enfermedad no se ha controlado adecuadamente y los casos se han incrementado. La resistencia farmacológica es clave en el control de esta parasitosis, lo que ha llevado al uso de terapias que combinan fármacos con diferentes mecanismos de acción y aún continúa la búsqueda de alternativas para su tratamiento y control exitosos; como una opción se han propuesto algunos metales que han mostrado propiedades antiparasitarias.

Este estudio se realizó para evaluar el potencial antiparasitario y genotóxico del metavanadato de sodio ( $\text{NaVO}_3$ ) en ratones infectados con *Plasmodium yoelii yoelii* (*Pyy*).

En ratones machos de la cepa CD-1, se probaron dos dosis de metavanadato de sodio 5 ó 10 mg/kg/día vía oral, solas y en combinación con *Pyy*. Se tomaron muestras de sangre entera y se realizaron las siguientes técnicas: viabilidad celular por fluorocromos y la cuantificación de la proporción de reticulocitos por cada 1000 eritrocitos para evaluar citotoxicidad, ensayo cometa alcalino para evaluar el daño al DNA reparable y ensayo de micronúcleos (MN) con naranja de acridina para evaluar el daño irreparable, el porcentaje de parasitemia y los estadios parasitarios de *Pyy*.

Los resultados mostraron que ninguna de las dosis de MV empleadas generaron efectos citotóxicos ni genotóxicos. En ratones infectados la dosis de 5 mg MV no tuvo efecto en el porcentaje de parasitemia y aumentó igual que el grupo no tratado (*Pyy*), por el contrario la dosis de 10 mg de MV disminuyó el porcentaje de parasitemia en aproximadamente 50%, además tuvo un efecto parasitostático que se identificó como el retraso en los estadios del ciclo de vida de *Pyy*, en estos grupos no se observó disminución en el porcentaje en leucocitos, sin embargo, en la proporción de reticulocitos/eritrocitos los grupos 5 mg de MV + *Pyy* y el grupo no tratado disminuyeron el porcentaje, además de aumentar los rompimientos de DNA, por otra parte ningún grupo aumentó la frecuencia de MN.

Se cuantificó la sobrevida de los grupos 10 mg de MV + *Pyy* y el grupo no tratado, los resultados en esta fase revelaron un aumento en la sobrevida de los ratones que fueron tratados con 10 mg MV. El 10% sobrevivió 14 días, se observó disminución de la parasitemia y un efecto parasitostático, en cuanto al efecto genotóxico no hubo un aumento y la viabilidad celular en leucocitos no tuvo modificaciones; sin embargo, al cuantificar la proporción de reticulocitos/eritrocitos se observó una disminución en el grupo no tratado en los días 5 y 6 y en el grupo tratado con 10mg de MV en los días 5 y 7; pero en este último se observó una recuperación en el día 8 y hasta el final del experimento (14días) ya que aumentó el porcentaje de reticulocitos incluso por arriba del grupo testigo.

Por los resultados obtenidos se puede concluir que: el efecto parasitostático del metavanadato de sodio (10 mg/kg) en el modelo con *Pyy* disminuyó la parasitemia y como consecuencia ayudó a que los ratones tratados sobrevivieran más tiempo que los no tratados, además las dosis de metavanadato de sodio utilizadas no generaron efectos genotóxicos ni citotóxicos en el ratón, lo que permite continuar con su evaluación en futuros estudios como un posible antimalárico.

## Abstract

Malaria is a disease caused by *Plasmodium* parasites. In 2016, the World and Health Organization reported that malaria transmission is still a worldwide problem in tropical and subtropical areas, with 216 million cases and 428,000 deaths per year. In Mexico, malaria has not been controlled and the cases have increased. The key point for the control of malaria is the pharmacological resistance, that has led to the use of a drugs combination with different mechanisms of action and to the continuous search of novel treatments to control the parasite. Some metals that have shown antiparasitic properties have been proposed as an option.

In the present study the antiparasitic and genotoxic potential of sodium metavanadate ( $\text{NaVO}_3$ ) in mice infected with *Plasmodium yoelii yoelii* (*Pyy*) were evaluated.

CD-1 male mice received 2 different doses of sodium metavanadate (MV) 5 or 10 mg/kg by oral gavage, alone and tested in combination with *Pyy*. Whole blood samples were take; cytotoxicity, cellular viability by fluorochromes and the quantification of reticulocytes proportion per 1000 erythrocytes were used; to evaluate reparable DNA damage alkaline comet assay was used; for irreparable DNA damage with micronuclei assay, parasitemia and *Pyy* development were evaluated with orange acridine in a blood smear.

Results showed that none of the MV doses generated cytotoxic or genotoxic effects. The dose of 5mg had no effect on parasitemia as it increased in the same percentage as in the untreated control group. The dose of 10 mg decreased the parasitemia by approximately 50% and showed a parasitostatic effect identified as a delay in the *Pyy* life cycle, none of the groups showed a decrease in the leukocyte's percentage; however, the percentage of reticulocytes proportion in both 5 mg + *Pyy* and untreated group decreased; in addition DNA breaks increased, but the frequency of micronuclei remained the same in all the studied groups.

The survival was quantified and the results revealed an increase in the survival of the mice that were treated with 10 mg MV. Ten percent of the mice survived for 14 days and a decreased in parasitemia was observed as well as a parasitostatic effect. Genotoxic effect and the leukocyte's viability were not observed in this phase; however, when the reticulocytes proportion in 1000 erythrocytes were quantified, a decrease in the untreated group on days 5 and 6, and in days 5 and 7 of the 10mg treated group was observed. A recovery was noticed on day 8 and through the end of the experiment (14 days), because a higher than controls percentage of reticulocytes was registered.

Based on these results, it might be concluded that: the parasitostatic effect observed in the *Pyy* model, with decreased parasitaemia increased mice survival in comparison with

the untreated group and the MV dose did not generate genotoxicity or cytotoxicity. This result supports the continuity of the evaluation of MV in future studies as antimalarial agent.

## Introducción

### 1. Malaria

La malaria es una enfermedad parasitaria importante por su alta prevalencia a nivel mundial, causada por parásitos del género *Plasmodium*, que se transmiten al ser humano por la picadura de mosquitos infectados del género *Anopheles* (Ravikumar *et al.*, 2011, WHO, 2015).

En 1808, el médico militar de origen francés Charles Louis Alphonse Laveran, tras numerosas observaciones de muestras sanguíneas de enfermos palúdicos, evidenció que el origen de la enfermedad era un protozooario. Sin embargo, fue hasta 1885 que los científicos italianos Ettore Marchiafava y Ángelo Celli pudieron situar al protozooario a nivel taxonómico, recibiendo el nombre de *Plasmodium* (orden *Haemosporida*, Familia *Plasmodiidae*) (Bueno *et al.*, 2008). Hoy en día está clasificado en el Reino Protista, Phylum Apicomplexa, Clase Aconoidasida, Orden Haemosporida, Familia Plasmodiidae, Género *Plasmodium* (Uniprot, 2017).

Las cuatro especies principales de *Plasmodium* que infectan a los seres humanos son: *Plasmodium vivax*, *Plasmodium ovale*, *Plasmodium malariae* y *Plasmodium falciparum*. Éste último se considera el más importante ya que ocasiona la mayor parte de las muertes como consecuencia de esta enfermedad. Hay reportes que la malaria de monos ocasionada por *P. knowlesi* también puede transmitirse al ser humano, lo que ha ocurrido en las regiones boscosas de Asia Sudoriental (Ahmed y Cox-Singh, 2015, Mishra *et al.* 2017). Por otra parte, los plasmodios que infectan a los murinos son: *Plasmodium vinckei*, *Plasmodium berghei*, *Plasmodium chabaudi* y *Plasmodium yoelii*, éste último con una sub especie *Plasmodium yoelii yoelii* (Pyy) que causa malaria letal (Carlton *et al.* 2002).

#### 1.1.1 Características de *Plasmodium yoelii yoelii* y evaluación de riesgo

Para las pruebas relacionadas con malaria, se utilizan modelos murinos y por consiguiente las cepas de plasmodios que los infectan como: *Plasmodium yoelii yoelii* por lo que es importante conocer sus características y la evaluación de riesgo, es decir, las medidas de contención que se deben implementar cuando se trabaja con él.

## ❖ Agente biológico: *Plasmodium yoelii yoelii*

### Características principales

Parásito específico de murinos y sus características principales son: causa malaria letal y reproduce muchas de las características biológicas del parásito que causa la malaria en seres humanos (Carlton *et al.* 2002).

### Morfología

Parásitos unicelulares, su morfología en el hospedero depende de la etapa de maduración (anillo, trofozoíto o esquizonte).

### Riesgos a la salud humana

No se han reportado infecciones en personas con este plasmodio.

### Infección en murinos

Dosis de infección: 1 parásito.

Patogenicidad: letal, los ratones infectados solo sobreviven 7 días.

Modo de transmisión: por la picadura del mosquito hembra *Anopheles* y por inoculación con sangre de ratones infectados con el parásito.

Periodo de incubación: 24 h.

### Viabilidad

Susceptibilidad a fármacos: cloroquina sensible.

Inactivación: hipoclorito de sodio al 1%.

**Supervivencia fuera del hospedero:** Viable en la sangre de los mosquitos *Anopheles*.

**Requerimientos de contención:** Para plasmodios que se transmiten al humano se recomiendan prácticas con nivel de bioseguridad 2, instalaciones y equipo de contención para todas las actividades que involucren la utilización de animales infectados, fluidos y tejidos corporales potencialmente infecciosos.

- No hay especificaciones en la literatura para *P. yoelii yoelii*.

**Equipo de protección personal (EPP):** bata y guantes de nitrilo.

No hay una evaluación de riesgo formal para este parásito, sin embargo, al no existir zoonosis el riesgo disminuye, por lo que el EPP es adecuado.

**Almacenamiento:** alícuotas del parásito en contenedores sellados, debidamente etiquetados en criopreservación en ultracongeladores a  $-70^{\circ}\text{C}$ .

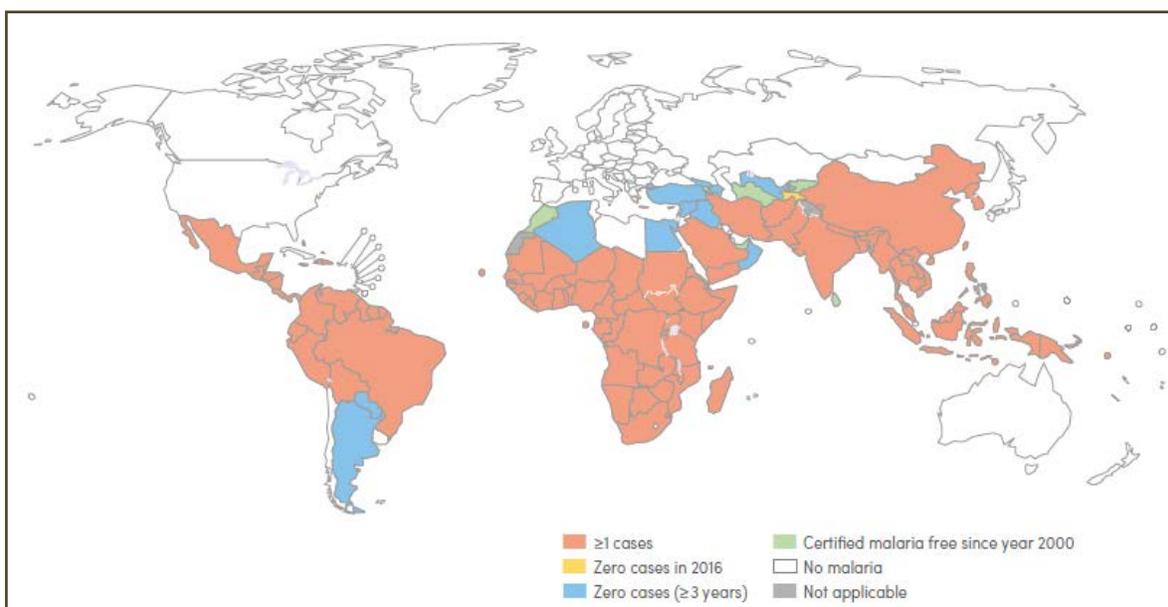
Para llevar a cabo este procedimiento es indispensable el uso de bata, guantes, y lentes de seguridad para evitar quemaduras.

+ Se recomienda conservar la cepa activa en roedores, realizando pases sucesivos.

## 1.2 Epidemiología

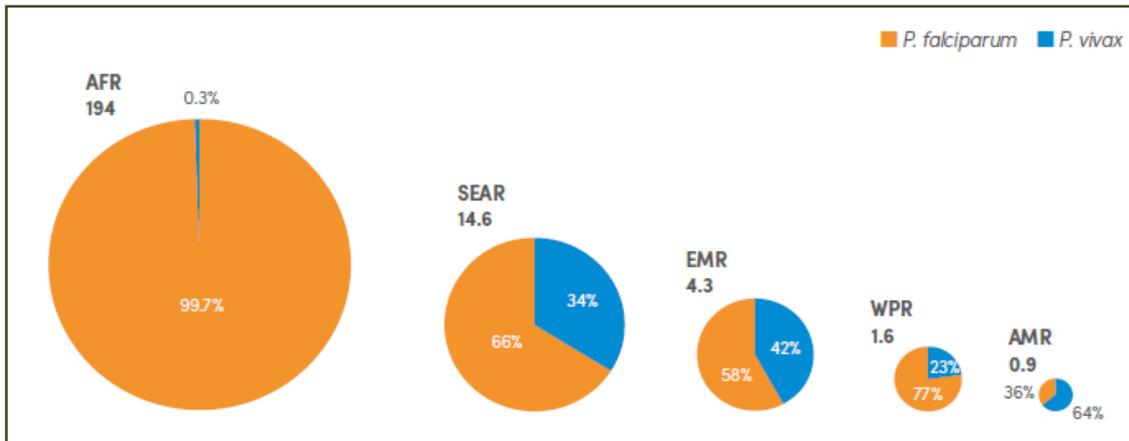
### 1.2.1 Epidemiología Mundial

En el año 2016, se reportaron un total de 216 millones de casos y 445 000 muertes que ocurrieron en 91 países donde continúa la transmisión de la malaria, los cuales están distribuidos en las zonas tropicales y subtropicales del mundo (WHO, 2017) en la Figura 1, se muestra que los plasmodios tienen una distribución geográfica particular: en África está presente *P. falciparum*, *P. ovale* y *P. malariae*, sin embargo, estos últimos son menos frecuentes, *P. vivax* predomina en América central y en el Mediterráneo oriental (Baird 2009).



**Figura 1.** Mapa que representa los casos de malaria en el año 2016. Fuente WHO (2017).

La mayoría de los casos (90%) y muertes (91%) se registraron en la región de África donde está presente *P. falciparum* y representa el 99.7% de los casos, seguidos por la región del sureste asiático (66% de casos y muertes) y la región del Mediterráneo oriental (58% de casos y muertes), además los casos representados por *P. vivax* en estas regiones son 0.3%,14.6%, 4.3%, 1.6% y 0.9% respectivamente (WHO, 2017) (Figura 2).



**Figura 2.** Estimación de los millones de casos de malaria causados por *P. falciparum* y *P. vivax* por región en el año 2016. El área de los círculos es proporcional al número de casos estimados en cada región. AFR, África; SEAR, sureste asiático; EMR, Mediterráneo oriental; WPR, Pacífico occidental y AMR, América. Fuente WHO (2017).

La infección puede ser potencialmente propagada a través de transfusiones sanguíneas, trasplante de médula ósea e infecciones congénitas (Carrasco-Ramírez, 2013) y se ha reportado como la quinta causa de muerte debida a enfermedades infecciosas después de las respiratorias, el VIH, las diarreas y la tuberculosis (Hay *et al.*, 2004, Snow *et al.*, 2005).

### 1.2.2 Epidemiología en México

En México la malaria se controló a mitad del siglo pasado, pero la migración humana desde países centroamericanos, donde no se ha logrado su regulación, representa uno de los riesgos que puede favorecer la transmisión autóctona en las diversas regiones del país donde los mosquitos transmisores están presentes (Ibáñez, 2012). Otro factor que contribuye a la presencia de la malaria es la inseguridad ya que las localidades con transmisión persistente se encuentran ubicadas (casi en su totalidad) en áreas rurales remotas con problemas sociales que dificultan el ingreso y la permanencia del personal de salud, lo que en ocasiones llega a interrumpir ciclos de trabajo lo que retrasa el diagnóstico y tratamiento de casos, aumentando el riesgo de que la transmisión se disperse nuevamente y se reinstale en áreas actualmente libres de paludismo, aunado a que la asignación de recursos no es la adecuada debido a que las aportaciones estatales

para la adquisición de medicamento y gastos de operación son cada vez menores (CENAPRECE 2017).

Las zonas en riesgo son las comunidades rurales de los estados de Chiapas con 338 casos, Campeche con 86 casos, Quintana Roo con 31 casos, Tabasco con 11 casos, Nayarit con 8 casos, Sinaloa con 13 casos y Chihuahua con 61 casos (Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica, 2016). Sin embargo, en los últimos años, el número de casos confirmados ha disminuido significativamente: de más de 1200 en el 2010 a 715 en el 2017 (WHO, 2017; Figura 3).



**Figura 3.** Número de casos autóctonos de malaria en México, de los años 2010 al 2017. Modificado de WHO (2018) - Datos preliminares.

### 1.3 Ciclo biológico

*Plasmodium* spp. muestra un complejo ciclo de vida que alterna entre los mosquitos del género *Anopheles* y el hospedero humano. El ciclo biológico del parásito se divide en 2: primero los estadios en el ser humano con las etapas pre-eritrocítica o hepática e intraeritrocítica, ambas asexuales y en el mosquito se lleva a cabo la reproducción sexual (Cowman *et al.*, 2016; Figura 4).

#### 1) Fase pre-eritocítica o estadios en el hígado

Los esporozoítos de *Plasmodium* son inoculados dentro de la dermis del hospedero durante la picadura del mosquito infectado. Los esporozoítos son altamente móviles y migran de la piel a los capilares para su diseminación por el torrente sanguíneo (Amino *et al.* 2006), llegan al hígado en donde invaden los hepatocitos para realizar una replicación esquizogónica, que da como resultado la liberación de



Los plasmodios una vez dentro de los eritrocitos, digieren entre el 60% y 80% de la hemoglobina presente (Krugliak *et al.*, 2002). Este proceso ocurre dentro del parásito en un organelo ácido (pH 5.2 -5.6) llamado vacuola digestiva y el proceso es catalizado por enzimas proteolíticas como plasmepsinas I, II y IV, proteasa histoaspártica (HAP), falcipainas 2 y 3 y falcilsina (Eggleston *et al.*, 1999), Banerjee *et al.*, 2002). Los péptidos producidos son degradados a aminoácidos en el citoplasma del parásito probablemente por aminopeptidasas y sirven como una fuente alimento para el parásito (Gavigan *et al.*, 2001). Por otra parte, el grupo hemo es liberado en la vacuola digestiva donde el hierro es oxidado del estado Fe (II) a Fe (III) por un mecanismo que aún no está completamente explorado, pero se propone que involucra al O<sub>2</sub> como agente oxidante para producir hemozoína (Hz) o pigmento malárico (Fe (III) PPIX), que es una sustancia microcristalina, insoluble y no tóxica (Castro y Navarro, 2012).

Se ha demostrado que este mecanismo de conversión del hemo libre a Hz es para evitar los efectos tóxicos del grupo hemo en estado libre [Fe (II)] ya que es capaz de producir especies reactivas de oxígeno, lo que puede causar peroxidación lipídica (Tappel, 1955), daño al DNA (Aft y Mueller, 1983) y proteínas (Aft y Mueller, 1984), resultando en la lisis del parásito.

#### **1.4 Cuadro clínico**

El periodo de incubación depende de la especie de *Plasmodium*: *P. falciparum*: 10-12 días, *P. vivax* y *P. ovale*: 14 días, *P. malariae*: 18-40 días y *P. knowlesi*: 11 días aproximadamente. Al inicio los síntomas son inespecíficos, como cefalea, náuseas, vómitos y mialgias. Posteriormente, aparece la crisis palúdica con fiebre elevada (> 39 °C) y escalofríos; en la exploración física suele encontrarse palidez de piel y mucosas, esplenomegalia y en ocasiones hepatomegalia (Hortelano *et al.*, 2013).

A medida que la infección progresa, el número de glóbulos rojos disminuye debido a diferentes causas como: hemolisis, eritrofagocitosis, diseritropoyesis y una ineficiente eritropoyesis y esto puede conducir a una anemia grave (Chang *et al.*, 2004, Pathak *et al.*, 2016). Por otra parte, *P. falciparum* se destaca como la forma con mayor malignidad debido a su capacidad de adherirse al endotelio vascular causando el cuadro clínico de malaria grave donde las complicaciones son: malaria cerebral, anemia severa, insuficiencia renal y afección pulmonar (Heddini, 2002).

## 1.5 Diagnóstico

En la actualidad se cuenta con varias opciones diagnósticas para detectar la enfermedad, como son:

- a) Diagnóstico clínico: éste suele ser muy inexacto debido a que los síntomas iniciales son inespecíficos y se reporta que cuenta con una especificidad del 20% al 60% en comparación con la microscopía (Arnáez y García, 2010).
- b) Microscopía: se considera el estándar de oro en el diagnóstico de la malaria. Se pueden realizar frotis de sangre fina y gota gruesa, las cuáles se tiñen con el colorante Giemsa o Wright, lo que permite observar los diferentes estadios del parásito, identificar la especie y el porcentaje de parasitemia (CDC, 2018). Durante la década de los 90's se buscó una alternativa para el diagnóstico de la enfermedad que fuera más efectiva, por lo que en 1991, Fumihiko Kawamoto propuso el diagnóstico de malaria por microscopía de fluorescencia, con un filtro de interferencia adaptado a un microscopio de luz utilizando el fluorocromo Naranja de acridina (NA) y su principio de tinción diferencial: DNA (fluorescencia verde a 535nm) y RNA (fluorescencia roja a 650nm); por lo tanto, la aplicación de NA en un frotis con plasmodios se observa de la siguiente forma: el núcleo que contiene DNA en verde y el citoplasma que contiene RNA en rojo.

Entre los beneficios aportados con la técnica están los siguientes:

1. Alta sensibilidad y especificidad: Lowe y colaboradores (1996) reportan que las muestras con NA tienen una sensibilidad de 93.6%, ya que fue posible diagnosticar 146 muestras positivas de 200, mientras que con Giemsa fueron 141; 91.5% de especificidad debido a que se detectó la presencia de otras especies diferentes a *P. falciparum* en 12 de 14 muestras; por otra parte, Tarimo y colaboradores (1999) reportan una sensibilidad del 100% y especificidad de 94.3% y Kawamoto (1991) pudo diferenciar muestras con *P. falciparum* y *P. vivax*.
2. Reducción de malos diagnósticos en 44.8% (Tarimo *et al.*, 1999).
3. Tiempo rápido para la obtención de resultados: Delacollette y Van der Stuyft (1994), reportaron que el tiempo de preparación de las muestras para su observación teñidas con Giemsa fue de 30 min y para NA de 2 min y Kawamoto (1991) reportó que el tiempo requerido para encontrar un primer parásito era de 20 segundos a 14min.

4. Evaluación de muestras: para la evaluación de muestras se utiliza un objetivo 40X, mientras que para la evaluación con Giemsa 100X (Delacollette *et al.*, 1994, Kawamoto, 1991).
5. Identificación de bajas parasitemias: Kawamoto (1991) reportó que se puede identificar 1 parásito por muestra y que la solución de NA al ser mantenida en la oscuridad, puede durar estable mucho tiempo (años).

A pesar de que es una técnica más sensible, específica y rápida comparada con la tinción con Giemsa los autores concluyeron que la obtención del microscopio con los filtros implica un gasto considerable (Kawamoto, 1991, Lowe *et al.*, 1996), que se recomendaría para hospitales, laboratorios o centros de referencia, donde la fluorocromización con NA pueda tener un uso más amplio (Tarimo *et al.*, 1999, Delacollette *et al.*, 1994), pero para el diagnóstico de la malaria en campo se puede seguir utilizando la tinción de Giemsa evaluada en un microscopio de campo claro (Delacollette *et al.*, 1994).

Debido a los antecedentes anteriormente descritos, el uso de NA para la evaluación de la parasitemia ha disminuido.

- c) Pruebas de diagnóstico rápido: detectan antígenos específicos de plasmodios en la sangre de una persona, sin embargo, sólo permiten la identificación de *P. falciparum* y *P. vivax*. y no es posible determinar el porcentaje de parasitemia; Se reporta una sensibilidad del 92.7% y una especificidad del 99.2% para *P. falciparum* (Ochola *et al.*, 2006, CDC, 2018).
- d) Ensayo de reacción en cadena la polimerasa (PCR): realiza una amplificación de los genes del parásito, tiene una sensibilidad del 90% y una especificidad de 100%, sin embargo, no se utiliza debido a su complejidad y alto costo (Arias y Soto, 2009).

## 1.6 Estrategias para el control de la malaria

### 1.6.1 Control biológico

Existen alrededor de 515 especies de mosquitos *Anopheles (An)* en el mundo de las cuales aproximadamente 70 de ellas pueden transmitir malaria y coexistir en las mismas áreas; por ejemplo en México están presentes *An. pseudopunctipennis*, *An. albimanus*, *An. darlingi* y *An. punctimacula* (WHO, 2017). Por tal motivo una de las estrategias para el

control de la transmisión de la malaria es disminuir el contacto con el vector y se han implementado las siguientes estrategias:

- a) Empleo de mosquiteros tratados con insecticidas (MTI) con piretroides ya que han demostrado ser inocuos para los seres humanos y otros mamíferos, pero tóxicos para los mosquitos. La WHO (2017) reporta que en todo el mundo se repartieron un total de 582 millones de MTI entre el año 2014 y el 2016. De esta cantidad, se entregaron 505 millones de MTI en el África subsahariana que es el área endémica con mayores afectaciones.
- b) Rociamiento residual intradomiciliario: es un método de prevención que consiste en rociar con insecticidas las paredes interiores de las viviendas.

Pese a las medidas implementadas, se ha reportado la resistencia del vector a los piretroides, ya que, se observó un aumento de ésta de 71% en 2010 a 81% en 2016 (WHO, 2017).

### **1.6.2 Control químico/ tratamiento**

El tratamiento de la malaria sigue dominado por las cuatro clases principales de fármacos desarrollados en el siglo XX: quinolónicos, antifolatos, derivados de artemisinina y algunos antibióticos y cada clase tiene un mecanismo de acción diferente (Raphemot *et al.*, 2016; Cuadro 1).

Para elegir un tratamiento adecuado es fundamental conocer el tipo de Plasmodio que causa la enfermedad y la zona de procedencia (para valorar la resistencia a los tratamientos antipalúdicos) (Hortelano *et al.*, 2013). Para la malaria no complicada registrada en zonas donde no se reporta resistencia, el primer fármaco de elección para el tratamiento es la Cloroquina (CQ) un derivado quinolónico sintetizada por Hans Andersag en 1934 (Baird, 2009) y en casos causados por *P. vivax* y *P. ovale* se requiere la administración de un segundo medicamento, primaquina, para eliminar los parásitos latentes en el hígado (Mishra *et al.*, 2017).

Por otra parte, debido a la actual resistencia a CQ se han implementado medicamentos antipalúdicos en combinación para aumentar la eficacia del fármaco y retrasar la aparición de resistencia, por lo que, en casos donde se identifica resistencia a CQ se utilizan las terapias combinadas basadas en la artemisinina (TCA): artemeter-lumefantrina, artesunato-amodiaquina, artesunato-mefloquina, artesunato-sulfadoxina-pirimetamina y dihidroartemisinapiperaquina (OMS, 2015, Mishra *et al.*, 2017).

**Cuadro 1.** Clases de fármacos utilizados para tratar la malaria. Modificado de Mishra *et al.*, 2017.

| Clases de fármacos        | Categoría  | Fármacos                | Mecanismo de acción  |
|---------------------------|--|-------------------------|--|
| Derivados de quinolina    | 4-amino quinolina  | Cloroquina              | Actúan acumulándose en la vacuola digestiva del parásito y forman un complejo con el grupo hemo previniendo su cristalización, lo que resulta en la acumulación de hierro libre citotóxico (Schlesinger <i>et al.</i> , 1988).   |
|                           |  | Amodiaquina             |  |
|                           | 4-metanol quinolina  | Quinina, quinidina      |  |
|                           |  | Mefloquina              |  |
| 8-amino quinolina         | Primaquina   |                         |  |
| Derivados de artemisinina | Sesquiterpenos lactona endoperóxidos                         | Artesunato              | El puente de endoperóxido en su molécula interactúa con el grupo hemo en el parásito y genera radicales libres. Los radicales libre resultantes se unen selectivamente a proteínas de membrana, causando peroxidación lipídica, daño en el retículo endoplásmico lo que inhibe la síntesis de proteínas y conduce a la lisis del parásito (O'Neill <i>et al.</i> , 2010).  |
|                           |  | Artemether              |  |
|                           |  | Dihidro-artemisinina    |  |
| Antifolatos               | Folatos antagonistas; combinados con sulfonamidas y sulfonas | Pirentamina/sulfadoxina | Los antifolatos actúan como inhibidores competitivos de sustratos naturales de la ruta para la síntesis de <i>ново</i> de folatos.<br>Los antifolatos tipo 1(A1) (sulfonamidas y sulfonas) inhiben a la enzima DHPS y los antifolatos tipo 2 (A2) (como pirimetamina, trimetoprima y cicloguanil, metabolito de proguanil) inhiben a la enzima DHFR, lo que da como resultado una disminución en la síntesis de ADN. En combinación A1+A2, se observa un efecto sinérgico además bloquean la división celular del parásito (Warhurs 1986). |
|                           | Naptoquinona; combinado con folato antagonista               | Atovacuona/Proguanil    |  |

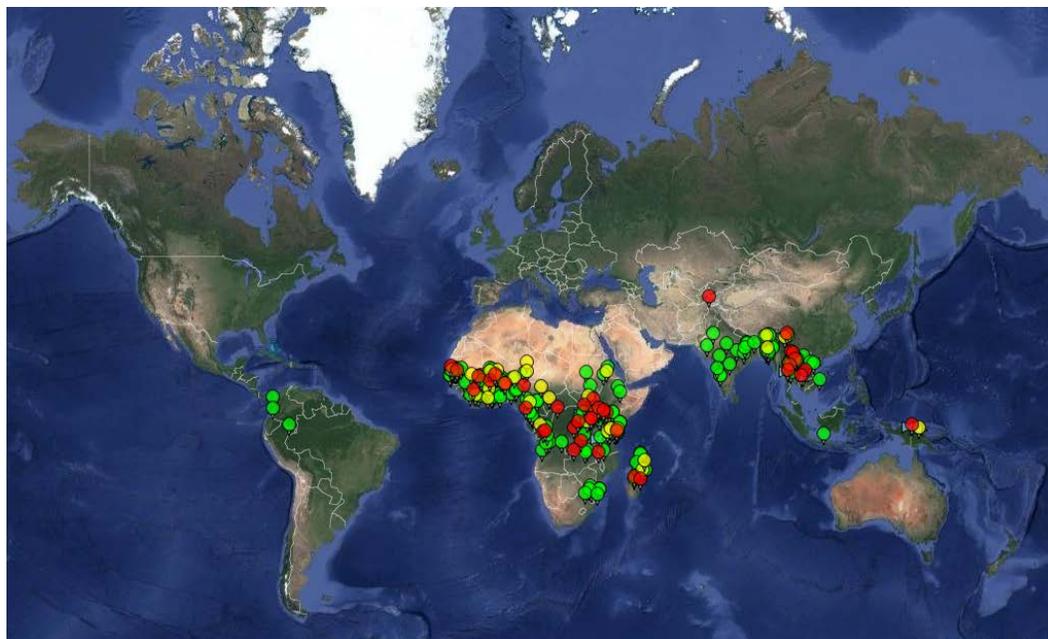
Continuación **Cuadro 1.** Clases de fármacos utilizados para tratar la malaria. Modificado de Mishra *et al.* (2017).

| Clases de fármacos | Categoría     | Fármacos     | Mecanismo de acción  |
|--------------------|---------------|--------------|--|
| Antibióticos       | Tetraciclinas | Tetraciclina | El blanco de éstos agentes es el apicoplasto: causan un bloqueo en la replicación del genoma, perjudican la expresión de los genes y producen apicoplastos anormales en la progenie de los parásitos tratados (Dahl <i>et al.</i> 2006). |
|                    |               | Doxiciclina  |  |
|                    | Lincomicida   | Clindamicina |  |
|                    | Macrolida     | Azitromicina |  |

### 1.7 Resistencia a fármacos

Durante las últimas décadas se ha incrementado la propagación de la resistencia a los fármacos actualmente utilizados para tratar la malaria, sobre todo en zonas endémicas, donde se concentran la mayor parte de los casos y muertes causadas por *P. falciparum*, (Figura 5), principalmente al derivado quinolínico, CQ, amenazando la eficacia de los tratamientos actuales (WHO 2015, Raphemot *et al.*, 2016). En la actualidad la terapia antimalárica combinada se considera como mecanismo para retardar la posible aparición de resistencia en las poblaciones circulantes de parásitos (TCA) (Mishra *et al.*, 2017, WHO, 2017).

La resistencia farmacológica es uno de los problemas en la complejidad del control de esta parasitosis debido a que no existen hasta el momento vacunas efectivas (Bagavan *et al.*, 2011, Kesara *et al.*, 2013).



**Figura 5.** Efectividad de las cuatro clases de fármacos empleados a nivel mundial para tratar la malaria del año 2000 al año 2017; (no distingue entre monoterapias y terapias combinadas). Los círculos verdes denotan alta efectividad, los amarillos mediana efectividad y los rojos baja efectividad. Fuente WWARN Molecular Surveyor.

## 2. Propuesta de nuevos fármacos

La aparición de resistencia por los parásitos en ésta y otras parasitosis a los medicamentos comúnmente utilizados, ha impulsado el diseño de novedosas estrategias de síntesis para nuevos fármacos, entre las cuales se incluye la modificación de fármacos conocidos mediante su acoplamiento a metales de transición y metales acoplados a moléculas orgánicas; de igual manera la implementación de metales sin modificaciones.

### 2.1 Antecedentes: metales vs parásitos

Debido a la aparición y expansión de resistencia los antimaláricos se han sintetizado compuestos que involucran en su estructura a los metales como el vanadio, (Cuadro 2).

**Cuadro 2.** Efecto de compuestos metálicos en varias parasitosis.

| Autor y año                     | Tipo de estudio y parásito  | Compuesto   | Resultados  | Mecanismo  |
|---------------------------------|---|---|---|--|
| Benítez <i>et al.</i><br>2009 a | <p><i>in vitro</i></p> <p><i>Trypanosoma cruzi</i><br/>Epimastigotes<br/>cepa Dm28c.</p> <p>*Plásmido pBskII</p>                                  | <p>A)VO(Salsem -2H)(bipy)<br/>B)VO(BrSalsem-2H) (bipy)<br/>C)VO(Salsem -2H)(dppz)<br/>D)VO(BrSalsem -2H) (dppz)</p> <p>V: Vanadil<br/>O: Esfera de coordinación<br/>bipy: 2,2' bipyridina<br/>dppz: dipirido[3,2-a:2',3-c]<br/>phenaina</p> | <p>Inhibición de la proliferación de los epimastigotes concentración dependiente, inhibición del 95% con C y 85% con D.</p> <p>Observación de 2 isoformas al exponer al plásmido a C.</p>   | <p>Posible interacción con el DNA, causando pérdida de la estructura y rompimientos para el surgimiento de isoformas.</p>                            |
| Benítez <i>et al.</i><br>2013 b | <p><i>in vitro</i></p> <p><i>Trypanosoma cruzi</i><br/>Epimastigotes</p> <p><i>Leishmania major</i><br/>Promastigotes</p> <p>*Plásmido pBR322</p> | <p>A)<br/>V<sup>iv</sup>O(LASSBiO1064-2H)(H<sub>2</sub>O)</p> <p>B)<br/>V<sup>iv</sup>O(LASSBiO1064-2H)(phen)(H<sub>2</sub>O)</p>   | <p>Inhibición de la proliferación del 50% de los epimastigotes en una concentración menor que el nifurtimox.</p> <p>Menor eficacia que la pentamidina, en la inhibición de la proliferación de los promastigotes.</p> <p>A) Evidencia de actividad citotóxica en macrófagos en 30 y 100 μM y B solo con 100 μM.</p> | <p>Interacción con el DNA, causando entrecruzamientos y superenrollamientos<br/>compuesto V<sup>iv</sup>O(LASSBiO1064-2H)(phen)(H<sub>2</sub>O).</p> |

Continuación **Cuadro 2.** Efecto de compuestos metálicos en varias parasitosis.

| Autor y año                    | Tipo de estudio y parásito  | Compuesto   | Resultados   | Mecanismo   |
|--------------------------------|---|---|--|---|
| Christensen <i>et al.</i> 2016 | Cultivo <i>in vitro</i><br>axénico<br><i>Leishmania tarentolae</i>          | A) 1,3-propil bifosfonato<br>B) 1,4-butyl bifosfonato<br>C) 1,5-pentil bifosfonato<br>D) 1,6-hexil bifosfonato<br>E) 1 aminodecano-1,1-bifosfonato<br>Análogos de vanadio polioxometales bifosfonatos<br>F)<br>$V_5(Alendronato)_2((NH_4)_2Rb_2[V_5O_9(OH)_2(H_2O)(O_3PC(C_3H_9N)OPO_3)_2] \cdot 8H_2O)$<br>G) $V_3(Zn)_3(Na_3[V_3O_4(O_3PC(C_4H_6N_2)OPO_3)_2] \cdot 8H_2O)$ | Disminución de motilidad a las 3 horas de exposición con los compuestos A-D [10 mM], E [130 mM] y F-G [1 mM].<br><br>Disminución de la viabilidad a las 3 horas, A-D (35%), E (28%), F (34%), G (60%) y a las 27 horas A-D (45%), E-F (27%), G (35%).  | Posiblemente los pirofosfatos inhiban la traslocación de protones pirofosfatasa ( $V-H^+$ -ppasa), enzima que se localiza en el acidocalcisoma en algunas especies de <i>Leishmania</i> , ya que los compuestos bifosfonatos son análogos a los pirofosfatos. |
| Loiseau <i>et al.</i> 2000     | <i>in vivo</i><br><i>Leishmania donovani</i><br><br><i>Leishmania major</i> | Ir COD pentamidina tetrafenilborato<br><br>COD: ciclo octano  | -No hay toxicidad en <i>L. donovani</i> con la dosis de 232 mg/kg (ip) durante los 5 días de tratamiento y se inhibió la parasitemia 23%.<br>-En <i>L. major</i> , con la dosis de 87 mg/kg (subcutánea) en el compuesto inhibió la parasitemia 32%.<br>-En microscopia electrónica de transmisión se observó alteración en la membrana del núcleo como aumento del espacio intermembranal; se evidenció disminución de los ribosomas en el citoplasma, fragmentación de KDNA, además, mitocondrias hinchadas y retraídas. | El compuesto puede interactuar con las membranas debido a la diferencia de cargas y también con los ribosomas.<br><br>Se ha reportado que la pentamidina interactúa con las bases A-T kDNA en los kinetoplastos.  |

Continuación **Tabla 2.** Efecto de compuestos metálicos en varias parasitosis.

| Autor y año                        | Tipo de estudio y parásito  | Compuesto   | Resultados   | Mecanismo  |
|------------------------------------|---|---|--|--|
| Sánchez-Delgado <i>et al.</i> 1996 | <p><i>in vitro</i></p> <p><i>Plasmodium berguei</i></p> <p><i>Plasmodium falciparum</i> (FCB1 y FCB2) resistentes a cloroquina</p> <p><i>in vivo</i></p> <p><i>Plasmodium berguei</i></p> | <p>Complejo 1: Rh(COD)(CQ)Cl</p> <p>Complejo 2:[RuCl<sub>2</sub>(CQ)]<sub>2</sub></p> <p><i>in vivo</i></p> <p>Dosis intraperitoneal</p> <p>CQ: cloroquina</p> <p>COD: 1,5-ciclooctadieno</p> | <p><i>-in vitro P. berghei,</i></p> <p>El 50% de la concentración inhibidora (IC<sub>50</sub>) de cloroquina difosfato (CQDP) fue de 72 mM, del complejo 1: 73 mM y del complejo 2: 18 mM.</p> <p>La relación IC<sub>50</sub>: dio como resultado que el complejo 2 es 4 veces más efectivo que la CQDP.</p> <p><i>-in vivo P. berguei</i></p> <p>El complejo 1 redujo la parasitemia 73 % y el complejo 2, 94% respecto al grupo no tratado.</p> <p>No hay efectos tóxicos en los ratones hasta 30 días después del tratamiento.</p> <p><i>-in vitro P. falciparum</i></p> <p>FCB1 y FCB2 con el complejo 2 mostraron una IC<sub>50</sub> menor que solo CQDP. La relación IC<sub>50</sub> es 4 veces mayor comparada con CQDP en la cepa FCB1 y de 2.25 en FCB2.</p> | <p>Potencializan el efecto de la cloroquina.</p> |

Continuación **Cuadro 2.** Efecto de compuestos metálicos en varias parasitosis.

| Autor y año                  | Tipo de estudio y parásito                        | Compuesto  | Resultados   | Mecanismo |
|------------------------------|---|--|--|-----------|
| Rivera <i>et al.</i><br>2016 | <i>in vivo</i><br><i>Plasmodium yoelii yoelii</i> | Pentóxido de vanadio (V <sub>2</sub> O <sub>5</sub> ) (Vía inhalada) | Disminución del 60% de la parasitemia respecto al grupo no tratado en el día 7.<br>Disminución de los esquizontes en día 7 de 2.5 con respecto del grupo no tratado de 12.<br>Sobrevivida en el día 7 del 100% de los individuos.<br>Disminución de la cantidad de hemozoína, respecto del grupo no tratado. |           |

### 3. Generalidades del vanadio

El Vanadio (V) es un metal de transición que se ubica en la tabla periódica como el primer elemento del grupo 5B, existe en estados de oxidación que van de -1 a +5 y puede pasar de un estado a otro a través de procesos de óxido-reducción. En condiciones fisiológicas el  $V^V$  predomina como anión vanadato ( $H_2VO_4^-$ ) y  $V^{IV}$  como catión vanadilo ( $VO_2^+$ ) (Hirao, 2000).

La exposición al V puede ser a través de las vías oral, inhalada y dérmica. La absorción es diferencial y depende de la vía de exposición: por la inhalada es de 25%, por la oral 10% y por la dérmica se desconoce el porcentaje absorbido. Una vez absorbido puede estar en estados de oxidación 3, 4 y 5, es transportado a varios tejidos del cuerpo por el torrente sanguíneo (el vanadio tetravalente es transportado por albúmina y transferrina, mientras que el pentavalente sólo por transferrina) y se acumula exclusivamente como  $V^{IV}$  (Elinder *et al.*, 1988, Mukherjee *et al.*, 2004). El V tiene un comportamiento bifásico, en las 20 primeras horas se excreta la mayor cantidad ~30% y entre 40 a 50 días el resto (Elinder *et al.*, 1988) (Figura 6).

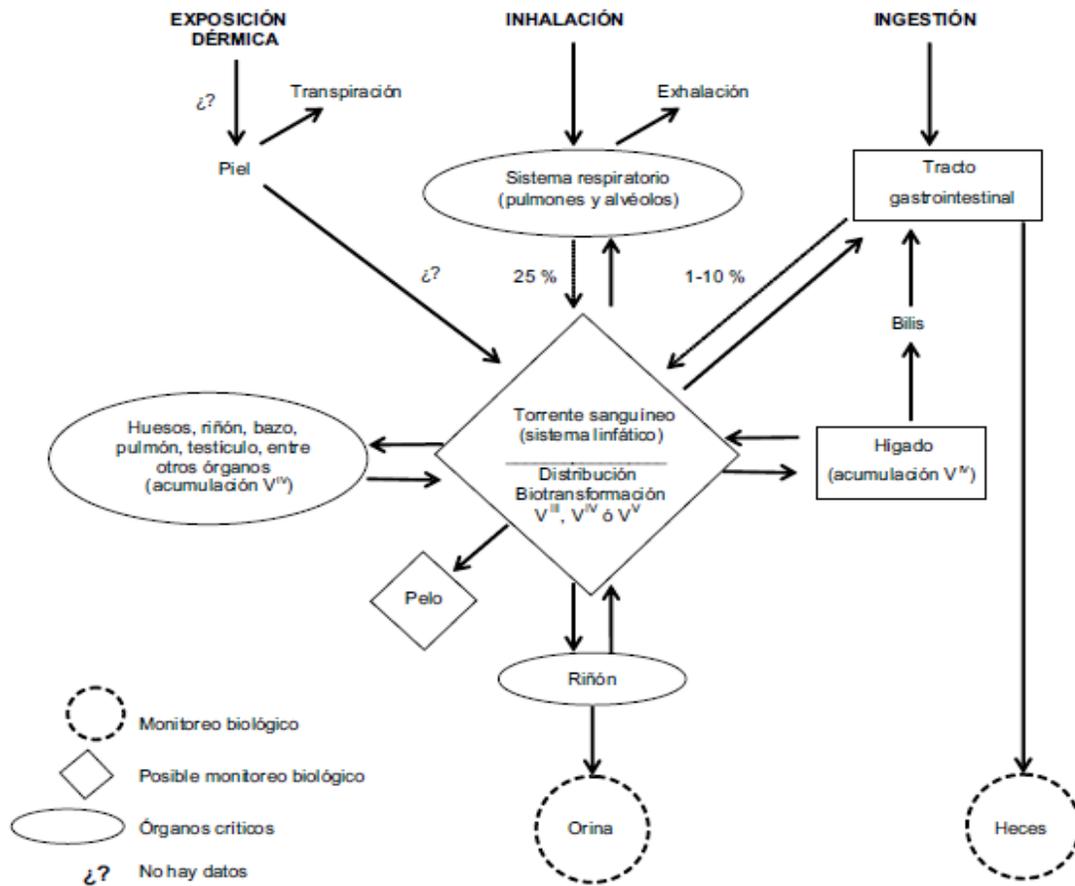


Figura 6 Toxicocinética del vanadio. Fuente Rodríguez-Mercado y colaboradores (2006).

Estudios bioquímicos han demostrado que el vanadio ejerce su acción a través de diferentes mecanismos: participa en reacciones que generan especies reactivas de oxígeno (ERO), especies reactivas de nitrógeno (ERN) y radicales libres (RL) (Minasi y Willsky, 1991, Cortizo *et al.*, 2000, Valko *et al.*, 2006), puede causar inhibición de enzimas principalmente de algunas fosfatasa reguladoras debido al parecido estructural y electrónico del ión vanadato con el fosfato (Crans *et al.*, 2004). La mayor parte de los efectos que ejerce es a través de la generación de ERO por lo que puede interactuar con lípidos, proteínas y DNA (Attia *et al.*, 2005, Ávila-Costa *et al.*, 2005, Leopardi *et al.*, 2005).

Estos mecanismos de acción se han relacionado con los efectos tóxicos de vanadio, sin embargo, existe evidencia que su efecto depende de varios factores entre ellos: el tipo de compuesto, su estado de oxidación, la ruta de administración y la dosis (Gambino, 2011).

### **3.1 Propuesta del vanadio con fines terapéuticos**

En las últimas décadas los compuestos orgánicos e inorgánicos de V han adquirido importancia especial en la farmacología, debido al aumento en la exploración de sus propiedades con fines terapéuticos (Rodríguez-Mercado *et al.*, 2006, Gambino, 2011) partiendo del conocimiento de sus mecanismos de acción (Gambino, 2011).

Dentro de los compuestos de V que se han planteado con potenciales efectos terapéuticos está el **metavanadato de sodio (NaVO<sub>3</sub>) (MV)** el cual se ha propuesto como: anticarcinógeno (Wang *et al.*, 2010, Zwolak, 2015, Wu *et al.*, 2016) e hipoglucemiante donde ya fue probado en seres humanos y se reportó como único efecto secundario la intolerancia gastrointestinal (Goldfine, 1995); lo que permite seguir explorando al V y en el especial al MV como un agente terapéutico.

Además durante las últimas décadas se ha incrementado el desarrollo de compuestos de V como agentes antiparasitarios (Tabla 2); éstos son un enfoque innovador y rentable para el descubrimiento de fármacos antiparasitarios ya que los compuestos metálicos son menos costosos y más accesibles para el tratamiento de las enfermedades parasitarias (Gambino, 2011).

## **4. Criterios de la fase preclínica para la propuesta de nuevos fármacos**

La propuesta de un fármaco, involucra un proceso largo y costoso ya que debe de mostrarse, a lo largo de sus distintas fases, que el nuevo medicamento reúne los requisitos de eficacia, seguridad y calidad exigidos para su comercialización y

administración en seres humanos (Department of Health and Human Services and Food and Drug Administration, 1983).

### **Fase Pre-clínica**

En esta fase se prueba exhaustivamente el compuesto seleccionado en el laboratorio para confirmar que su administración en humanos será segura (Merck Sharp and Dohme, 2016).

Todas las pruebas se realizan en función de varios factores (Merck Sharp and Dohme, 2016) del tipo:

- a) De medicamento ya que existen regulaciones diferentes dependiendo de su origen (biotecnológico, químico, biológico etc.).
- b) De pacientes a quien está dirigido (adultos, niños, adultos mayores, mujeres embarazadas, personas inmunocomprometidas etc.).
- c) De enfermedad a tratar ya que cada uno tiene requisitos especiales como las enfermedades oncológicas.
- d) De agencia reguladora.

Los estudios pre-clínicos se realizan en animales experimentales y modelos fisiológicos en el laboratorio, analizando las propiedades físico-químicas y el comportamiento del compuesto *in vivo* e *in vitro*. El propósito primario es la evaluación de la actividad biológica. En esta etapa, las moléculas se prueban en dos o más especies de animales, debido a que un compuesto puede afectarlas en forma diferente. Estos estudios pre-clínicos evalúan un gran rango de parámetros de la molécula, e incluyen estabilidad, niveles plasmáticos, tisulares y propiedades farmacocinéticas. Se realizan estudios de toxicología sistemática con dosis únicas y dosis repetidas, de fertilidad y reproducción; toxicológicos locales (pruebas en órganos diana), de hipersensibilidad, genotoxicidad, citotoxicidad y carcinogenicidad (Marovac, 2001, Merck Sharp and Dohme, 2016).

Todos los resultados deben entregarse a las agencias reguladoras correspondientes ya que serán las que autoricen o no el avance a la siguiente etapa (Department of Health and Human Services and Food and Drug Administration, 1983).

### **5. Detección de citotoxicidad: viabilidad celular por fluorocromos**

Las pruebas de detección de citotoxicidad ayudan a la medición de células vivas y muertas, y una de ellas es el ensayo de viabilidad celular por fluorocromos, en la cual el resultado final de la técnica genera un contraste entre las células vivas (fluorescencia verde) y las muertas (fluorescencia roja) (Takasugi, 1971).

Esta técnica se basa en la integridad celular principalmente de la membrana plasmática ya que es a través de ella que se difunden los fluorocromos empleados el diacetato de fluoresceína (FDA) y bromuro de etidio (BrEt). El FDA atraviesa la membrana celular y es hidrolizado por medio de esterasas en el citoplasma, se acumula dentro de la célula debido a que la integridad enzimática y de membrana no está afectada y se puede observar de un color verde fluorescente en condiciones de excitación apropiada, lo que indica que la célula está viva, por otra parte, el BrEt se difunde a través de la membrana plasmática más lento, sin embargo, en células donde ésta se ha dañado su difusión es más rápida y una vez adentro se combina con el DNA tiñéndolo de un color rojo brillante, indicando que la célula está muerta (Kvach *et al.*, 1983, Bank, 1987).

## **6. Detección de genotoxicidad**

Las pruebas para la detección de daño en el material genético son de gran importancia, ya que permiten la evaluación de la alteración en el material genético en los organismos causado por un agente (Gómez-Meda y Zúñiga-González, 2007). Para estimar los efectos producidos en el DNA, se utilizan diferentes ensayos para la detección de genotoxicidad, entre ellos: la prueba de Ames, aberraciones cromosómicas (Fatima *et al.*, 2001) intercambio de cromátidas hermanas (ICH) (Norppa, 2004), el ensayo de micronúcleos (Krishna y Hayashi, 2000) y el ensayo cometa (Rojas *et al.*, 2000).

### **6.1 Ensayo cometa pH13**

El ensayo cometa o electroforesis en gel de una sola célula (SCGE) se ha convertido en uno de los métodos estándar para la evaluación de daños en el DNA, en pruebas *in vitro* e *in vivo* (Tice *et al.*, 2000, Collins, 2004), se utiliza en diferentes campos de investigación como: prueba para control biológico, genotoxicología ecológica, pruebas de genotoxicidad y de daño y reparación de DNA (Collins, 2004, Cortés-Gutiérrez *et al.*, 2011). Su implementación otorga múltiples ventajas: es una prueba muy sensible detecta bajos niveles de daño, utiliza un número pequeño de células por muestra y es de fácil aplicación (Tice *et al.*, 2000).

Su nombre deriva de la apariencia del DNA de las células tras la realización del ensayo: una cabeza intensamente brillante la cual es DNA sin daño y una cola cuya longitud e intensidad están relacionadas con la cantidad de rompimientos de cadena sencilla y doble, sitios álcali lábiles y rompimientos de cadena sencilla asociados con sitios retardados de reparación del DNA en la versión alcalina pH13 (Tice *et al.*, 2000). Esto se debe a la migración de los rompimientos de cadena del DNA hacia el ánodo durante una

electroforesis horizontal (Pérez-Cadahía, 2004), además debe realizarse una prueba simultánea de citotoxicidad ya que ésta se relaciona con el nivel de daño al DNA y se considera que para la validación del ensayo cometa se debe tener una viabilidad celular por arriba del 80% (Tice *et al.*, 2000, Collins, 2004).

## **6.2 Ensayo de micronúcleos con naranja de acridina**

El ensayo de micronúcleos es utilizado ampliamente para evaluar la genotoxicidad y está recomendado por los organismos reguladores de todo el mundo para ser llevado a cabo como parte de la evaluación de la bioseguridad, tanto en ensayos *in vitro* como *in vivo* (Krishna y Hayashi, 2000), su alta fiabilidad y su bajo costo han contribuido al incremento de la adopción de la técnica y a su éxito internacional (Bonassi *et al.*, 2006).

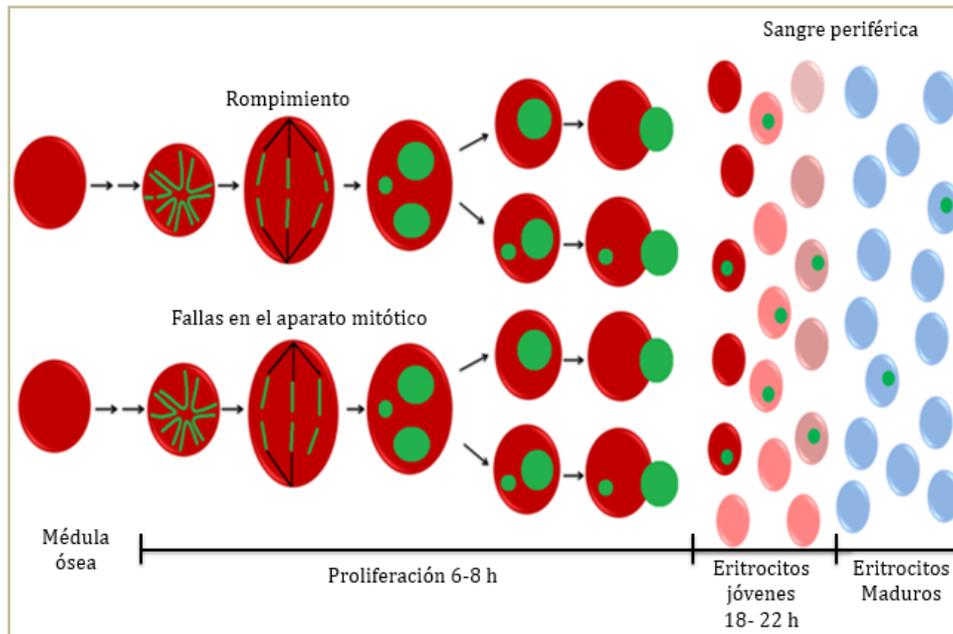
El propósito del ensayo es identificar sustancias que causan la formación de micronúcleos (en hematología conocidos como cuerpos de Howell-Jolly), que se forman durante la transición de metafase-anafase, como resultado de la fragmentación de cromosomas (clastogenicidad) o de pérdida de cromosomas completos debido a la disfunción del aparato mitótico (aneugenicidad). Cuando esto ocurre el material genético se desprende y no se incorpora correctamente al núcleo de la célula hija, originando uno o varios núcleos de menor tamaño que el principal que son denominados “micronúcleos” (Schmid, 1975, Krishna y Hayashi, 2000).

El estudio se puede realizar en diferentes tipos celulares como: esófago, cavidad nasal, mucosa oral y en células eritropoyéticas de médula ósea (Krishna y Hayashi, 2000, Morita *et al.*, 2011).

Las células eritropoyéticas de médula ósea tienen etapas de proliferación y maduración, siendo ésta última la que es utilizada para la realización del ensayo de MN con naranja de acridina (Krishna y Hayashi, 2000). Durante la proliferación las células se dividen de forma normal y continúa, pero si es administrado un agente éste puede actuar de forma negativa y causar daños en los cromosomas y/o en las proteínas relacionadas con la disyunción de cromátidas; estas anomalías son regularmente ocasionadas en la transición de meta fase a anafase, por lo que, los procesos de daño ya sea aneugénicos o clastogénicos se ven reflejados en forma de MN durante las siguientes etapas de la división celular y al término de ésta; los MN contienen el material genético que debido al mecanismo de acción del agente administrado no se incorporó de manera correcta al núcleo principal (Krishna y Hayashi, 2000) (Figura 7).

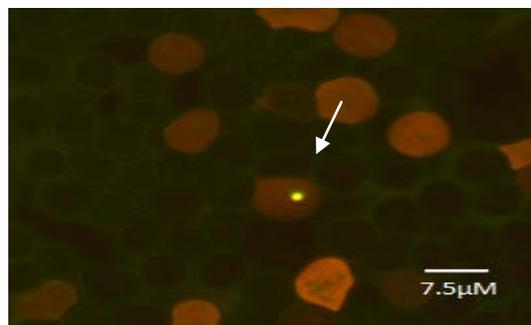
Durante la maduración o diferenciación del linaje eritroide, se libera a la circulación un eritroblasto que se transforma en eritrocito policromático o reticulocito (eritrocito joven que todavía contiene RNA y se formó 24 horas antes de su liberación), en el que el núcleo

principal es expulsado, contrario a cualquier micronúcleo que se ha formado ya que éste permanece en el citoplasma lo que facilita su visualización (Krishna y Hayashi, 2000) (Figura 7).



**Figura 7.** Modelo de formación de micronúcleos en eritrocitos de la médula ósea por efectos clastogénicos (rompimientos) y por aneuploidogénicos (fallas en el aparato mitótico). Modificado de Krishna y Hayashi 2000.

Por lo tanto, un aumento en la frecuencia de reticulocitos micronucleados es una indicación de daño cromosómico inducido por agentes clastógenos o aneuploidogénicos (Schmid 1975, Krishna y Hayashi 2000). Con base en lo anterior, el ensayo de micronúcleos con naranja de acridina confiere una fluorocromización diferencial ya que tiñe de color amarillo-verde limón el DNA y naranja el RNA (Krishna y Hayashi, 2000) (Figura 8).



**Figura 8.** Muestra un reticulocito con un micronúcleo (flecha blanca). (Fotos originales. Tomadas en el laboratorio de Morfología y Toxicología, Departamento de Biología Celular y Tisular, Facultad de Medicina, UNAM).

## 7. Justificación

Debido a la aparición y propagación de resistencia farmacológica a los diferentes medicamentos utilizados para tratar la malaria en zonas endémicas donde se concentran la mayor parte de casos y muertes, se ha incrementado el uso de terapias que combinan fármacos, éstos son poco asequibles y no se consiguen con facilidad. Por lo tanto, resulta primordial el desarrollo de nuevas alternativas de mayor eficacia, más asequibles y que presenten baja o nula toxicidad, para que puedan continuar en investigación.

## 8. Hipótesis

Si el metavanadato de sodio tiene uso potencial como compuesto antimalárico, entonces se observará disminución de la parasitemia, aunado a que el efecto genotóxico producido será bajo y no intervendrá con su potencial antiparasitario.

## 9. Objetivos

### 9.1 Objetivo general

Evaluar el potencial antimalárico y el efecto genotóxico del metavanadato de sodio en un modelo murino.

### 9.2 Objetivos particulares

#### 9.2.1 Fase 1: curva dosis respuesta

En ratones machos de la cepa CD1:

- Determinar la dosis óptima de metavanadato de sodio mediante una curva dosis respuesta.
- Evaluar la citotoxicidad en leucocitos mediante viabilidad celular por fluorocromos y por la proporción de reticulocitos/ eritrocitos en frotis de sangre periférica con naranja de acridina.
- Determinar el efecto genotóxico y el tipo de daño *in vivo* mediante las técnicas de electroforesis celular alcalina en leucocitos y micronúcleos con naranja de acridina en reticulocitos.

#### 9.2.2 Fase 2: evaluación antimalárica y genotóxica (protocolo de 4 días)

- Evaluar la actividad antimalárica *in vivo* del metavanadato de sodio (5 y 10 mg/kg) frente a *Plasmodium yoelii yoelii* (Pyy) en ratones machos de la cepa CD1.
- Comparar las parasitemias de los ratones infectados.
- Evaluar la citotoxicidad en leucocitos mediante viabilidad celular por fluorocromos y por

la proporción de reticulocitos/ eritrocitos en frotis de sangre periférica con naranja de acridina.

-Determinar el efecto genotóxico y el tipo de daño *in vivo* mediante las técnicas de electroforesis celular alcalina en leucocitos y micronúcleos con naranja de acridina en reticulocitos.

-Comparar en el hígado las lesiones y la cantidad de hemozoína como consecuencia de una infección malárica.

### **9.2.3 Fase 3: sobrevida**

-Comparar la sobrevida de los grupos experimentales.

-Comparar las parasitemias de los ratones infectados.

-Evaluar la citotoxicidad en leucocitos mediante viabilidad celular por fluorocromos y por la proporción de reticulocitos/ eritrocitos en frotis de sangre periférica con naranja de acridina.

-Determinar el efecto genotóxico y el tipo de daño *in vivo* mediante las técnicas de electroforesis celular alcalina en leucocitos y micronúcleos con naranja de acridina en reticulocitos.

## **10. Metodología**

El método se llevará a cabo en 3 fases de acuerdo a los objetivos planteados en cada una de ellas.

### **10.1 Modelo experimental: ratón cepa CD1**

Este protocolo se realizó con la colaboración del Departamento de Biología Celular y Tisular y el Laboratorio de Malariología del Departamento de Microbiología y Parasitología de la Facultad de Medicina, UNAM, éste último se encargó del mantenimiento de la cepa de *Pyy* mediante la infección ratón-ratón y facilitó las alícuotas necesarias para realizar este protocolo.

Se emplearon ratones machos de la cepa CD1 de 30 a 35 g de peso provenientes del bioterio de la Facultad de Medicina, UNAM los cuales se dividieron en lotes de 5 ratones por jaula con alimento Rodent Laboratory Chow y agua *ad libitum*. El manejo y cuidado de los animales de laboratorio se realizó con base en los lineamientos de la Norma Oficial Mexicana (NOM-062-Z00-1999) y con los lineamientos institucionales. Este protocolo fue aprobado por las Comisiones de Investigación y Ética de la Facultad de Medicina, UNAM (dictamen de proyecto 090/2016).

## 10.2 Grupos experimentales

Se trabajaron los siguientes grupos experimentales con una n=10 cada uno:

Grupo 1: Testigo negativo sano

Grupo 2: Testigo positivo *Pyy* (animales infectados con el parásito).

Grupo 3: Metavanadato de sodio 5 mg/kg.

Grupo 4: Metavanadato de sodio 10 mg/kg.

Grupo 5: *Pyy* + metavanadato de sodio 5 mg/kg.

Grupo 6: *Pyy* + metavanadato de sodio 10 mg/kg.

Grupo 7: Testigo positivo de efecto genotóxico colcemid 10mL/kg.

**Cuadro 3.** Grupos en cada fase experimental.

| Fase experimental  | Fase experimental 1 | Fase experimental 2 | Fase experimental 3 |
|--------------------|---------------------|---------------------|---------------------|
| Grupo experimental | 1,3 y 4             | 1, 2, 5 y 6         | 1, 2, 4, 6 y 7      |

## 10.3 Parásitos

Se utilizó la cepa *Pyy* la cual es letal para los ratones (es cloroquina sensible), fue obtenida de la Escuela de Medicina Tropical de Londres y mantenida en pases sucesivos ratón-ratón.

### 10.3.1 Infección de ratones con cepa *Pyy*

La infección de los ratones se llevó a cabo de acuerdo con Rivera *et al.* (2013) con algunas modificaciones, los ratones se inocularon por vía intraperitoneal con la cepa *Pyy* administrando 0.25 mL de sangre infectada con  $3.3 \times 10^3$  parásitos.

## 10.4 Estrategias experimentales

### 10.4.1 Administración de los compuestos

La dosis de metavanadato de sodio (MV) se administró vía oral con una sonda orogástrica de acero inoxidable del número 18.

La administración de MV 5 ó 10 mg/kg se realizó de acuerdo al protocolo de supresión de 4 días de Peters y Robinson (1992) (Cuadro 4).

**Cuadro 4** Administración del metavanadato de sodio en los grupos tratados.

| <b>Grupo experimental</b>                                | <b>Administración</b>  |
|--|--|
| Grupo 3: Metavanadato de sodio 5 mg/kg.                  | 1 dosis cada 24 horas por 4 días   |
| Grupo 4: Metavanadato de sodio 10 mg/kg.                 | 1 dosis cada 24 horas por 4 días   |
| Grupo 5:<br><i>Pyy</i> + metavanadato de sodio 5 mg/kg.  | Primera dosis 4 horas después de haber infectado al ratón y las otras 3 cada 24 horas después de la primera administración |
| Grupo 6:<br><i>Pyy</i> + metavanadato de sodio 10 mg/kg. | Primera dosis 4 horas después de haber infectado al ratón y las otras 3 cada 24 horas después de la primera administración |

La administración de colcemid para el grupo testigo positivo de efecto genotóxico fue de 10 mL/kg la cual se estableció con base en el artículo de Scheneide *et al.*, (1995) y se realizó de forma aguda mediante una sonda orogástrica del número 18.

### 10.5 Toma de muestras y obtención de los hígados

Se tomaron muestras de sangre periférica de la vena caudal de los ratones la cual se procesó para realizar las siguientes técnicas: viabilidad celular por fluorocromos, ensayo cometa pH13, prueba de micronúcleos con naranja de acridina y evaluación de la parasitemia en frotis sanguíneo con naranja de acridina; en función de la fase experimental:

- a) En la fase 1 y 2: se tomaron muestras de acuerdo con el protocolo de supresión de Peters y Robinson (1992): en los tiempos 0 horas (antes de la infección y/o tratamiento), al día 1 (antes de la segunda administración), al día 2 (antes de la tercera administración), al día 3 (antes de la cuarta administración) y al día 4.
- b) En la Fase 3: se tomaron muestras diariamente desde el tiempo 0 horas hasta el último día de vida de los ratones (durante los primeros 4 días siguiendo el esquema antes descrito).

El hígado se obtuvo al quinto día post infección en todos los grupos experimentales de la fase 2.

### 10.6 Estrategias experimentales

#### 10.6.1 Viabilidad celular por fluorocromos en leucocitos

La técnica de viabilidad celular por fluorocromos se llevó a cabo de acuerdo a lo reportado por Strauss (1991) con algunas modificaciones. Se disolvieron 0.01 g de diacetato de fluoresceína (FDA) en 2 mL de acetona y 0.01 g de bromuro de etidio (BrEt) en 5 mL de

amortiguador de fosfatos (PBS). A continuación, se tomaron 15  $\mu$ L de FDA, 2.4 mL de PBS y 100  $\mu$ L de BrEt y se mezclaron.

Posteriormente, se tomaron 5  $\mu$ L de sangre entera y se mezclaron en proporción 1:1 con la solución FDA-PBS-BrEt y se observó en el microscopio de fluorescencia. Se contaron en campos al azar 100 células de las cuales se sacó la proporción de células vivas que emiten fluorescencia verde y células muertas que emiten fluorescencia roja.

### **10.6.2 Ensayo cometa pH13**

El ensayo cometa alcalino se llevó a cabo de acuerdo con Singh y colaboradores (1988) con algunas modificaciones.

Se tomaron 5  $\mu$ L de sangre entera de la vena caudal de un ratón y se mezclaron con 150  $\mu$ L de agarosa de bajo punto de fusión (APFB) al 0.5%, de este preparado se realizaron muestras por duplicado colocando 75  $\mu$ L en cada laminilla a la que previamente se le adicionó una capa de agarosa de punto de fusión normal (APFN) al 0.5%, una vez solidificado el gel, se colocó una tercera capa de APFB.

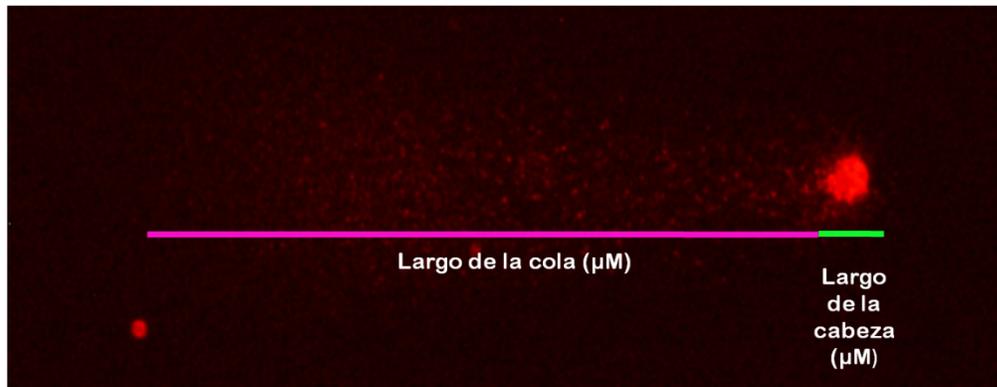
Las laminillas se colocaron en una solución de lisis (NaCl 2.5 M, Na<sub>2</sub> EDTA 100 mM, Tris 0.01 M, Tritón x-100 1% y DMSO 10%) donde permanecieron al menos 24 horas a 4°C.

En una cámara de electroforesis horizontal se colocaron las muestras embebidas en un amortiguador de corrida (NaOH 300 mM, Na<sub>2</sub> EDTA 1 mM, pH13) durante 20 minutos (tiempo de desenrollamiento del DNA) y posteriormente 20 minutos más para el corrimiento a 300 mA y 25 V.

Posteriormente, se realizaron lavados en una solución Tris pH 7.5 y al final se fijaron con etanol absoluto.

Para la evaluación de las muestras, se tiñeron con BrEt (0.02 mg/mL) y se observaron en el microscopio de fluorescencia. Para categorizar el daño se midió al azar la longitud de la cola de 200 nucleoides por muestra y de acuerdo con la longitud se clasificaron en 5 categorías: 1 (sin daño), 2 (daño bajo), 3 (daño medio), 4 (daño alto) y 5 (daño total), al final se calculó un índice de migración (IMG) de acuerdo con Rodríguez Mercado *et al.* (2011) el cuál fue considerado para la interpretación de los resultados.

Además, una vez obtenidas las categorías de los 200 cometas contados, se obtuvo el porcentaje de cada una de ellas.

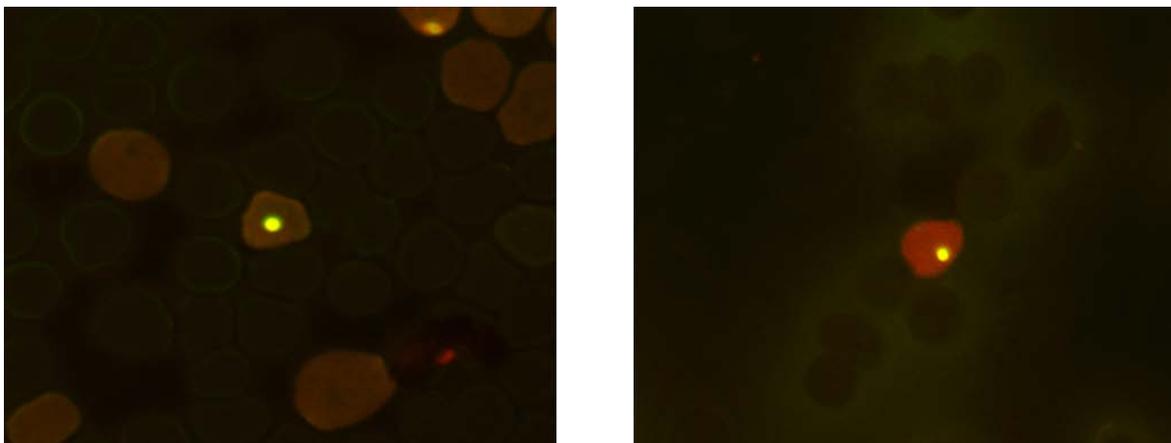


**Figura 9.** Resultados del ensayo cometa pH13 en leucocitos de ratón. Para la evaluación del índice de migración se categorizó el daño con base en la longitud de la cola.  
(Fotos originales. Tomadas en el laboratorio de Morfología y Toxicología Departamento de Biología Celular y Tisular, Facultad de Medicina UNAM).

### 10.6.3 Ensayo de micronúcleos con naranja de acridina y evaluación de citotoxicidad en reticulocitos

La técnica se llevó a cabo con base en Krishna y Hayashi (2000) con algunas modificaciones.

Se hizo un corte en la vena caudal del ratón y se realizó un frotis, posteriormente se fijó con metanol absoluto. La toma de muestras se realizó por duplicado. Para su evaluación se tiñeron con naranja de acridina (NA) (1 mg/mL) disuelta en agua destilada y a cada laminilla se le adicionaron 30  $\mu$ L y se observaron al microscopio de fluorescencia. Por cada laminilla se cuantificaron 2000 reticulocitos, el número de MN encontrados y se calculó la frecuencia de éstos en reticulocitos.



**Figura 10.** Resultado de la tinción de un frotis de sangre periférica de ratón para la identificación de micronúcleos. En color rojo se observan los reticulocitos (RNA) y de amarillo verde limón el DNA en los micronúcleos. (Fotos originales. Tomadas en el laboratorio de Morfología y Toxicología Departamento de Biología Celular y Tisular, Facultad de Medicina UNAM).

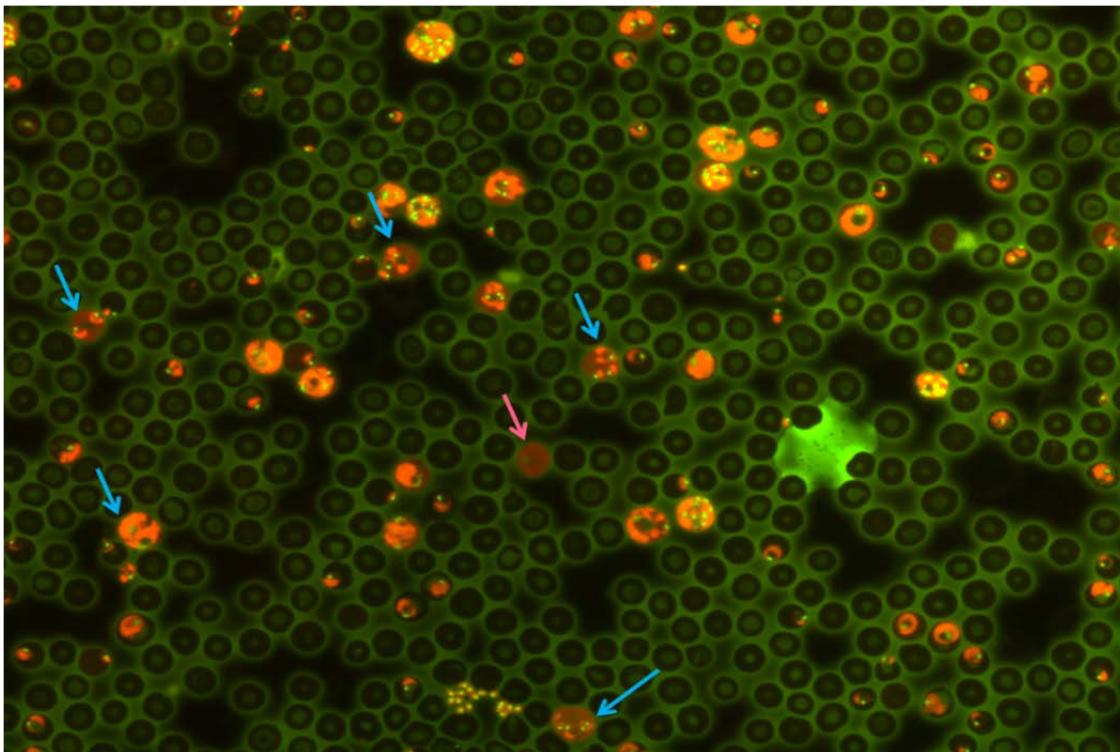
Para la evaluación de la toxicidad se cuantificó el número de reticulocitos por cada 1000 eritrocitos y al final se obtuvo un porcentaje.

#### 10.6.4 Evaluación de la parasitemia en frotis sanguíneo con naranja de acridina

La infección malárica se determinó a partir de frotis de sangre periférica de los ratones infectados, brevemente, se hizo un corte en la vena caudal del ratón, se procedió a realizar el frotis y éste se fijó con metanol absoluto. La toma de muestras se llevó a cabo por duplicado.

Para su evaluación se tiñeron con naranja de acridina (NA) (1 mg/mL) disuelta en agua destilada y a cada laminilla se le adicionaron 30  $\mu$ L y se observaron al microscopio de fluorescencia.

Se contaron eritrocitos sanos e infectados hasta completar 100 células, se calculó el porcentaje de eritrocitos parasitados (Rivera *et al.* 2013) y se identificaron los estadios anillo, trofozoíto y esquizonte, calculándose el porcentaje de cada uno de ellos (Figura 11).



**Figura 11.** Frotis de sangre periférica de ratón infectado con *Pyy* y teñido con naranja de acridina, las flechas azules marcan reticulocitos infectados y la flecha rosa un reticulocito sin infectar, se observa la tinción diferencial del RNA (citoplasma) del parásito rojo brillante y del RNA del reticulocito rojo opaco (Fotos originales. Tomadas en el laboratorio de Morfología y Toxicología Departamento de Biología Celular y Tisular, Facultad de Medicina UNAM).

### **10.6.5 Obtención de los hígados**

Al quinto día post infección se procedió al sacrificio de los ratones, se realizó por medio de una sobredosis intraperitoneal de pentobarbital sódico, los hígados se colectaron y se fijaron por inmersión en formol amortiguado al 10%.

Posteriormente, los hígados se procesaron con la técnica histológica convencional, se obtuvieron cortes, se tiñeron con hematoxilina y eosina (HE) y se observaron al microscopio de campo claro.

### **10.7 Análisis estadístico**

Los datos fueron analizados mediante el programa GraphPad Prism (versión 5.0). Para identificar diferencias entre los grupo se utilizó la prueba de ANOVA y *post hoc* Tukey.

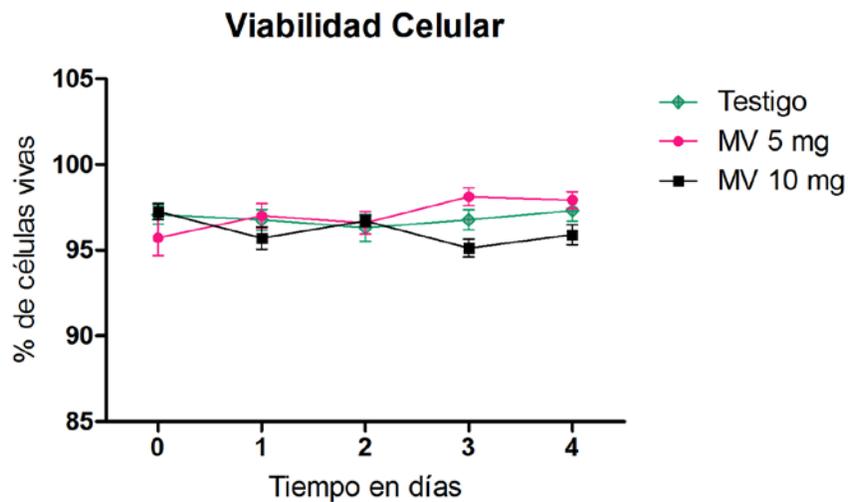
Los datos están reportados como media  $\pm$  error estándar y los valores de  $p < 0.05$  fueron considerados como estadísticamente significativos.

## 11. Resultados

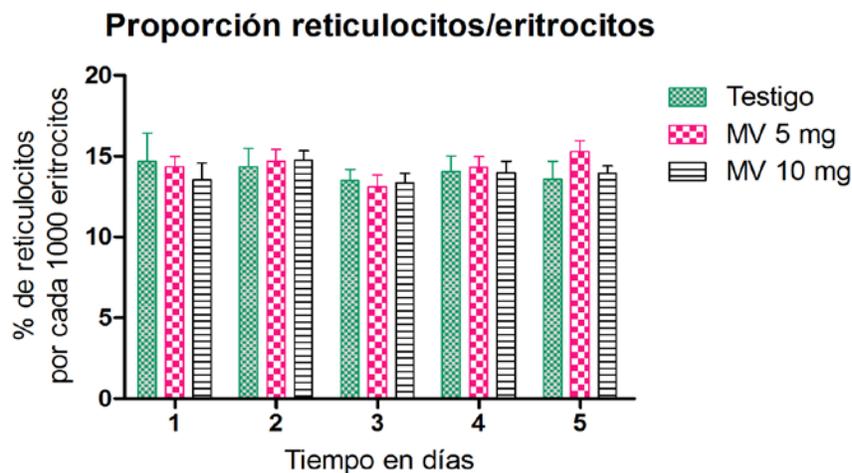
### 11.1 Fase 1: curva dosis respuesta

Para la evaluación de la citotoxicidad y genotoxicidad del metavanadato de sodio se probaron 2 dosis: 5 mg/kg y 10 mg/Kg, con las que se fabricó una curva para conocer el efecto de cada una de ellas respecto al grupo testigo y seleccionar la dosis que continuaría en evaluación en la fase 2.

**Citotoxicidad:** para la conocer la citotoxicidad del MV se realizó el ensayo de viabilidad celular por fluorocromos en leucocitos de ratón, en este no se detectó disminución del porcentaje de células vivas en ningún tiempo con las dosis de 5 mg y 10 mg comparadas con el grupo testigo y la viabilidad se mantuvo por arriba del 95% (Figura 12). Para conocer la citotoxicidad en los reticulocitos, se cuantificó el porcentaje de estos en 1000 eritrocitos y los resultados muestran que las dosis empleadas no causaron decremento del porcentaje con respecto del grupo testigo, ambas se mantuvieron cercanas al 15% (Figura 13).

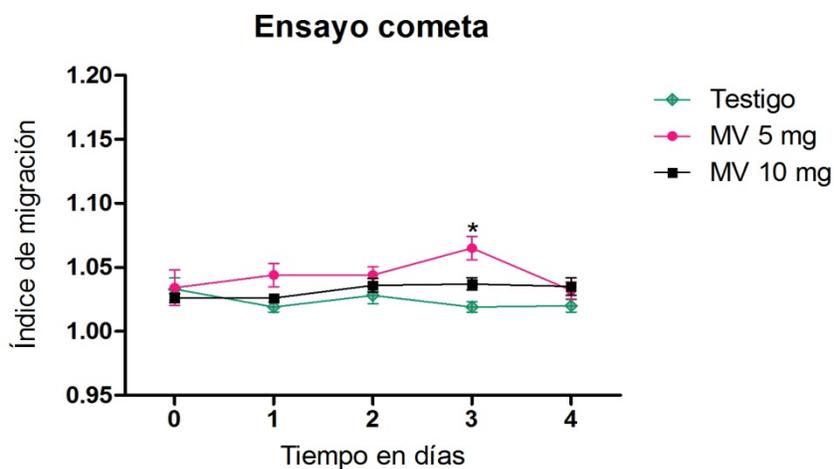


**Figura 12.** Efecto citotóxico del metavanadato de sodio en leucocitos de ratón, no se observó disminución de la viabilidad celular con las dosis de 5 mg y 10 mg con respecto al grupo testigo. ANOVA post-hoc Tukey  $p \leq 0.05$ .



**Figura 13.** Efecto citotóxico del metavanadato de sodio en reticulocitos de ratón, no se observó disminución de la viabilidad celular con las dosis de 5 mg y 10 mg con respecto al grupo testigo. ANOVA post-hoc Tukey  $p \leq 0.05$ .

**Ensayo cometa para la evaluación del índice de migración:** durante el experimento la dosis de 5 mg/kg de MV generó un aumento significativo en los rompimientos de DNA con respecto del grupo testigo en el día 3 y posteriormente en el día 4 éstos disminuyeron, la dosis de 10 mg/kg no causó rompimientos en el DNA con respecto al testigo durante los 4 días del experimento (Figura 14).



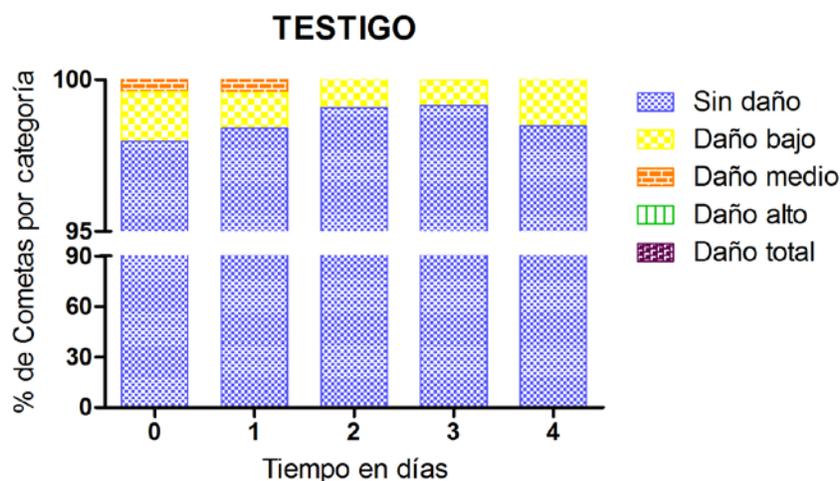
**Figura 14.** Evaluación del índice de migración del DNA de leucocitos de ratones tratados con 5 mg o 10mg de metavanadato de sodio. Se observó un aumento significativo con respecto al grupo testigo en el día 3 con la dosis de 5mg (\*), la dosis de 10mg no causó aumento del índice de migración. ANOVA post-hoc Tukey  $p \leq 0.05$ .

### Cuantificación del porcentaje de las categorías que conforman el índice de migración:

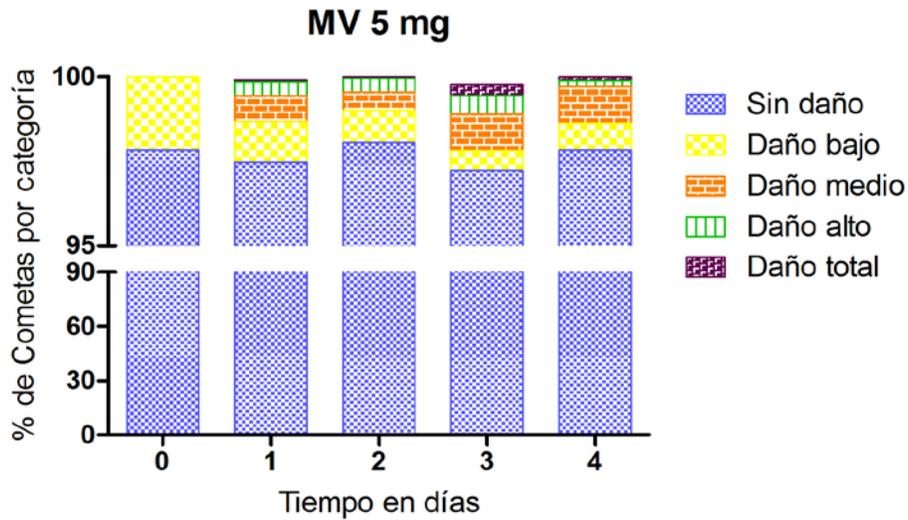
para cada índice de migración se cuantificaron los cometas y se colocaron en una categoría dependiendo del daño al DNA que tenían, en estas gráficas se observa el porcentaje de cada una de las categorías de daño que forman cada índice de migración.

El grupo testigo no presentó aumento del índice de migración por lo que las barras solo denotan el daño basal de los leucocitos de los ratones, durante todo el experimento los cometas sin daño fueron el 97% del total de cometas cuantificados, el 2% restante lo ocupó la categoría 2 que son cometas con daño bajo y el 1% observado fue formado por cometas con daño medio (Figura 15).

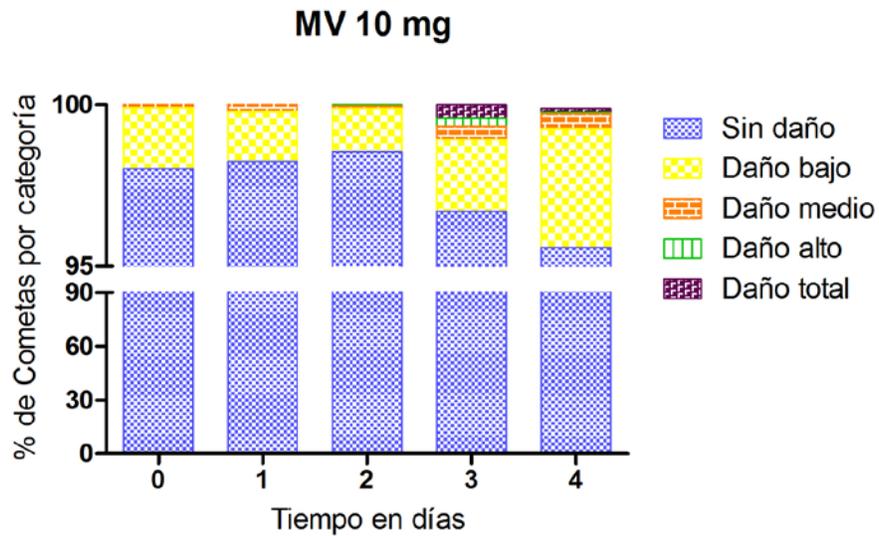
La dosis de 5 mg de MV no causó daño al DNA de los cometas cuantificados y mantuvo por arriba del 95% esta categoría, sin embargo, durante el día 3 aumentó significativamente el índice de migración, por lo que hubo rompimientos de DNA y se observó un aumento de las categorías de daño bajo con un porcentaje de 0.57, daño medio con 1.08%, daño alto 0.53% y daño total 0.33% (Figura 16). La dosis de 10 mg empleada, no registró daño en el DNA y los cometas sin daño se mantuvieron por arriba del 95% (Figura 17).



**Figura 15.** Cuantificación del porcentaje de cometas por categoría, en el grupo testigo el 97% de los cometas cuantificados se encontraron sin daño, el porcentaje restante hace referencia al daño basal del DNA a lo largo del tiempo.

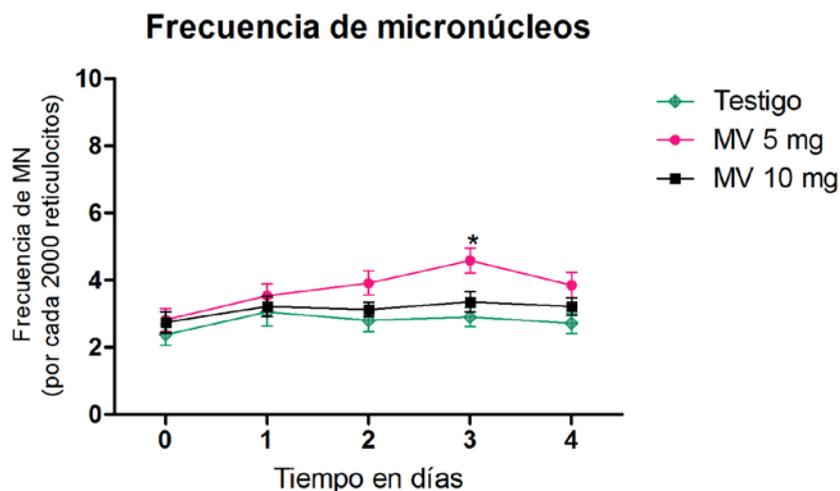


**Figura 16.** Cuantificación del porcentaje de cometas por categoría, en el grupo tratado con 5 mg de metavanadato de sodio a lo largo del experimento mantuvo por arriba del 95% los cometas sin daño, sin embargo, en el día 3 se observó un daño mayor.



**Figura 17.** Cuantificación del porcentaje de cometas por categoría, en el grupo administrado con 10 mg de metavanadato de sodio el porcentaje de cometas sin daño se encontró por arriba del 95% a lo largo del experimento, se observó un ligero aumento en las categorías con daño en los días 3 y 4.

**Frecuencia de micronúcleos (MN):** en los ratones tratados con 5 mg de MV solamente se observó un aumento en la frecuencia de MN estadísticamente significativo en el día 3 con respecto del grupo testigo, por otra parte la dosis de 10 mg de MV no causó aumento de MN en los reticulocitos de sangre periférica (Figura 18).



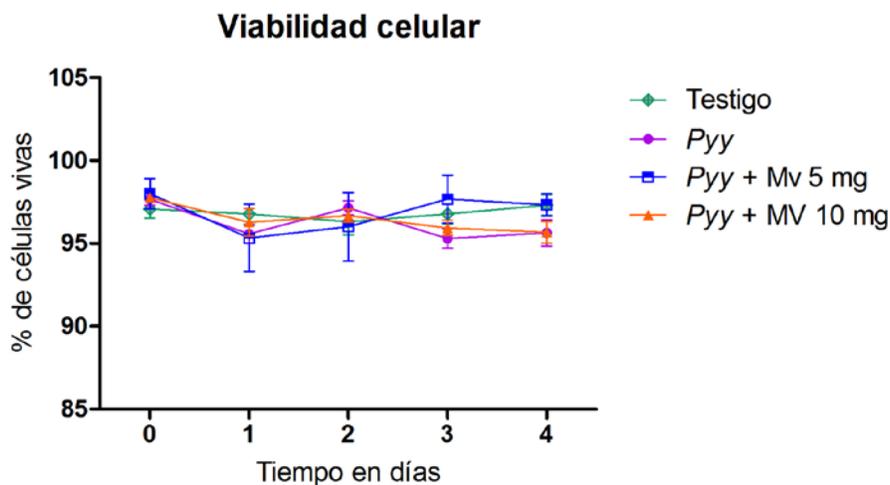
**Figura 18.** Evaluación de la frecuencia de micronúcleos en reticulocitos de sangre periférica de ratones tratados con diferentes dosis de metavanadato de sodio. Con la dosis de 5 mg se observaron diferencias estadísticamente significativas en el día 3 con respecto del grupo testigo (\*), la dosis de 10 mg no generó aumento en la frecuencia de micronúcleos.

ANOVA post-hoc Tukey  $p \leq 0.05$ .

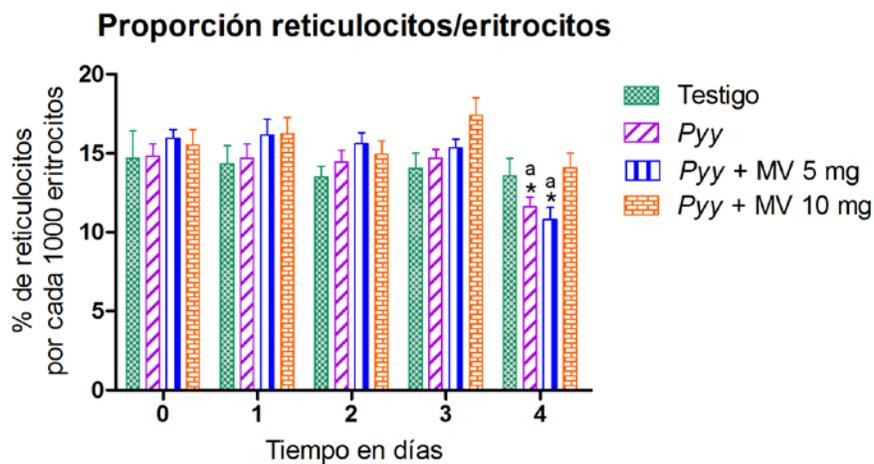
## 11.2 Fase 2: evaluación antimalárica y genotóxica (protocolo de 4 días)

Con base en los resultados obtenidos en la fase 1, se decidió realizar las pruebas con cada una de las dosis de metavanadato de sodio en ratones infectados con *Plasmodium yoelii yoeli* (Pyy).

**Efecto citotóxico:** los resultados de la citotoxicidad medida en leucocitos, en los grupos: Testigo, Pyy, Pyy +MV 5 mg, Pyy + MV 10 mg no presentaron disminución del porcentaje de células vivas y se mantuvieron por arriba del 95% a lo largo del experimento (Figura 19). Los resultados de la medición en la proporción reticulocitos/eritrocitos, evidenciaron una disminución significativa en el día 4 en los grupos infectado (Pyy) y el grupo infectado y tratado con 5 mg de MV con respecto del grupo testigo y el grupo infectado y tratado con 10 mg de MV, asimismo este último grupo no tuvo disminución significativa de reticulocitos (Figura 20).

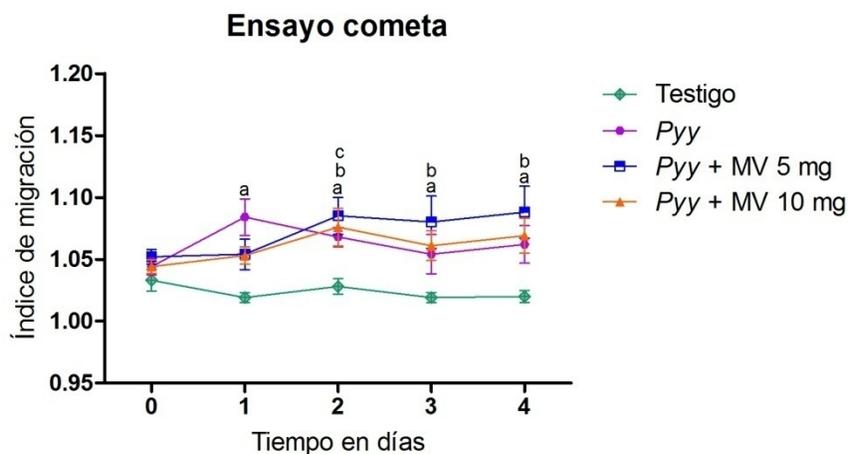


**Figura 19.** Evaluación de la citotoxicidad medida en leucocitos de sangre periférica de ratones testigo, ratones infectados con *Plasmodium yoelii yoelii* sin tratamiento y tratados con 5 mg o 10 mg de metavanadato de sodio, todos los grupos anteriores no presentaron disminución significativa del porcentaje de células vivas a lo largo del experimento. ANOVA post-hoc Tukey  $p \leq 0.05$ .



**Figura 20.** Evaluación de la citotoxicidad del metavanadato de sodio en reticulocitos de sangre periférica de ratones. El grupo infectado con *Plasmodium yoelii yoelii* y el grupo infectado y tratado con 5mg de MV disminuyeron significativamente el porcentaje de reticulocitos con respecto del grupo testigo (\*) y el grupo infectado y tratado con 10mg (a) este último no tuvo una disminución en el porcentaje. ANOVA post-hoc Tukey  $p \leq 0.05$ .

**Ensayo cometa para la evaluación del índice de migración:** durante esta fase del experimento se observó un aumento significativo del índice de migración en los leucocitos de los ratones infectados con *Pyy* desde el día 1 y hasta el día 4, el infectado y tratado con 5 mg de MV a partir del día 2 y hasta el final del experimento y el grupo infectado y tratado con 10 mg sólo en el día 2 con respecto del grupo testigo (Figura 21).



**Figura 21.** Evaluación del índice de migración en leucocitos de sangre periférica de ratones con diferentes tratamientos: el grupo infectado con *Plasmodium yoelii yoelii* aumentó significativamente los rompimientos de DNA desde el día 1 al día 4 (a), el grupo infectado y tratado con 5 mg de MV a partir del día 2 y hasta el día 4 (b) y el grupo infectado y tratado con 10 mg de MV solamente en el día 2 (c), respecto del grupo testigo. ANOVA post-hoc Tukey  $p \leq 0.05$ .

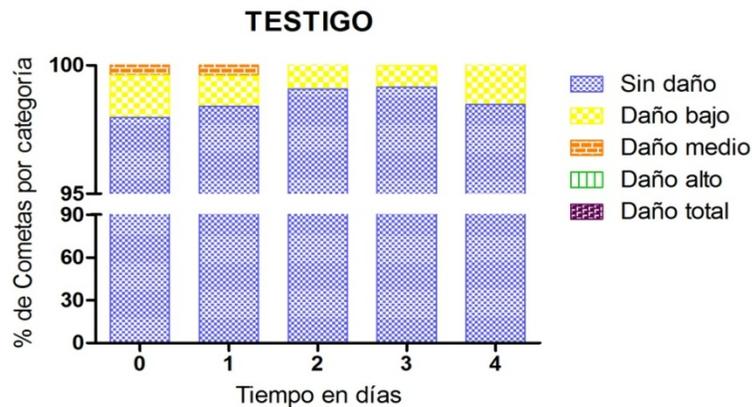
**Cuantificación del porcentaje de las categorías que conforman el índice de migración:** para cada índice de migración se cuantificaron los cometas y se colocaron en una categoría dependiendo del daño al DNA que tenían y se graficaron los porcentajes.

En el grupo infectado con *Plasmodium yoelii yoelii* tuvo un 95% de células vivas durante los 4 días, pero en el 5% restante se observó un aumento de las categorías de daño: en el día 1 se cuantificaron cometas con daño bajo, medio alto y total con 2.7%, 0.97%, 0.48% y 0.49% respectivamente, en el día 3 y 4 el porcentaje de las categorías de daño tuvieron un decremento, sin embargo, este no fue significativo ya que el índice de migración fue mayor con respecto al grupo testigo. (Figura 23).

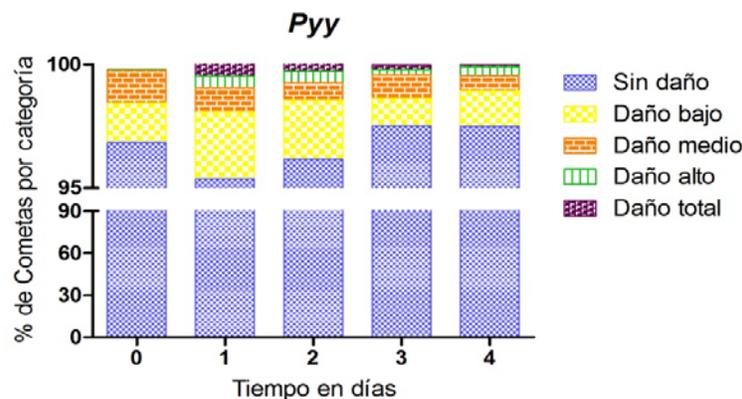
El grupo infectado y tratado con 5 mg de MV tuvo más del 95% de cometas sin daño, sin embargo, en el porcentaje restante se observó un aumento de las categorías con daño con respecto al tiempo: en el día 1 se cuantificaron 1.01% de cometas con daño bajo, 0.87% con daño medio y 0.3% con daño alto y al final del experimento las últimas 2

categorías incrementaron su porcentaje a 1.48% y 1.60% respectivamente, además se cuantificaron cometas con daño total con 0.36% (Figura 24).

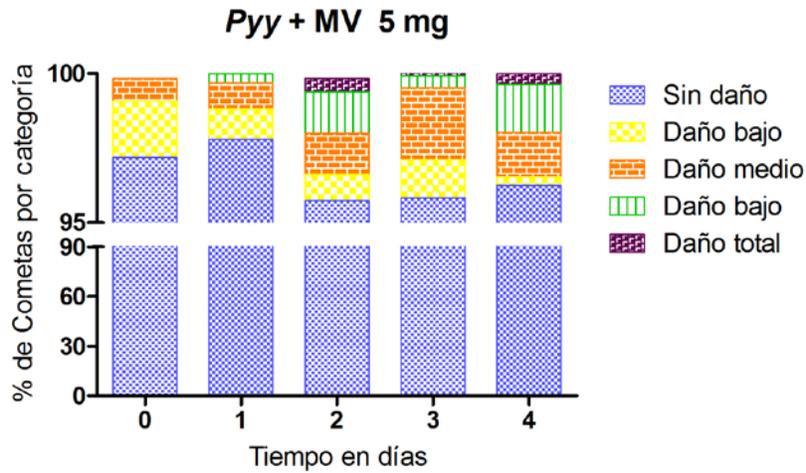
El grupo Pyy + 10 mg de MV, mantuvo por arriba del 95% los cometas sin daño, sin embargo, igual que los grupos anteriores aumentó las categorías de daño en el porcentaje restante, sin embargo, este aumento se mantuvo constante durante todo el experimento: en el día 1, 2.14% de cometas con daño bajo, 0.66% de daño medio, 0.49% de daño alto y 0.22% de daño total, en el último día se cuantificaron los porcentajes de: 2.1, 0.77, 0.35% y 0.21% respectivamente (Figura 25).



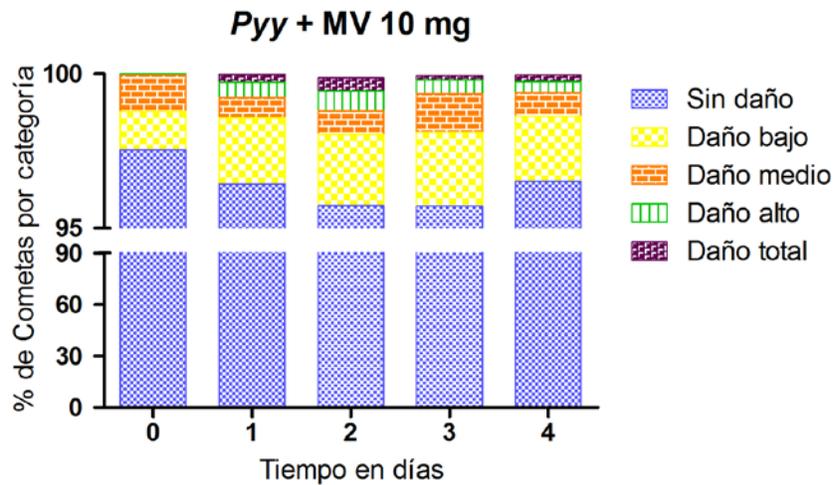
**Figura 22.** Cuantificación del porcentaje de cometas por categoría. En el grupo testigo el 97% de los cometas cuantificados se encontraron sin daño, el porcentaje restante hace referencia al daño basal del DNA a lo largo del tiempo.



**Figura 23.** Cuantificación del porcentaje de cometas por categoría. En el grupo infectado con *Plasmodium yoelii yoelii* el 95% de cometas cuantificados se encontraron sin daño, sin embargo, a partir del día 1 en el porcentaje restante se observaron todas categorías que contaban con daño al DNA

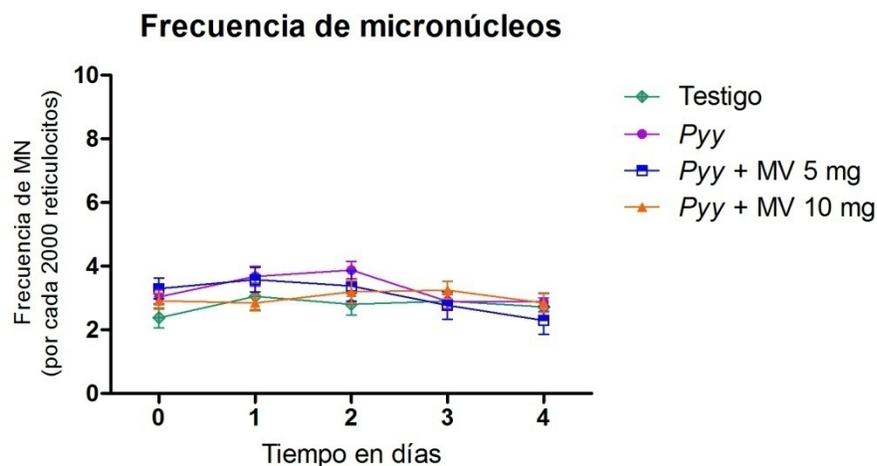


**Figura 24.** Cuantificación del porcentaje de cometas por categoría. En el grupo infectado con *Plasmodium yoelii yoelii* y tratado con 5 mg de metavanadato de sodio, el 96% de cometas cuantificados se encontraron sin daño, a partir de día 1 aumentó el porcentaje de categorías con daño, en el día 2 y hasta el día 4 se encontraban presentes todas las categorías que involucran daño al material genético.



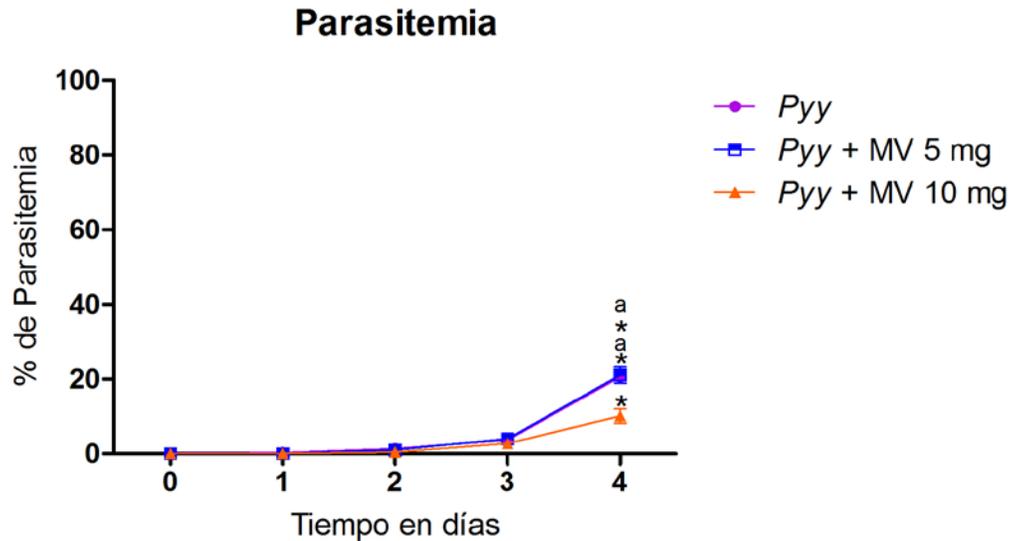
**Figura 25.** Cuantificación del porcentaje de cometas por categoría. En el grupo infectado con *Plasmodium yoelii yoelii* y tratado con 10 mg de metavanadato de sodio, el 96% de cometas cuantificados se encontraron sin daño, a partir de día 1 aumentó el porcentaje de categorías con daño y durante todo el experimento se encontraban presentes todas las categorías que involucran daño al material genético.

**Frecuencia de micronúcleos (MN):** en ratones infectados con *Pyy*, infectados y tratados con 5 o 10mg de MV no se observó un aumento significativo de la frecuencia de micronúcleos evaluados en reticulocitos de sangre periférica con respecto el grupo testigo (Figura 26).



**Figura 26.** Evaluación de la frecuencia de micronúcleos en reticulocitos de sangre periférica en ratones infectados con *Plasmodium yoelii yoelii* e infectados y tratados con 5 ó 10 mg de metavanadato de sodio, ninguno de los grupos tuvo un aumento de micronúcleos significativo durante todo el experimento. ANOVA post-hoc Tukey  $p \leq 0.05$ .

**Evaluación de las parasitemias:** en los ratones infectados con *Plasmodium yoelii yoelii* se observó un aumento de la parasitemia con respecto al tiempo, donde al final del experimento se cuantificó 21% de células con parásitos. En el grupo infectado y tratado con 5 mg de MV se observó la misma cinética del incremento de parasitemia y al final del experimento los ratones tenían también 21% de células infectadas. En el grupo infectado y tratado con 10 mg de MV aumentó la parasitemia con respecto al tiempo pero en menor porcentaje ya que al final del experimento los ratones tenían 10% de células infectadas. Al realizarla prueba estadística se observó un aumento significativo en los dos primeros grupos respecto el grupo infectado y tratado con 10 mg de MV (Figura 27).

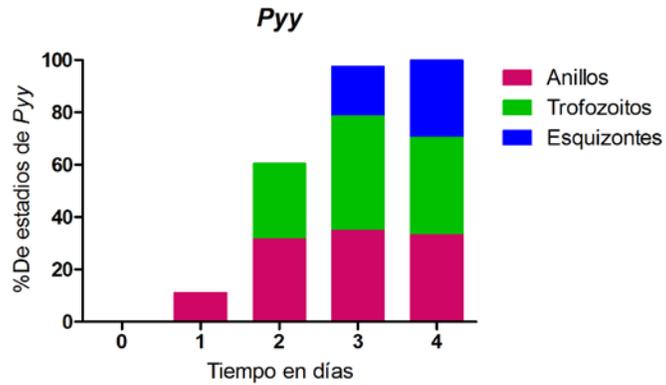


**Figura 27.** Evaluación de la parasitemia en ratones infectados con *Plasmodium yoelii yoelii* e infectados y tratados con 5 ó 10 mg de metavanadato de sodio. Los tres grupos aumentaron la parasitemia significativamente con respecto al tiempo (\*), además el incremento del porcentaje de células parasitadas en el día 4 del grupo infectado y no tratado así como el infectado y tratado con 5 mg de MV fue significativamente mayor con respecto al grupo infectado y tratado con 10 mg de MV (a). ANOVA post-hoc Tukey  $p \leq 0.05$ .

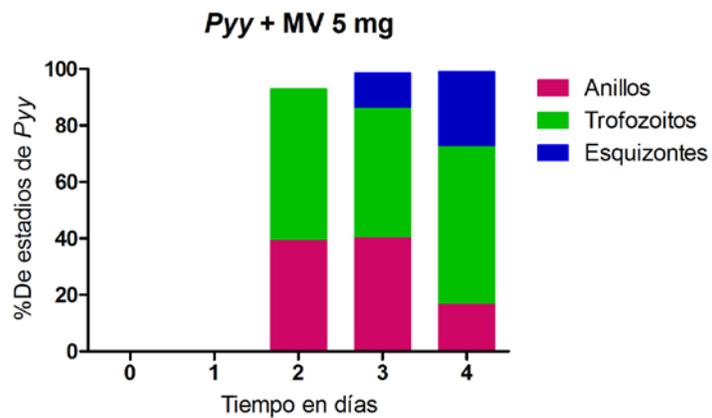
**Porcentaje de los estadios de Pyy:** para la evaluación de la parasitemia se contabilizaron las células que se encontraban parasitadas y de éstas el estadio de maduración de *Plasmodium yoelii yoelii*. En el grupo no tratado se encontraron parásitos desde el día 1 en el primer estadio (anillo), en el día 2 el primer estadio y el segundo conocido como esquizonte y en los días 3 y 4 los tres estadios parasitarios anillos, trofozoítos y esquizontes (Figura 28).

En el grupo infectado y tratado con 5 mg de MV, se observaron parásitos en el día 2 y estos correspondían a los estadios de anillo y trofozoito y en los días posteriores los tres estadios del parásito anillos, trofozoítos y esquizontes (Figura 29).

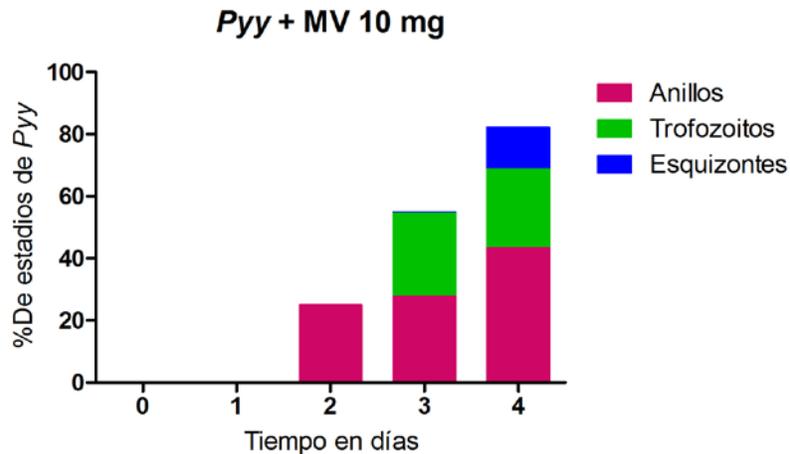
El grupo Pyy y tratado con 10 mg de MV, presentó parásitos hasta el día dos y solamente se encontraba el estadio de anillo, en el día 3 las células se encontraban parasitadas por anillos y trofozoitos y en el día 4 se encontraban los 3 estadios de maduración de Pyy en la muestra (anillos, trofozoítos y esquizontes) (Figura 30).



**Figura 28.** Desarrollo del ciclo de vida de *Plasmodium yoelii yoelii* en glóbulos rojos de ratones infectados. En el día 1 se observó el primer estadio anillos, en el día 2 anillos y segundo estadio trofozoítos, en los días 3 y 4 anillos, trofozoítos y tercer estadio esquizontes.



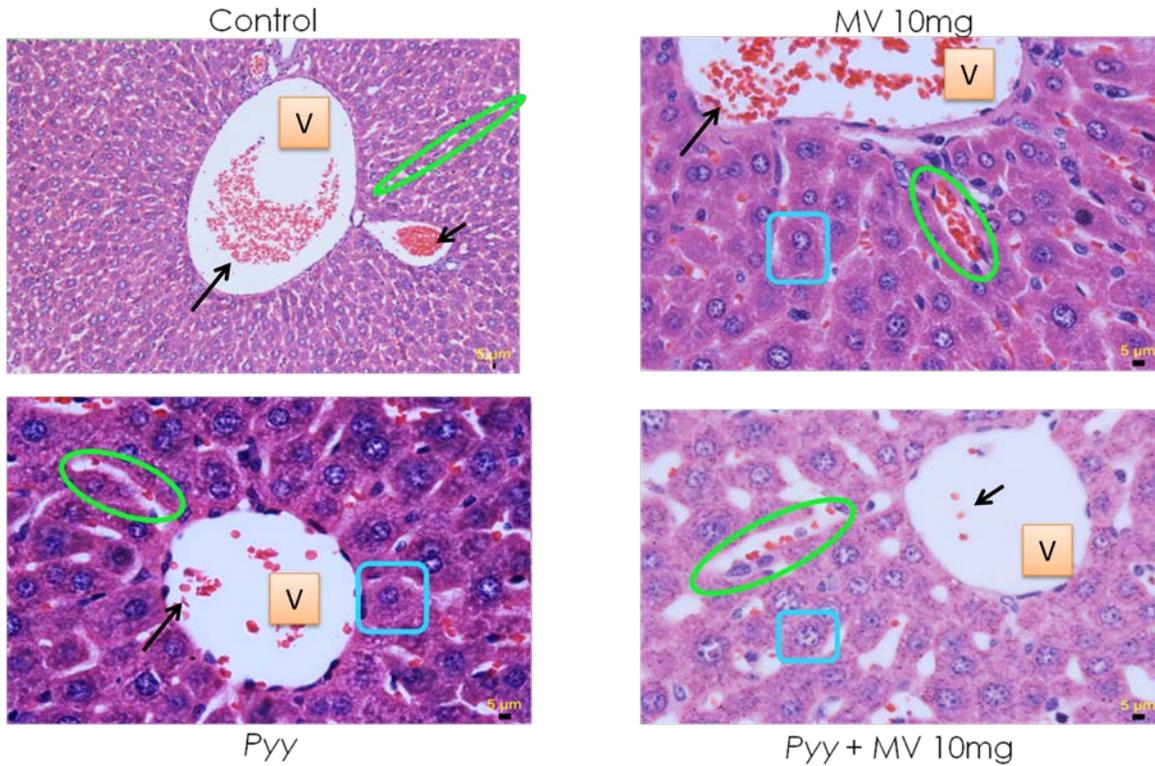
**Figura 29.** Desarrollo del ciclo de vida de *Plasmodium yoelii yoelii* en glóbulos rojos de ratones infectados y tratados con 5 mg de metavanadato de sodio. En el día 2 se observó la presencia de parásitos en estadios de anillos y trofozoítos, en los días 3 y 4 anillos, trofozoítos y tercer estadio esquizontes.



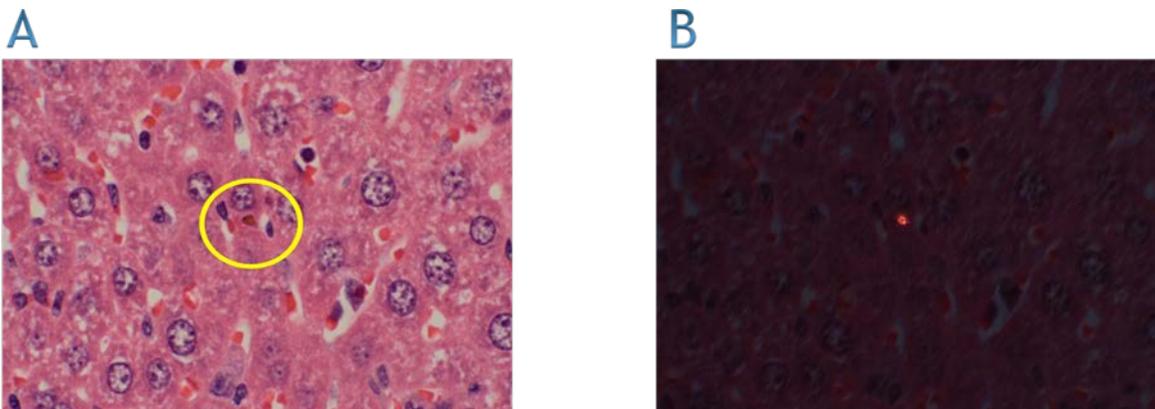
**Figura 30.** Desarrollo del ciclo de vida de *Plasmodium yoelii yoelii* en glóbulos rojos de ratones infectados y tratados con 10 mg de metavanadato de sodio. El primer estadio (anillos) se observó hasta el día 2, en el día 3 se observaron anillos y el segundo estadio trofozoitos y en el cuarto día del experimento se observaron que los tres estadios anillos, trofozoitos y esquizontes parasitaban los glóbulos rojos.

**Observación de cambios histológicos y hemozoína en hígado:** no se observaron cambios histológicos en los hígados de los ratones testigo, administrados con 10 mg de MV, infectados y los infectados y tratados con 10 mg de MV (Figura 31).

Para la determinación de hemozoína se observaron los hígados en microscopia de campo claro y de luz polarizada, se observó 1 cristal de hemozoína en un ratón infectado con *Plasmodium yoelii yoelii* (Figura 32).



**Figura 31.** Microfotografías de hígados de ratones CD1 con distintos tratamientos teñidos con H-E, no se observaron cambios histológicos en los grupos. V: vaso sanguíneo, Circulo verde: capilar sinusoide, Cuadro azul: hepatocito y Flecha negra: eritrocitos. (Fotos originales. Tomadas en el laboratorio de Morfología y Toxicología Departamento de Biología Celular y Tisular, Facultad de Medicina, UNAM).

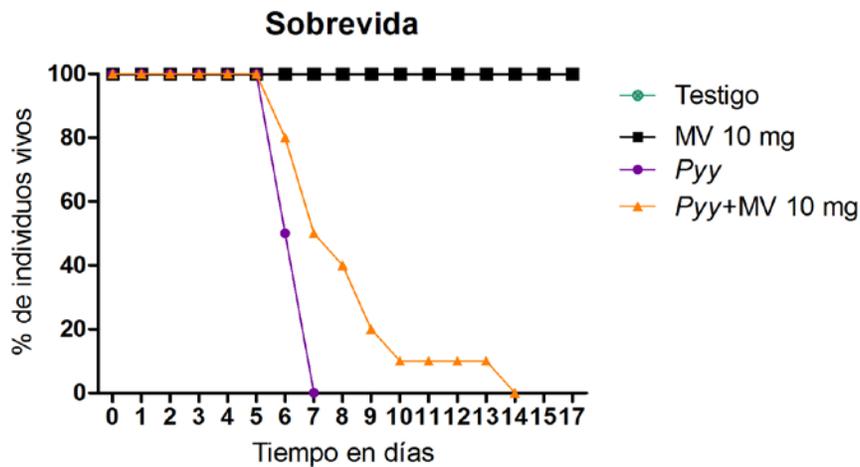


**Figura 32.** Microfotografías de hígado de ratón infectado con *Plasmodium yoelii yoelii* y sacrificado al día 5 día post infección. En A y B se observa el mismo corte de hígado. En la imagen A se observa un cristal de hemozoína (círculo amarillo) y en la imagen B se observa ese mismo cristal con microscopía de luz polarizada, ,(Fotos originales. Tomadas en el laboratorio de Morfología y Toxicología Departamento de Biología Celular y Tisular, Facultad de Medicina, UNAM).

### 11.3 Fase 3: sobrevida

Con base en los resultados obtenidos durante la fase 2 se decidió que para esta etapa del proyecto se utilizara la dosis de 10 mg de MV para tratar a los ratones infectados con *Pyy*, dado que fue la que mostró mejores resultados.

**Sobrevida de los ratones:** Durante esta fase se contabilizaron los días que vivieron los ratones de todos los grupos experimentales, donde: los individuos de los grupos testigo y a los que se les administró 10 mg de MV vivieron durante todo el experimento, los del grupo no tratado (*Pyy*) murieron 50% en el día 6 y el otro 50% en el día 7, los del grupo infectado y tratado con 10 mg de MV murieron paulatinamente y el 10% sobrevivió hasta el día 14 (Fig. 33).



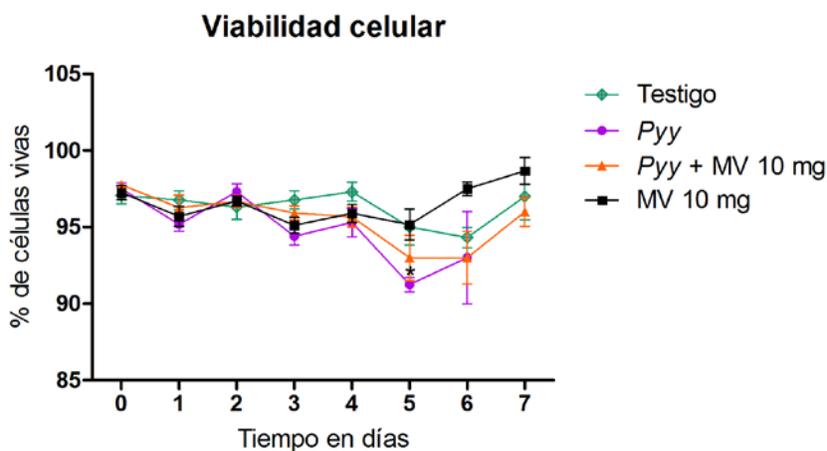
**Figura 33.** Sobrevida de los ratones de los grupos experimentales. Los grupos testigo y los que recibieron 10 mg de MV sobrevivieron durante todo el experimento, los ratones infectados con *Plasmodium yoelii yoelii* sobrevivieron hasta el día 7, los infectados y tratados con 10 mg de metavanadato de sodio murieron paulatinamente y el 10% sobrevivió hasta el día 14.

**Efecto citotóxico:** para conocer este efecto se realizaron dos ensayos en diferentes tipos celulares, en el ensayo de viabilidad celular por fluorocromos llevada a cabo en leucocitos no se observó disminución del porcentaje de células vivas en ningún tiempo en todos los grupos experimentales todos se mantuvieron por arriba del 90% de células vivas (Fig. 34).

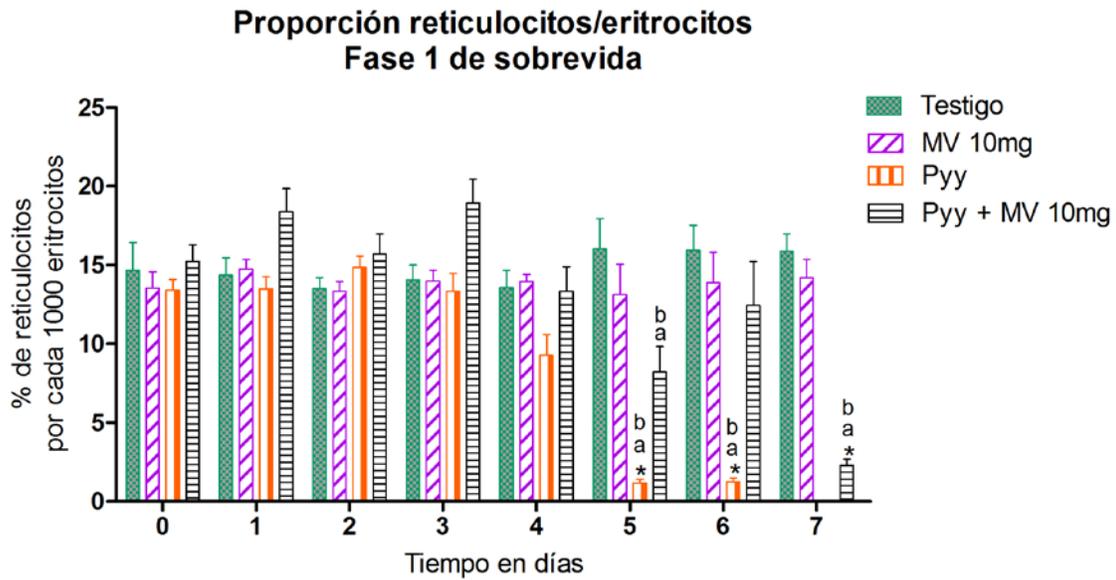
En cuanto a la citotoxicidad evaluada por la cuantificación de la proporción de reticulocitos/eritrocitos, esta se dividió en 2 fases para la representación gráfica, la fase 1 que abarca del día 0 al día 7 y la fase 2 que contempla del día 7 al día 14. En la fase 1 se observó una disminución de reticulocitos en los días 5 y 6 en el grupo *Pyy* con respecto a los días 0, 1, 2, 3 y 4 de éste mismo, además esta disminución también fue

significativa respecto al grupo testigo y al grupo tratado con 10 mg de MV. En el grupo *Pyy* + MV 10 mg en los días 5 y 7 disminuyó la proporción de los reticulocitos significativamente con respecto a los tiempos 0, 1, 2, 3 y 4 de éste mismo, y respecto al grupo testigo y al grupo tratado con MV 10 mg (Figura 35).

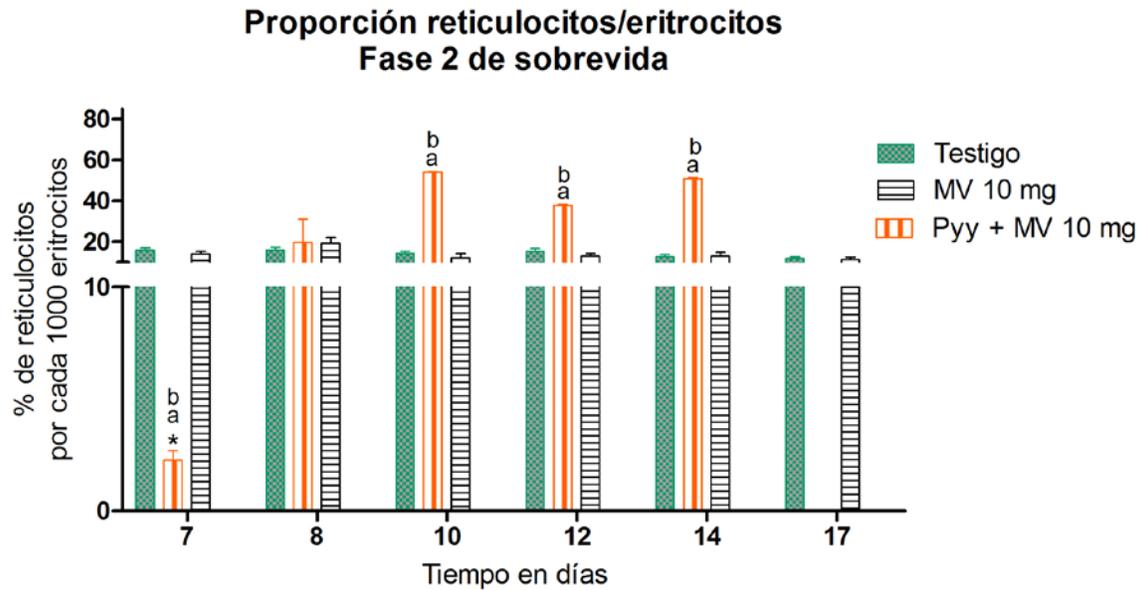
En la fase 2 de sobrevida, en el día 7 el grupo *Pyy* + MV 10 mg disminuyó significativamente la proporción con respecto a los tiempos 8, 10, 12 y 14, en el tiempo 8 se observó una recuperación de la viabilidad por lo que no hubo diferencias significativas con respecto al grupo testigo ni con el que recibió 10 mg de MV, además se observó un incremento significativo de la proporción reticulocitos/eritrocitos en los días 10, 12 y 14 con respecto a los grupos testigo y al tratado con 10 mg de MV (Figura 36).



**Figura 34.** Evaluación del efecto citotóxico del metavanadato de sodio en leucocitos de ratón con la técnica de viabilidad celular por fluorocromos. No se observó disminución significativa en la viabilidad celular en todos los grupos experimentales, con excepción de los ratones infectados con *Plasmodium yoelii yoelii* en el día 5 con respecto al grupo testigo (\*). ANOVA post-hoc Tukey  $p \leq 0.05$ .

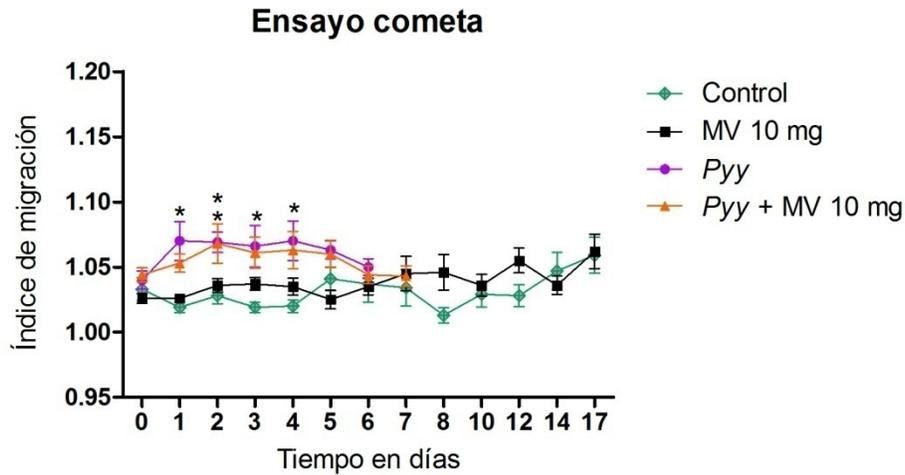


**Figura 35.** Evaluación del efecto citotóxico evaluado por medio de la cuantificación de la proporción reticulocitos/eritrocitos. No se observó disminución significativa en los ratones administrados con 10 mg de metavanadato de sodio, el grupo infectado con *Plasmodium yoelii yoelii* tuvo un decremento en los días 5 y 6 con respecto a los días anteriores (\*), a los grupos testigo (a) y 10 mg de metavanadato de sodio (b). En el grupo infectado con *Plasmodium yoelii yoelii* y tratado con 10 mg de MV se observó una disminución significativa en los días 5 y 7 con respecto a los grupos testigo (a) y 10 mg de metavanadato de sodio (b), además el día 7 fue estadísticamente diferente con respecto a los días previos (\*). ANOVA post-hoc Tukey  $p \leq 0.05$ .



**Figura 36.** Evaluación del efecto citotóxico por medio de la cuantificación de la proporción reticulocitos/eritrocitos, en el grupo infectado con *Plasmodium yoelii yoelii* y tratado con 10 mg de MV se observó una disminución significativa en el día 7 con respecto a los grupos testigo (a) y metavanadato 10 mg (b), los días 10, 12 y 14 son diferentes con respecto al grupo testigo (a) y al grupo MV 10 mg (b). ANOVA post-hoc Tukey  $p \leq 0.05$ .

**Ensayo cometa para la evaluación del índice de migración:** durante la evaluación se observó que los grupos testigo y el que recibió 10 mg de MV no aumentaron el índice de migración en ningún día del experimento, mientras que en los ratones del grupo Pyy se observaron los mismos rompimientos generados durante los 4 días del experimento en la fase 2 y en el grupo Pyy + 10 mg de MV solamente el aumento generado en el día 2, sin embargo, en los días posteriores se registró un el decremento (Figura 37).

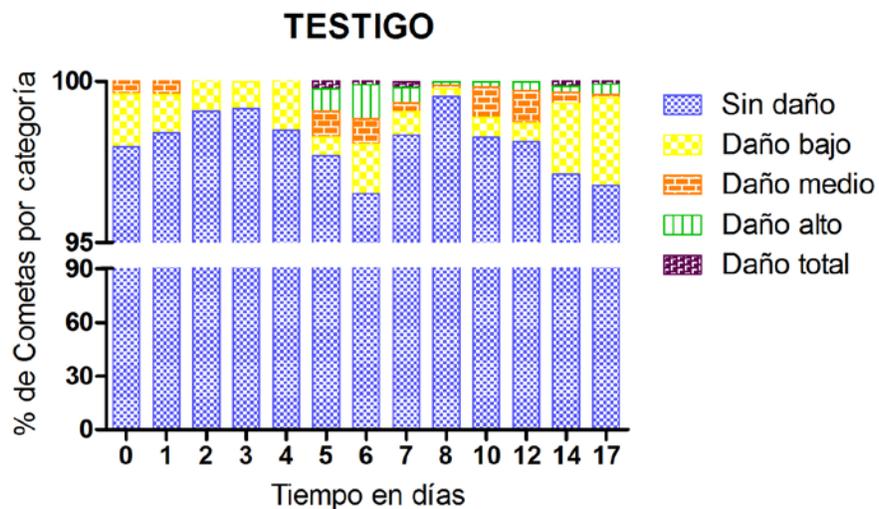


**Figura 37.** Evaluación del índice de migración en leucocitos de ratones CD1. Los grupos testigo y el grupo tratado con 10 mg de metavanadato de sodio no presentaron incremento en el rompimiento del DNA. En los ratones infectados con *Plasmodium yoelii yoelii* se incrementaron significativamente los rompimientos desde el día 1 al 4 con respecto de los grupos testigo y 10 mg de metavanadato de sodio (\*), de igual forma el grupo infectado y tratado con 10 mg de metavanadato de sodio aumentó los rompimientos pero solo en el día 2 (\*). ANOVA post-hoc Tukey  $p \leq 0.05$ .

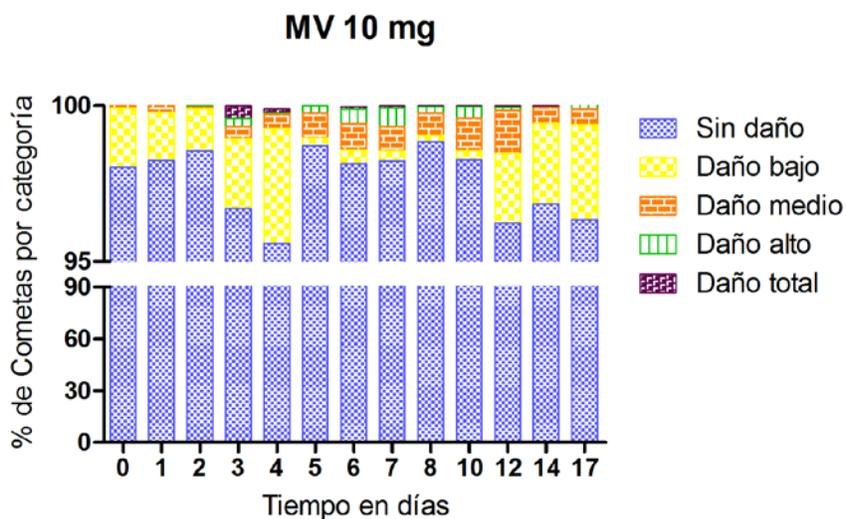
**Cuantificación del porcentaje de las categorías que conforman el índice de migración:** para cada índice de migración se cuantificaron los cometas y se colocaron en una categoría dependiendo del daño al DNA que tenían y se graficaron los porcentajes.

En el grupo al que se le administró 10 mg de MV, se observó que durante todos los días del experimento (17) el porcentaje de cometas sin daño fue por arriba del 95%, se observaron ligeras fluctuaciones de las categorías con daño al DNA que fueron semejantes al grupo testigo (Figura 38).

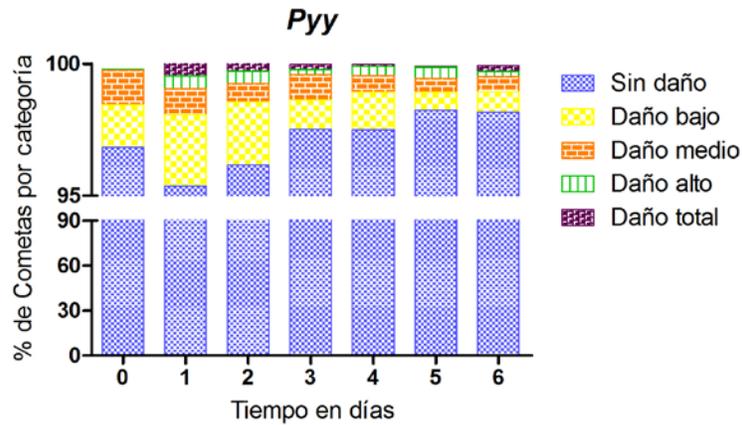
En el grupo infectado con *Pyy* y *Pyy*+ 10 mg de MV se observó la misma cinética de daño en los cometas, ambos grupos mantuvieron por arriba del 95% los cometas cuantificados sin daño, sin embargo, difieren en que en el grupo no tratado las categorías de daño tenían un porcentaje mayor en comparación con el grupo tratado (Figuras 39 y 40).



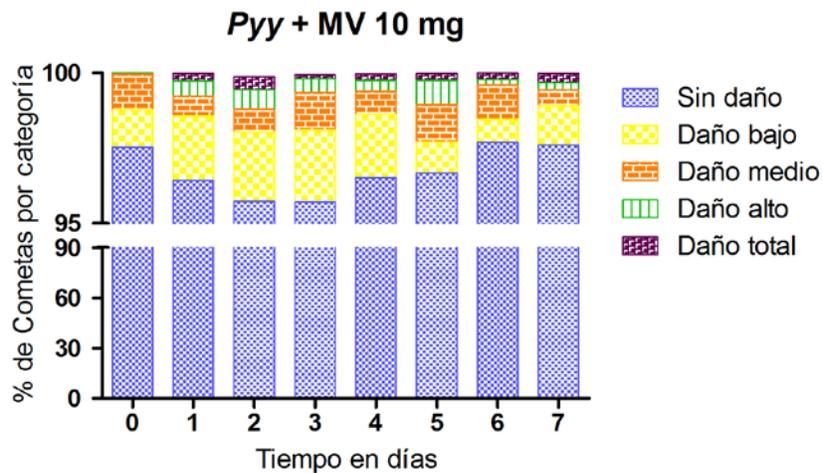
**Figura 37.** Cuantificación del porcentaje de cometas por categoría. En el grupo testigo el 97% de los cometas cuantificados se encontraron sin daño, el porcentaje restante hace referencia al daño basal del DNA a lo largo del tiempo.



**Figura 38.** Cuantificación del porcentaje de cometas por categoría. En el grupo administrado con 10 mg de metavanadato de sodio el 95% de los cometas cuantificados se encontraron sin daño, el porcentaje restante tuvo ligeras fluctuaciones en el daño al DNA.



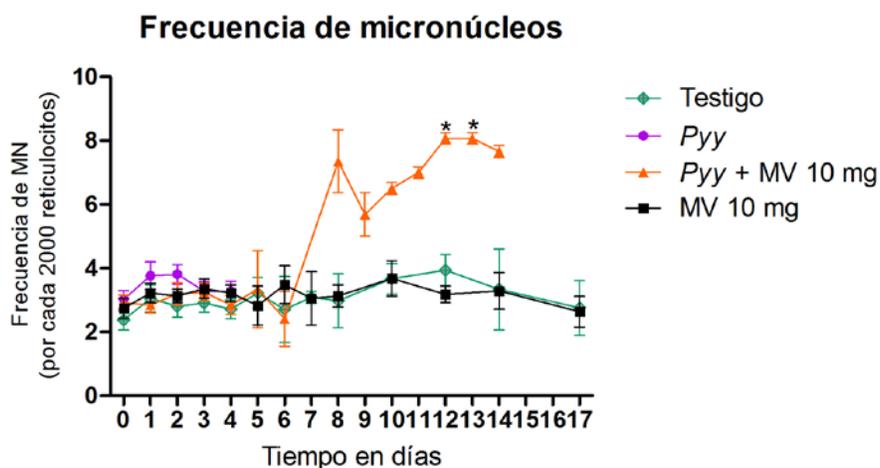
**Figura 39.** Cuantificación del porcentaje de cometas por categoría. En el grupo infectado con *Plasmodium yoelii yoelii* el 95% de los cometas cuantificados se encontraron sin daño, el porcentaje restante tuvo ligeras fluctuaciones en el daño al DNA.



**Figura 40.** Cuantificación del porcentaje de cometas por categoría, en el grupo infectado con *Plasmodium yoelii yoelii* y tratado con 10 mg de metavanadato de sodio. El 95% de los cometas cuantificados se encontraron sin daño, el porcentaje restante tiene ligeras fluctuaciones de daño en el DNA.

**Frecuencia de micronúcleos:** durante el experimento se observó un aumento de MN en reticulocitos de ratones infectados con *Pyy* y tratados con 10 mg de MV con respecto a los grupos testigo y los que recibieron 10 mg de MV a partir del día 8 y hasta el final del experimento, sin embargo, solo fueron estadísticamente significativos los días 12 y 13 (Figura 41).

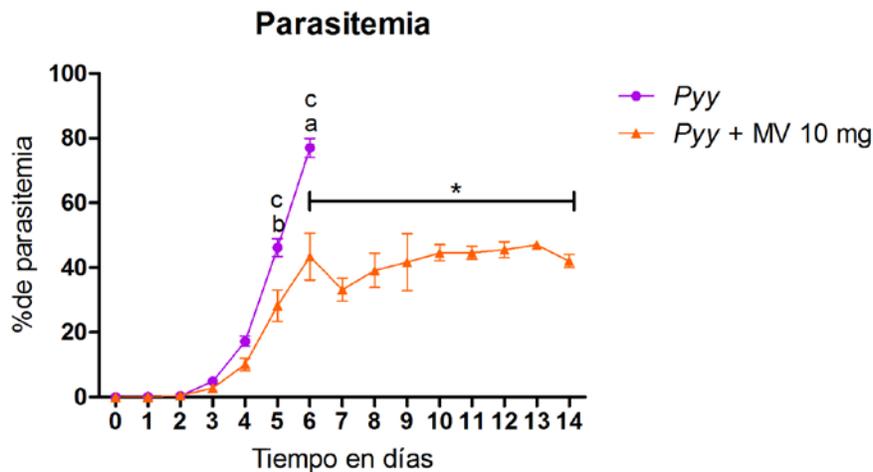
Es importante hacer notar que en los grupos *Pyy* en los días 5 y 6 y en el de *Pyy* + MV 10 mg el día 7 no fue posible llevar a cabo el ensayo debido a que la frecuencia de reticulocitos era muy baja.



**Figura 41.** Evaluación la frecuencia de micronúcleos en reticulocitos de sangre periférica de ratones CD1. No se observaron incrementos de esta frecuencia en los grupos testigo, MV 10mg y el grupo infectado con *Plasmodium yoelii yoelii*. El grupo infectado y tratado con 10 mg de metavanadato de sodio aumentó significativamente la frecuencia de micronúcleos en los días 12 y 13 con respecto a los grupos testigo y MV 10 mg (\*). ANOVA post-hoc Tukey  $p \leq 0.05$ .

**Evaluación de las parasitemias:** en los ratones infectados con *Pyy* se observó un aumento significativo del porcentaje de parasitemia en los días 5 con 46% y 6 con 77% con respecto a los tiempos anteriores de sí mismo donde su parasitemia era de 17% en el día 5 y menor en los días 4, 3, 2 y 1; además estos días (5 y 6) son significativamente mayores con respecto al grupo infectado y tratado con 10 mg de MV los días 5 y 6 del ya que estos tienen 28% y 43% de parasitemia respectivamente. Por otra parte el grupo *Pyy* + MV 10 mg aumentó la parasitemia significativamente a partir del día 6 (43 %) y hasta el fin del experimento (día 14) con respecto a los primeros 5 días (Figura 42).

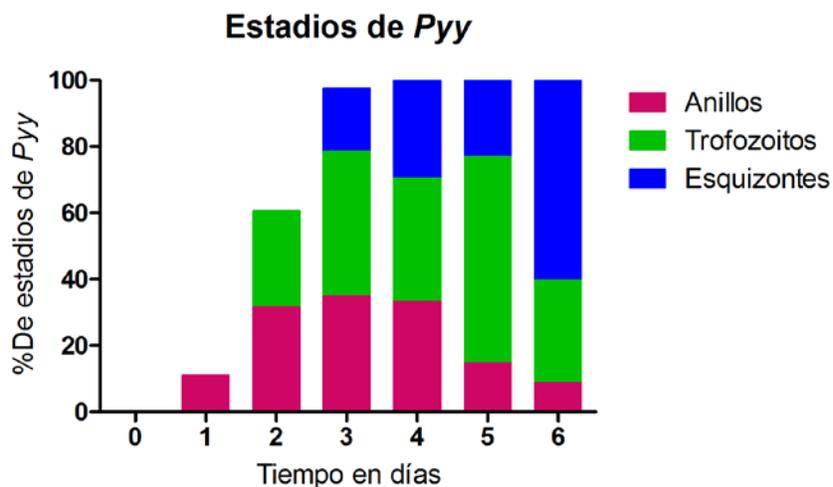
Estas diferencias significativas muestran la reducción de la parasitemia en el grupo infectado y administrado con 10 mg de MV en aproximadamente 45%.



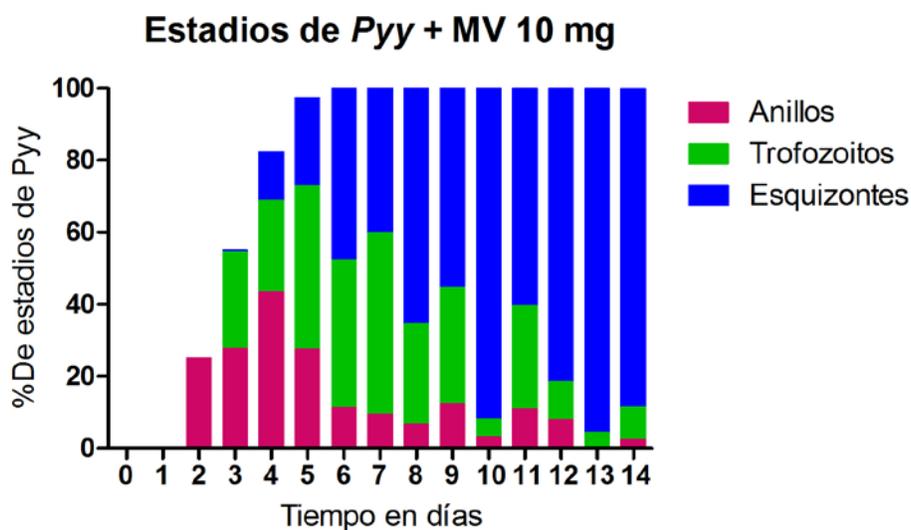
**Figura 42.** Evaluación del porcentaje de parasitemia en ratones infectados con *Plasmodium yoelii yoelii* sin tratamiento y tratados con 10 mg de metavanadato de sodio. El grupo no tratado presentó un aumento significativo en los días 5 (b) y 6 (a) con respecto a los días anteriores y al grupo tratado con 10 mg de metavanadato de sodio en esos mismos días (c). El grupo infectado y tratado con 10 mg de metavanadato de sodio aumentó significativamente el porcentaje de células infectadas a partir del día 6 y hasta el día 14 con respecto a los días anteriores (\*) ANOVA post-hoc Tukey  $p \leq 0.05$ .

**Porcentaje de los estadios de *Plasmodium yoelii yoelii*:** para la evaluación de la parasitemia se contabilizaron las células que se encontraban parasitadas y de éstas el estadio de maduración de *Pyy*. En el grupo no tratado se encontraron parásitos desde el día 1 en el primer estadio (anillo), en el día 2 el primer estadio y el segundo conocido como esquizonte y en los días 3, 4, 5 y 6 los tres estadios parasitarios: anillos, trofozoítos y esquizontes (Figura 43).

El grupo *Pyy* y tratado con 10 mg de MV, presentó parásitos hasta el día dos y solamente se encontraba el estadio de anillo, en el día 3 las células se encontraban parasitadas por anillos y trofozoítos y en el día 4 y hasta el día 14 de sobrevida se encontraban los 3 estadios de maduración de *Pyy* en la muestra anillos, trofozoítos y esquizontes (Figura 44).



**Figura 43.** Desarrollo del ciclo de vida de *Plasmodium yoelii yoelii* en glóbulos rojos de ratones infectados. En el día 1 se observó el primer estadio (anillos), en el día 2 anillos y segundo estadio trofozoítos, en los días posteriores se encontraron presentes las tres formas de maduración del parásito.



**Figura 44.** Desarrollo del ciclo de vida de *Plasmodium yoelii yoelii* en glóbulos rojos de ratones infectados y tratados con 10 mg de metavanadato de sodio. Se observó el primer estadio (anillos) en el día 2, en el día 3 se observaron anillos y el segundo estadio trofozoítos y los días posteriores se observaron que los tres estadios parasitarios.

**Grupo testigo para determinar el efecto genotóxico del colcemid (colchicina):** para llevar a cabo los ensayos de genotoxicidad es necesario contar con testigo positivo para cerciorarnos que el modelo utilizado tenga la capacidad de generar micronúcleos y rompimientos de DNA, para este trabajo se utilizó el compuesto colcemid el cuál se administró de forma aguda por vía oral (10 mL/Kg).

Durante la evaluación de la citotoxicidad en leucocitos de sangre periférica no se identificaron cambios significativos y la viabilidad se mantuvo por arriba del 90%. Contrario a lo observado en la viabilidad medida por la proporción de reticulocitos/eritrocitos, en el día 14 se identificó un decremento con respecto al tiempo 0 (\*). En la evaluación genotóxica medida por el índice de migración se observó un incremento significativo en el día 8 respecto al día 0 (\*), por otra parte, en la cuantificación de la frecuencia de micronúcleos se observó un aumento en los días 3, 6, 8, 10 y 12 con respecto al tiempo 0 (\*), además en el día 10 hubo un aumento que es significativo con respecto a todos los tiempos de este grupo (a) (Cuadro 5).

**Cuadro 5.** Efecto citotóxico y genotóxico del colcemid.

| Tiempo | % viabilidad celular en leucocitos | % viabilidad celular Reticulocitos/eritrocitos | Índice de migración | Frecuencia de micronúcleos |
|--------|------------------------------------|--|---------------------|----------------------------|
| Día 0  | 96.75±1.03                         | 15.51±1.24                                     | 1.04±0.03           | 2.01±0.53                  |
| Día 1  | 97.75±1.43                         | 15.65±1.27                                     | 1.06±0.04           | 3.62±0.79                  |
| Día 2  | 95±1.87                            | 12.2±1.31                                      | 1.07±0.01           | 5.33±0.6                   |
| Día 3  | 97.5±0.5                           | 11.05±0.89                                     | 1.05±0.01           | 5.42±0.73*                 |
| Día 6  | 96.75±0.47                         | 11.33±0.98                                     | 1.14±0.01           | 5.34±0.63*                 |
| Día 8  | 94±3.05                            | 11.17±1.26                                     | 1.17±0.02*          | 5.61±0.81*                 |
| Día 10 | 95.5±1.75                          | 13.59±0.82                                     | 1.14±0.01           | 9.36±0.9** <sup>a</sup>    |
| Día 12 | 92±0.86                            | 11.35±1.27                                     | 1.11±0.02           | 6.47±0.58*                 |
| Día 14 | 94±2.44                            | 9.854±0.54*                                    | 1.08±0.01           | 3.60±0.43                  |
| Día 17 | 96±0.4                             | 14.16±0.95                                     | 1.12±0.03           | 4.03±0.4                   |

\* Estadísticamente significativo respecto al tiempo cero a diferente respecto a todos los tiempos. ANOVA post-hoc Tukey  $p \leq 0.05$ .

## 12. Resumen de resultados

### ➤ Fase 1 Curva dosis respuesta

En cuanto al efecto citotóxico del metavanadato de sodio, ninguna de las dosis probadas (5 y 10 mg) modificó la viabilidad celular en leucocitos ni en la proporción reticulocitos/eritrocitos, en la evaluación de la genotoxicidad no aumentaron significativamente la frecuencia de MN ni el índice de migración significativamente durante todo el experimento.

### ➤ Fase 2 Evaluación antimalárica y genotóxica (protocolo de 4 días)

Debido a que en los resultados previos no se observaron diferencias significativas entre las dos dosis, se decidió utilizar ambas y evaluarlas en la infección de los ratones con *Plasmodium yoelii yoelii*.

No se modificó la viabilidad celular en leucocitos en ningún grupo, sin embargo ésta se disminuyó en el día 4 en la proporción reticulocitos/eritrocitos en los grupos *Pyy* y *Pyy* + MV 5 mg.

Durante la evaluación genotóxica aumentó el índice de migración durante todo el experimento en el grupo de ratones infectados y en el grupo *Pyy* + MV 5 mg del día 2 al día 4. Ningún grupo aumentó la frecuencia de MN.

Los grupos *Pyy* y *Pyy*+MV5mg incrementaron significativamente el porcentaje de parasitemia con respecto al grupo tratado con MV 10 mg ya que este último disminuyó la parasitemia significativamente en aproximadamente 50%. En el grupo *Pyy* se observó la presencia de parásitos (forma de anillos) a partir del día 1 mientras, que en los grupos tratados con 5 mg y 10 mg de MV las formas parasitarias se observaron a partir del día 2, los ratones que recibieron 5 mg presentaron anillos y trofozoitos y los ratones tratados con 10 mg de MV se observó la forma de anillos.

No se observaron cambios histológicos en el hígado en ningún grupo y solo se mostró la presencia de un cristal de hemozoína en el grupo *Pyy*.

### ➤ Fase 3 Sobrevida

La dosis de 5mg de MV no tuvo efecto en la parasitemia, por lo que en la fase 3 sólo se evaluó la dosis de 10mg frente a la infección de ratones con *Pyy*.

Los individuos de los grupos testigo y MV 10 mg vivieron durante todo el experimento, los del grupo *Pyy* el 50% murió en el día 6 y el otro 50% en el día 7 y en el grupo *Pyy* + MV 10 mg murieron paulatinamente y el 10% sobrevivió al día 14.

No se observó disminución de la viabilidad celular en leucocitos. En la evaluación de citotoxicidad por medio de la proporción reticulocitos/eritrocitos ésta se redujo en el grupo *Pyy* en los días 5 y 6 y en el grupo *Pyy* + MV 10 mg en los días 5 y 7, aunado a que en este último grupo en los días 10, 12 y 14 incrementó significativamente la proporción con respecto a los grupos control y MV 10 mg.

En la evaluación del índice de migración en todos los grupos no se observó incremento que perdurara durante todo el experimento.

Debido a la baja de reticulocitos no se pudo llevar a cabo el conteo de la frecuencia de MN en los grupos *Pyy* (días 5 y 6) y en *Pyy* + MV 10 mg (día 7), en este último se observó un aumento significativo en los días 13 y 14 con respecto al grupo testigo y al grupo MV 10mg.

Respecto al porcentaje de parasitemia el grupo no tratado la aumentó significativamente los días 5 y 6 con respecto al grupo tratado con MV 10 mg, en este último la parasitemia fue aproximadamente 50% menor y a pesar de que se incrementó gradualmente, nunca alcanzó los niveles de parásitos ya que en el día 6 los ratones tuvieron 77% de células infectadas y el grupo *Pyy* + MV 10 mg en el día 14 tenía 42% de células infectadas.

En cuanto a los estadios del parásito estos se comenzaron a observar en el grupo no tratado a partir del día 1 y en el grupo tratado a partir del día 2.

## **13. Discusión**

### **13.1 Determinación de la parasitemia y evaluación genotóxica con naranja de acridina**

La determinación de la parasitemia se realiza en frotis teñidos con giemsa que está reportado como el estándar de oro para la evaluación de esta parasitosis, además hay reportes que indican que con esta técnica se puede llevar a cabo la cuantificación de MN (Tinwell y Ashby 1989, Polard *et al.*, 2010) con base en lo anterior se planeó realizar ambas determinaciones con esta técnica; sin embargo, la cuantificación de la frecuencia de micronúcleos es muy compleja debido a que estos se podían confundir con el núcleo del parásito en el estadio de anillo ya que la orientación del citoplasma del parásito muchas veces es muy poco perceptible, por lo que esta técnica no fue la indicada para poder llevar a cabo el conteo de la frecuencia de MN en ratones infectados, pero sí lo era para la evaluación de la parasitemia.

Debido a lo acontecido, se utilizó la tinción con naranja de acridina para la evaluación de la frecuencia de MN de acuerdo con Krishna y Hayashi (2000), además al observar los frotis de ratones infectados con esta técnica se podían diferenciar los estadios parasitarios de *Pyy*, asimismo se observó la tinción diferencial entre el DNA amarillo verde limón opaco observado en los micronúcleos y brillante en el núcleo del parásito, y el RNA rojo opaco visto en los reticulocitos y brillante en el citoplasma del parásito de acuerdo con lo reportado por Kawamoto (1991).

### **13.2 Fase 1 Curva dosis respuesta**

#### **13.2.1 Viabilidad celular**

En el presente estudio las dosis de 5 y 10 mg de MV no mostraron efectos citotóxicos en leucocitos ni en la proporción reticulocitos/eritrocitos. Contrario a lo que sucede en el empleo del MV en terapias contra el cáncer, ya que se propone la citotoxicidad como mecanismo de acción Jing-Xuan *et al.*, (2016), en un estudio *in vitro* observaron que el comportamiento del efecto producido por el MV era dosis dependiente provocando citotoxicidad en células AsPC-1 de cáncer pancreático, esto debido al incremento de ERO, que inducen la activación de diferentes vías de señalización (MAPK/ERK), que intervienen con el arresto del ciclo celular (G2/M) evitando la proliferación. Asimismo se ha evidenciado citotoxicidad en células no cancerosas debido a la generación de ERO Zwolak (2015) en un cultivo *in vitro* en células de ovario de criceto chino, observó que el porcentaje de citotoxicidad del MV era dosis dependiente y se notaron cambios en estas

células como: daño en los lisosomas, disrupción en la mitocondria y afectación en la integridad de la membrana plasmática.

En los ensayos *in vitro* anteriores se utilizan más de 5 dosis, sin embargo, Zwolak, (2015) empleó 8 dosis de un rango de 10 $\mu$ M -1000  $\mu$ M, las que causaron citotoxicidad se encontraron por arriba de 600  $\mu$ M, contrario a lo reportado en células cancerosas que desde la dosis de 25  $\mu$ M comenzó a aumentar la citotoxicidad (Jing-Xuan *et al.*, 2016).

Con estos antecedentes: a) Citotoxicidad de MV dosis dependiente, b) dosis altas para causar citotoxicidad en células no cancerosas y c) LD50 de 74.6 mg/kg de MV (14d) (Llobet *et al.*, 1984); se podría explicar la razón por la cual el MV administrado vía oral en dosis de 5 y 10 mg no es citotóxico en leucocitos y en reticulocitos, aunado a que por la vía oral solamente se absorbe del 1-10% del MV administrado (Rodríguez-Mercado *et al.*, 2006).

Además, la viabilidad en leucocitos se encontró por arriba del 95% para ambas dosis lo que permitió la validación del ensayo cometa (Tice *et al.*, 2000).

### **13.2.2 Índice de migración y frecuencia de MN**

Al llevar a cabo la comparación de las dosis de 5 y 10 mg/kg y el grupo testigo, solo la dosis de 5mg generó un aumento significativo del índice de migración y de la frecuencia de MN con respecto a los dos grupos, en el día 3 y en el día 4 ya no hubo diferencias, por lo que el incremento podría no ser biológicamente significativo.

## **13.3 Fase 2: evaluación antimalárica y genotóxica (protocolo de 4 días)**

### **13.3.1 Viabilidad celular**

No hubo diferencias significativas en la viabilidad celular durante el experimento por lo que el metavanadato no causa citotoxicidad en leucocitos. Esto se puede explicar por la dosis empleada de MV, la vía de administración (v.o) y el tiempo de administración (4 días) explicadas en el apartado 13.2.1. En los grupos con *Pyy* de igual manera no se observan cambios en la viabilidad celular, por lo que, estos resultados apoyan a la validación del ensayo cometa (Tice, 2000).

Por otra parte, en la proporción reticulocitos/ eritrocitos, se observó una disminución significativa en los grupos *Pyy* y *Pyy* + MV 5 mg en el día 4 esto podría deberse a que los reticulocitos son parasitados preferencialmente sobre los eritrocitos y por tanto en 24 horas lisados, además esta disminución se relaciona con el aumento de la parasitemia en ambos grupos y con el decremento y/o supresión de la eritropoyesis reportada en infecciones maláricas (Casals- Pascual y Roberts, 2006)

### **13.3.2 Índice de migración**

Los grupos *Pyy*, *Pyy* + MV 5 mg fueron diferentes significativamente con respecto al grupo testigo debido a que se observó un aumento en los rompimientos.

Este aumento del índice de migración puede ser explicado por el incremento de especies reactivas de oxígeno (EROS) generadas por *Pyy*, por dos mecanismos diferentes: el primero debido a que durante la catálisis de la hemoglobina como fuente de alimentación se generan radicales libres (Liochevy Fridovich, 1999) y el 10% del hierro no es convertido a hemozoína entonces es liberado a citoplasma y puede formar EROS por reacciones oxido-reducción a través de la reacción de Fenton (Antma y Ginsbog, 1993); el segundo debido a la respuesta del sistema inmune del hospedero por la acción de las células fagocíticas ya que estas dañan a los parásitos por la producción de especies reactivas de oxígeno (Descamps-Latscha *et al.*, 1987).

Por tanto, la elevación de EROS durante la parasitosis puede causar daño a diferentes biomoléculas como el DNA, afectando principalmente a la desoxirribosa, provocando la liberación de las bases nitrogenadas que se encuentran unidas a este azúcar, ocasionando el rompimiento de una o ambas cadenas de DNA causando deleciones que dan como resultado mutaciones y la activación o inactivación de genes (Dukan *et al.*, 2000, Kryston *et al.*, 2011).

### **13.3.3 Frecuencia de micronúcleos**

A pesar de que se observó el incremento en el IMG en los grupos *Pyy* y *Pyy* + MV 5 mg, no hubo un aumento en la frecuencia de MN, probablemente los rompimientos generados fueron reparados por lo que no se observó la pérdida de material genético en forma de MN.

### **13.3.4 Evaluación de la parasitemia y porcentaje de los estadios de *Pyy***

En los resultados se observó que en los grupos *Pyy* y *Pyy* + MV 5 mg la parasitemia aumentó gradualmente con respecto del tiempo, además los estadios parasitarios fueron los mismos a partir del día 2 presentándose las formas de anillos y trofozoítos. Mientras que en el grupo *Pyy* + MV 10 mg la parasitemia fue menor en ~50% y retrasó la aparición de formas parasitarias hasta el día 2 donde la muestra presentaba únicamente el estadio de anillo.

La disminución de la carga parasitaria responde a una curva dosis respuesta, donde el mayor efecto corresponde a la dosis más alta, esta respuesta puede deberse a un incremento en absorción (1-10% por v.o) de la dosis administrada por lo que se absorbió

más MV en la dosis de 10 mg que en la de 5 mg por lo cual esta última no causó un efecto significativo en la parasitemia.

- ❖ La dosis de 10 mg de MV está retrasando el ciclo de vida del parásito, es decir, está causando un efecto parasitostático el cual está relacionado con la disminución de la parasitemia, por lo que fue probado en la fase 3 donde se discutirá este efecto.

### **13.3.5 Cambios histológicos en el hígado y presencia de hemozoína**

No se observaron cambios histológicos en los grupos, debido a la poca absorción (1-10%) por vía oral del MV, aunado a que la administración solo fue durante 4 días seguidos.

Solo el grupo *Pyy* presentó 1 cristal de hemozoína, contrario a la evaluación realizada por Rivera Fernández y colaboradores (no publicado), en ratones infectados con 30% de parasitemia (*Pyy*) y que fueron sacrificados al día 6 post infección se observó el hígado con una gran cantidad de hemozoína. Por lo anterior, la explicación del efecto casi nulo en este protocolo probablemente fue debido a que se infectó con 4% de parasitemia y se sacrificaron los ratones al día 5 post infección, adicionalmente se recomienda que para poder observar cambios en la cantidad de hemozoína se eleve el porcentaje de parásitos para la inoculación ya que debido al corto tiempo de vida de los ratones infectados es necesario aumentar el factor que desencadenará los cambios.

## **13.4 Fase 3 Sobrevida**

### **13.4.1 Sobrevida**

El grupo testigo y el grupo tratado con MV 10 mg, sobrevivieron hasta el final del experimento, sin ningún tipo de toxicidad física. Por otra parte los ratones infectados con *Pyy* murieron entre los días 6 y 7 como esta reportado (Rivera *et al.*, 2013), sin embargo, los ratones infectados y con administración de MV 10 mg el 50% vivió más de 7d y el 10% murió al día 14, esto se puede explicar con base en el efecto parasitostático ocasionado por el MV y la consecuente disminución de la parasitemia.

### **13.4.2 Viabilidad celular**

No hubo disminución de la viabilidad celular en leucocitos. Todos los grupos se mantuvieron arriba del 95%, debido a las características del compuesto anteriormente descritos.

En la evaluación de la proporción reticulocitos/eritrocito se observó una disminución en el grupo *Pyy* a partir del día 4 y hasta el día 6, esta reducción se podría deber al aumento de la parasitemia durante estos días y que el parásito tiene preferencia por invadir

reticulocitos (Casals-Pascual y Roberts, 2006). En el grupo tratado con 10 mg de MV en los días 5 y 7 se redujo esta proporción, sin embargo, a partir del día 8 y hasta el día 14 incrementó significativamente con respecto del grupo testigo, la reducción pudo deberse al aumento de la parasitemia. La recuperación del porcentaje de reticulocitos se puede atribuir al probable incremento de la hormona eritropoyetina ya que su función es estimular la proliferación, maduración y salida de eritrocitos o reticulocitos al torrente circulatorio bajo diferentes condiciones fisiológicas y patológicas y una de ellas es la reducción de la tensión de oxígeno por la lisis de las hematías (Daugas *et al.*, 2001), por lo que en este experimento el aumento de la parasitemia se relaciona con la baja tensión de oxígeno por la lisis de hematías lo que podría ocasionar que se incremente la concentración de eritropoyetina que estimularía a la médula ósea y el aumento de los reticulocitos serían el reflejo de este mecanismo.

#### **13.4.3 Índice de migración**

El aumento del índice de migración en el grupo *Pyy* a partir del día 1 al 4 con respecto al grupo testigo se explican en el apartado 13.3.2. En esta fase es posible observar que los rompimientos causados disminuyen al día 5 y se mantienen hasta el día 6 probablemente por la adaptación del ratón al estrés.

No hubo incremento en el IMG en los grupos testigo vs MV 10 mg, por lo que es un factor que contribuyó a que sobrevivieran todo el experimento.

#### **13.4.4 Frecuencia de micronúcleos**

No hubo incremento en la frecuencia de MN en los grupos testigo vs MV 10 mg debido a las características del compuesto explicadas en el apartado 13.2.1.

Durante la evaluación de MN se identificaron dos eventos importantes:

1. La disminución de los reticulocitos: en el grupo *Pyy* en los días 5 y 6 y en *Pyy* + MV 10 mg solo en el día 7 ya que los días posteriores la proporción de reticulocitos en la muestra fue normal.

Estos resultados muestran que hay citotoxicidad en esta población celular, la cual puede deberse a la anemia que se presenta durante el desarrollo de la enfermedad como resultado de la lisis de los reticulocitos y eritrocitos parasitados debido al ciclo de vida del plasmodio y a la destrucción de estas células llevada a cabo por los macrófagos (Lamikanra *et al.*, 2007), a la disminución y/o supresión de la eritropoyesis y al aumento de la parasitemia (Casals-Pascual y Roberts, 2006).

Por otra parte, la producción continua de los reticulocitos en los días posteriores al decremento de los reticulocitos (*Pyy* + MV 10 mg) puede deberse a que la médula ósea de los ratones aún tiene la capacidad de censar a la eritropoyetina y con ello acelerar la producción de hematíes.

2. El aumento de la frecuencia de MN en los días 8, 12, 13 y 14 con respecto del grupo testigo.

El incremento de la frecuencia de MN podría deberse al aumento de EROS causadas por *Pyy*, la reacciones de oxido-reducción por parte del vanadio, la participación del sistema inmune del ratón en la defensa contra el parásito y a los cambios morfológicos anormales que se observan en el linaje eritroide durante la fase crónica como la aparición de MN o cuerpos de Howell Jolly (Lamikanra *et al*, 2007).

#### **13.4.5 Parasitemia y porcentaje de los estadios de *Pyy***

En el grupo infectado y tratado con MV 10 mg la parasitemia es aproximadamente 50% menor que en el grupo no tratado y a pesar de que ésta aumenta gradualmente nunca alcanzó los niveles del grupo *Pyy* (día 6, 80% de parasitemia) y el grupo *Pyy* + MV 10 mg (día 6, 43% y día 14, 40% de parasitemia).

Al realizar la comparación de los estadios del ciclo de vida del parásito en ambos grupos, en el tratado con MV 10 mg va retrasado, al menos un día, en el desarrollo de parásitos por lo que el MV causa un efecto parasitostático en *Pyy*.

Estos resultados se pueden explicar por los diferentes mecanismos de acción que puede generar el vanadio en las células, por lo que se propone que el MV podría tener los siguientes mecanismos de acción que solos o en conjunto causen el efecto parasitostático:

- 1) El vanadio tiene un efecto genotóxico *per se* y por medio de la generación de EROS, este mecanismo de acción es la propuesta del efecto terapéutico contra *Trypanozoma cruzi in vitro* (Benítez *et al.*, 2009a, Benítez *et al.*, 2013b). En este trabajo probablemente también pueda afectar al DNA de *Pyy*, lo que se traduciría en una falla que interferiría con la replicación del parásito o la síntesis de RNA mensajero lo que implicaría una falla en la síntesis de proteínas necesarias para el óptimo desarrollo del parásito.
- 2) Se ha observado que el V tiene un efecto perjudicial sobre las proteínas del citoesqueleto:

-Actina: el decavanadato puede inhibir la polimerización de la G-actina (Ramos *et al.*, 2006), el oxovanadio (IV) se une a la G-actina impidiendo su polimerización (Ramos *et al.*, 2011). Está demostrado que la actina está implicada en la invasión del eritrocito por parte del merozoíto y si ésta es inactivada o no se polimeriza, la invasión se inhibe además impide el movimiento del parásito dentro de la célula huésped lo que puede impedir su división en el estadio de esquizonte (Miller *et al.*, 1979; Ward *et al.*, 1994). Por lo anterior, en este modelo el MV podría evitar que se lleve a cabo la polimerización de la actina, por lo que Pyy disminuiría o inhibiría su motilidad lo que se reflejaría en el retraso del ciclo dentro del eritrocito o podría dificultar la invasión a otras células.

-Tubulina: se ha observado que el pentóxido de vanadio, disminuye la  $\gamma$ -tubulina en todas las células del testículo (Mussali-Galante *et al.*, 2005), además este compuesto puede inhibir el ensamblaje de microtúbulos y la despolimerización de  $\beta$ -tubulina (Ramírez *et al.*, 1997).

En los plasmodios la tubulina está presente en: el películo, los anillos polares, el aparato mitótico, los flagelos de los microgametos y forma parte del citoesqueleto (Banister, 1995). Se ha observado que cuando se bloquean los microtúbulos se inhibe la reinvasión, esto debido a que no se lleva a cabo la división nuclear en el esquizonte previniendo la formación de los merozoítos (Dieckmann-Schuppert, 1989, 1990). En este experimento el MV podría actuar inhibiendo el ensamblaje de los microtúbulos o disminuyendo esta proteína, lo que suprimiría o retrasaría la producción de merozoítos y se vería reflejado en el retraso del ciclo celular, además si actúa en los anillos polares del merozoíto puede impedir la reinvasión a otros eritrocitos.

El testigo positivo para genotoxicidad: el grupo tratado con colcemid 10 mL/kg aumentó la frecuencia de MN como está reportado por Scheneide *et al.*, (1995) por lo que se corroboró que los experimentos estuvieron realizados de manera adecuada.

## 14. Conclusiones

- ❖ La dosis de metavanadato de sodio de 10 mg/Kg utilizada en este trabajo no generó efectos genotóxicos ni citotóxicos en el ratón, lo que permite que pueda ser considerado para futuros estudios.
- ❖ El efecto parasitostático del metavanadato de sodio en el modelo con *Pyy* disminuyó la parasitemia y como consecuencia ayudó a que los ratones tratados sobrevivieran más tiempo que los no tratados.
- ❖ Estos resultados permitirán la continuidad en la evaluación del metavanadato de sodio como un posible antimalárico adyuvante en las terapias antimaláricas actuales.

## 15. Literatura citada

- Aft R. y Mueller G. (1983). Hemin-mediated DNA strand scission. *J. Biol. Chem.*, 258(19), 12069-12072.
- Aft R. y Mueller G. (1984). Hemin-mediated oxidative degradation of proteins. *J. Biol. Chem.*, 259(1), 301-305.
- Ahmed M. A. y Cox-Singh, J. (2015). Plasmodium knowlesi—an emerging pathogen. *ISBT science series*, 10(S1), 134-140.
- Amino R., Thiberge S., Martin B., Celli S., Shorte S., Frischknecht F.,...Ménard R. (2006). Quantitative imaging of *Plasmodium* transmission from mosquito to mammal. *Nat. Med.*, 12(2), 220-224.
- Arias A. A., Soto B. M. A. (2009). Malaria-Revisión bibliográfica Medicina tropical. *Rev. Med. Cos. Cen. A.*, LXVI (587), 89-93.
- Arnáez S. J., García L. M. Paludismo (profilaxis en niños viajeros) (2010). Guía ABE. Infecciones en Pediatría. Guía rápida para la selección del tratamiento antimicrobiano empírico [en línea] [actualizado el 30/09/2010; consultado el 30/11/2010]. Disponible en <http://www.guia-abe.es>.
- Atamna, H. y Ginsburg, H. (1993) Origin of reactive oxygen species in erythrocytes infected with *Plasmodium falciparum*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 61, 231–241.
- Attia S. M., Badary O.A., Hamada F. M., Hrab'e de Angelis M., Adler I.D. (2005). Orthovanadate increased the frequency of aneuploid mouse sperm without micronucleus induction in mouse bonemarrow erythrocytes at the same dose level. *Mutat Research.*, 583, 158–167.
- Ávila-Costa M. R., Colín B. L., Zepeda R. A., Antuna B. S., Saldivar L., Espejel M. G., Mussali G. P., Ávila C. M. C., Reyes O. A., Anaya M. V., Fortoul T. I. (2005); Ependymal epithelium disruption after vanadium pentoxide inhalation. A mice experimental model. *Neurosci Lett.* 381, 21-25.
- Bagavan A., Rahuman A. A., Kaushik N. K., Sahal D. (2011). *In vitro* antimalarial activity of medicinal plant extracts against *Plasmodium falciparum*. *Parasitol. Res.* 108, 15–22.
- Baird J.K. (2009). Resistance to therapies for infection by *Plasmodium vivax*. *Clin. Micro. Biol.* 22,508-534.
- Banerjee R., Liu J., Beatty W., Pelosof L., Klemba M., Goldberg D. E. (2002). Four plasmepsins are active in the *Plasmodium falciparum* food vacuole, including a protease with an active-site histidine. *Proc. Natl. Acad. Sci USA*; 99, 990–5.
- Bank H. L. (1987). Assessment of islet cell viability using fluorescent dyes. *Diabetología* 30(10), 812-816.
- Benítez (a) J., de Queiroz A. C., Correia I., Alves M. A., Alexandre-Moreira M. S., Barreiro E. J., ...y Moreno, V. (2013). New oxidovanadium (IV) N-acylhydrazone complexes: Promising anti leishmanial and antitrypanosomal agents. *Eur. J. Med. Chem.* 62, 20-27.
- Benítez (b) J., Guggeri L., Tomaz I., Arrambide G., Navarro M., Pessoa J. C., ... y Gambino, D. (2009). Design of vanadium mixed-ligand complexes as potential anti-protozoa agents. *J. Inorg. Biochem.*, 103(4), 609-616.
- Boletín de la Organización Mundial de la Salud 2014 Recopilación de artículos 92: 153-228 Consulta en línea en [<http://www.who.int/bulletin/volumes/92/3/14-020314/es/>].
- Bonassi S., Znaor A., Ceppi M., Lando C., Chang W. P., Holland N., ... y Bigatti M. P. (2007). An increased micronucleus frequency in peripheral blood lymphocytes predicts the risk of cancer in humans. *Carcinog*, 28(3), 625-631.
- Bueno M. R. y Jiménez P. R. (2008). Malaria en España: aspectos entomológicos y perspectivas de futuro. *Rev. Esp. Salud Publica*, 82(5), 467-479.
- Carlton J. M., Angiuoli S. V., Suh B. B., Kooij T. W., Perteza M., Silva, J. C., ...y Peterson J. D. (2002). Genome sequence and comparative analysis of the model rodent malaria parasite *Plasmodium yoelii yoelii*. *Nature*, 419(6906), 512-519.
- Carrasco-Ramírez E, Malagón-Gutiérrez F. (2013). La malaria como una zoonosis. *Med Lab* 5(2),4-10.
- Casals-Pascual C., Roberts D. J. (2006) Severe malarial anaemia. *Curr. Mol. Med.* 6, 155-168.
- Castro W. y Navarro M. (2012). Complejos metálicos como potenciales antimaláricos con blanco de acción: hemozoína. *Avances en Química*, 7(2), 135-144.
- CDC-Centros para el Control y Prevención de Enfermedades (2018). Malaria Diagnosis & Treatment in the United States. Consulta en línea en [[https://www.cdc.gov/malaria/diagnosis\\_treatment/diagnosis.html](https://www.cdc.gov/malaria/diagnosis_treatment/diagnosis.html)], última consulta 12 de Julio 2018.

**CENAPRECE** -Centro Nacional de Programas Preventivos y Control de Enfermedades, Programa de Acción Específico Prevención y Control del Paludismo 2013-2018 Consulta en línea en: [http://www.cenaprece.salud.gob.mx/descargas/pdf/PAE\_PrevencionControlPaludismo2013\_2018.pdf] última consulta 12, 07, 2018.

**Chang** K. H., Stevenson M. M. (2004). Malarial anaemia: mechanisms and implications of insufficient erythropoiesis during blood-stage malaria. *Intl. J. Parasitol.* 24, 1501–16.

**Chang** K. H., Tam M., Stevenson M. M. (2004) Modulation of the course and outcome of blood-stage malaria by erythropoietin-induced reticulocytosis. *J. Infect. Dis.* 189, 735-743.

**Ciranni** R., Antonetti M., Migliore L. (1995) Vanadium salts induce cytogenetic effects in vivo treated mice. *Mutat. Res.* 343, 53-60.

**Collins** A, R. (2004) The comet assay for DNA damage and repair. *Mol Biotechnol.* 26(3), 249-261.

**Contactos** P. (1970). Primate malarias: Man and Monkeys. *J. Wildlife. Dis.*, 6, 323-328.

**Cortés-Gutiérrez** E. I., Dávila-Rodríguez M. I., Fernández J. L., López-Fernández C., Gosálbez A., y Gosálvez J. (2011) New Application of the Comet Assay Chromosome–Comet . *J. Histo chem. Cyto. Chem.* 59(7), 655-660.

**Cortizo** A. M., Caporossi M., Lettieri G. y Etcheverry S. B. (2000). Vanadate-induced nitric oxide production: role in osteoblast growth and differentiation. *Eur. J. Pharmacol.*, 400(2-3), 279-285.

**Cowman** A. F., Healer J., Marapana D. y Marsh K. (2016). Malaria: biology and disease. *Cell.* 167(3), 610-624.

**Crans** D. C., Smee J. J., Gaidamauskas E., y Yang, L. (2004). The chemistry and biochemistry of vanadium and the biological activities exerted by vanadium compounds. *Chem. Rev.* 104(2), 849-902.

**Cuesta** D. P., Martínez L. M., Hurtado I. C., Miranda D. C., Garrido A. I., Arango V.,... y Ortiz, I. C. (2011). Genotoxic effect of reactive oxygen species in patients with malaria. *Rev. Rniv. Rnd.* 43(1), 83-84.

**Dahl** E. L., Shock J. L., Shenai B.R., Gut J., DeRisi J. L. & Rosenthal P. J. (2006). Tetracyclines specifically target the apicoplast of the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Antimicrob. Agents, Chemothe,r* 50(9), 3124-3131.

**Daugas** E, Cande C, Kroemer G (2001) Erythrocytes: death of a mummy. *Cell Death Differ.* 12, 1131-1133

**Delacollette** C. y Van der Stuyft P. (1994). Direct acridine orange staining is not a ‘miracle’ solution to the problem of malaria diagnosis in the field. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 88(2), 187-188.

**Department of Health and Human Services.** (1983). Proposed new drug, antibiotic, and biologic drug product regulations. *Federal Register*, 48, 26720-26749.

**DESCAMPS-LATSCHA** B., LUNEL-FABIANI F., KARABINIS A. y DRUILHE P. (1987) Generation of reactive oxygen species in whole blood from patients with acute falciparum malaria Parasite. *Immunol.* 9, 275-279.

**Dukan** S., Farewell A., Ballesteros M., Taddei F., Radman M. y Nyström T. (2000) Protein oxidation in response to increased transcriptional or translational errors. *PNA.* 5746–5749.

**Egan** T.J., Combrinck J.M., Egan J., Hearne G.R., Marques H.M., Ntenti S., y Walden, J. C. (2002) Fate of haemiron in the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Biochem. J.*, 365, 343–347.

**Eggleson** K. K., Duffin K. L., Goldberg D. E. (1999). Identification and characterization of falcilysin, a metallopeptidase involved in haemoglobin catabolism with in the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *J. Biol. Chem.*, 274, 32411–32417.

**Elinder** C.G., Gerhardsson L. y Oberdoerster G. (1988). Biological monitoring of toxic metals-overview. Plenum Press. 1-71.

**Fatima** S.K., Prabhavathi A., Reddy P.P. (2001) Analysis of chromosomal aberrations in men occupationally exposed to cement dust. *Mutat Res;* 490, 179-186.

**Felli** N., Pedini F, Zeuner A.,... y De Maria R. (2005). Multiple members of the TNF superfamily contribute to IFN gamma-mediated inhibition of erythropoiesis. *J. Immunol.* 175, 1464-1472.

**Gambino** D. (2011). Potentiality of vanadium compounds as anti-parasitic agents. *Coord. Chem. Revs.*, 255(19-20), 2193-2203.

- Gavigan** C. S., Dalton J. P., Bell A. (2001). The role of aminopeptidases in haemoglobin degradation in *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes. *Mol. Biochem. Parasitol.* 117(1), 37–48
- Goldfine** A. B., Simonson D. C., Folli F. R. A. N. C., Patti M. E. y Kahn C. R. (1995). Metabolic effects of sodium metavanadate in humans with insulin-dependent and non insulin-dependent diabetes mellitus in vivo and in vitro studies. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 80(11), 3311-3320.
- Gómez-Meda** B.C., Zúñiga-González G.M. (2007) Genotoxicidad y potencial teratógeno, *La ciencia y el hombre* 20(3), 57-62.
- Hay** S. I., Guerra C. A., Tatem A. J., Noor A. M., Snow R. W. (2004). The global distribution and population at risk of malaria: past, present, and future. *Lancet. Infect. Dis.* 4, 327-336.
- Heddi** Andreas. (2002) Malaria pathogenesis. *Int. J. Parasitol.* 32 (2002), 1587–1598.
- Hirao** T. (2000). Redox reactions via vanadium-induced electron transfer. *J. Inorg. Biochem.* 80, 27-33.
- Hortelano** M. G. L., Pérez V. F., Tomé M. G., (2013). Actualización en el diagnóstico y tratamiento de la malaria. *An. Esp. Pediatr.* 78 (2), 124-e1.
- Ibañez-Bernal** S. (2012). Zoonosis transmitidas por artrópodos. Enfermedades emergentes y reemergentes de actualidad. *Med. Lab.*, 4, 4-16.
- Kawamoto** F. (1991). Rapid diagnosis of malaria by fluorescence microscopy with light microscope and interference filter. *Lancet*, 337(8735), 200-202.
- Kesara** N., Phunuch M., Ronnatari R., Wanna C., Juntra K. (2013). Antimalarial efficacy, cytotoxicity, and genotoxicity of methanolic tembark extract from *Hintonia latiflora* in a *Plasmodium yoelii yoelii* lethal murine malaria model. *Malar. J.*, 12, 1–14.
- Krishna** Gopala y Hayashi Makoto (2000) In vivo rodent micronucleus assay: protocol, conduct and data interpretation. *Mutat. Res. Fund. Mol. Mech. Mut.* 455(1), 155-166.
- Krugliak** M., Zhang F., Ginsburg H. (2002). Intra erythrocytic *Plasmodium falciparum* utilizes only a fraction of the amino acids derived from the digestion of host cell cytosol for the biosynthesis of its proteins. *Mol. Biochem. Parasitol.* 119, 249–56.
- Kryston** T. B., A. B. Georgiev, P. Pissis, and A. G. Georgakilas (2011) Role of oxidative stress and DNA damage in human carcinogenesis,” *Mutat. Res.* 711 (1-2), 193–201.
- Kvach** J. T., Munguia G. y Strand S. H. (1984) Staining tissue-derived Mycobacterium leprae with fluorescein diacetate and ethidium bromide. *Int. J. Lepr. Other. Mycobact Dis.*, 52(2), 176-182.
- Lamikanra** A. A., Brown D., Potocnik A., Casals-Pascual C., Langhorne J. y Roberts D. J. (2007). Malarial anemia: of mice and men. *Blood.*, 110(1), 18-28.
- Leopardi** P., Villani P., Cordelli E., Siniscalchi E., Veschetti E., Crebelli R. (2005) Assessment of the in vivo genotoxicity of vanadate: Analysis of micronuclei and DNA damage induced in mice by oral exposure. *Toxicol. Lett.*, 158, 39-49
- Liochev** S.I. y Fridovich I. (1999) Superoxide and iron: partners in crime. *IUBMB Life*; 48: 157–161.
- Llobet**, J. M., & Domingo, J. L. (1984). Acute toxicity of vanadium compounds in rats and mice. *Toxicol. Lett.*, 23(2), 227-231
- Loiseau** P. M., Mbongo N., Bories C., Boulard, Y. y Craciunescu D. G. (2000). In vivo antileishmanial action of Ir-(COD)-pentamidine tetraphenyl borate on *Leishmania donovani* and *Leishmania major* mouse models. *Parasite*, 7(2), 103-108.
- Lowe** B. S., Joffe N. K., New L., Pedersen C., Engbaek K. y Marsh K. (1996). Acridine orange fluorescence techniques as alternatives to traditional Giemsa staining for the diagnosis of malaria in developing countries. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 90(1), 34-36.
- Marovac** Jacqueline. (2001). Investigación y desarrollo de nuevos medicamentos: de la molécula al fármaco. *Rev. Med. Chile.*, 129(1), 99-106.
- Merck Sharp & Dohme** de España. Proceso de aprobación para un fármaco. Consulta en línea en [https://www.msdsalud.es/Assets/docs/dossier\\_msd/proceso-aprobacionfarmaco.pdf](https://www.msdsalud.es/Assets/docs/dossier_msd/proceso-aprobacionfarmaco.pdf)

**Minasi** L. A. y **Willsky**, G. R. (1991). Characterization of vanadate-dependent NADH oxidation stimulated by *Saccharomyces cerevisiae* plasma membranes. *J. Bacteriol.*, 173(2), 834-841.

**Mishra** M., **Mishra** V. K., **Kashaw** V., **Iyer** A. K. y **Kashaw**, S. K. (2017). Comprehensive review on various strategies for antimalarial drug Discovery. *Eur. J. Med. Chem.*, 125, 1300-1320.

**Morita** T., **MacGregor** J.T., **Hayashi** M. (2011) Micronucleus assays in rodent tissues other than bone marrow. *Mutat.* 26(1), 223–230.

**Morton** D. B., **Jennings** M., **Buckwell** A., **Ewbank** R., **Godfrey** C., **Holgate** B., ..... y **Wilson** A. B. (2001) Refining procedures for the administration of substances. *Lab. Anim.* 35, 1-41

**Mukherjee** B., **Patra** B., **Mahapatra** S., **Banerjee** P., **Tiwari** A. y **Chatterjee** M. (2004). Vanadium-anelement of atypical biological significance. *Toxicol. Lett.*, 21, 135-143

**Mussali-Galante** P., **Rodríguez-Lara** V., **Hernández-Tellez** B., **Ávila-Costa** M. R., **Colín-Barenque** L., **Bizarro-Nevarez**, P., ...y **Díaz-Beck**, P. (2005). Inhaled vanadium pentoxide decrease gamma-tubulin of mouse testes at different exposure times. *Toxicol. Ind. Health.*, 21(7-8), 215-222.

**Norppa** H. (2004) Cytogenetic biomarkers and genetic polymorphisms. *Toxicol. Lett.*, 149, 309-334.

**Ochola** L. B., **Vounatsou** P., **Smith** T., **Mabaso** M. L. H., y **Newton**, C. R. J. C. (2006). The reliability of 11. Diagnostic techniques in the diagnosis and management of malaria in the absence of a gold standard. *Lancet Infect. Dis.*, 6(9), 582-588.

**O'Neill** P.M., **Barton**V.E., **Ward**S.A., (2010). The molecular mechanism of action of artemisinin the debate continues, *Molecules*, 15, 1705-1721.

**Pathak** V. A., **Ghosh** K. (2016). Erythropoiesis in malaria infections and factors modifying the erythropoietic response. *Anem*, 2016 (9), 310-315.

**Pérez-Cadahía** B., **Laffon** B., **Pásaro** E., y **Méndez**, J. (2004) Evaluation of PAH bioaccumulation and DNA damage in mussels (*Mytilus galloprovincialis*) exposed to spilled Prestige crude oil." *Comp Biochem Phys*; 138 (4), 453-460.

**Peters** W., **Robinson** B. L. (1992) The chemotherapy of rodent malaria. XLVII. Studies on pyronaridine and other Mannich base antimalarials. *Ann. Trop. Med. Parasitol.*, 86(5), 455–465.

**Polard** T., **Jean** S., **Merlina** G., **Laplanche** C., **Pinelli** E., y **Gauthier** L. (2011). Giemsa versus acridine orange staining in the fish micronucleus assay and validation for use in water quality monitoring. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 74(1), 144-149.

**Ramirez** P., **Eastmond** D. A., **Laclette** J. P. y **Ostrosky-Wegman**, P. (1997). Disruption of microtubule assembly and spindle formation as a mechanism for the induction of aneuploid cells by sodium arsenite and vanadium pentoxide. *Mutat. Res.*, 386(3), 291-298.

**Ramos** S., **Almeida** R. M., **Moura** J. J. y **Aureliano** M. (2011). Implications of oxidovanadium (IV) binding to actin. *J. Inorg. Biochem.*, 105(6), 777-783.

**Ramos** S., **Manuel** M., **Tiago** T., **Duarte** R., **Martins** J., **Gutiérrez-Merino** C., ...y **Aureliano**, M. (2006). Decavanadate interactions with actin: inhibition of G-actin polymerization and stabilization of decamericvanadate. *J. Inorg. Biochem.*, 100(11), 1734-1743.

**Raphemot** R., **Posfai** D. y **Derbyshire** E. R. (2016). Current therapies and future possibilities for drug development against liver-stage malaria. *J. Clin. Invest.*, 126(6), 2013-2020.

**Ravikumar** S., **Inbaneson** S. J., **Suganthi** P., **Ramasmy** G., **Venkatesan** M (2011). In vitro antiplasmodial activity of ethanolic extracts of seaweed macroalgae against *Plasmodium falciparum*. *Parasitol. Res.* 108, 1411–1416.

**Rénia** L. y **Goh**, Y. S. (2016). Malaria parasites: the great escape. *Front. Immuno.* 7 (463), 1-14.

**Rivera** N., **Marrero** P. Y., **Arán** V. J., **Martínez** C., **Malagón** F. (2013). Biological assay of a novel quinoxalinone with antimalarial efficacy on *Plasmodium yoelii yoelii*. *Parasitol. Res.*, 112(4), 1523-1527.

**Rivera** Norma, **Rojas-Lemus** Marcela, **Cano-Gutiérrez** Gumaro, **Montaño** Luis F. y **Fortoul** Teresa I., (2016) Metals as an option for protozoa treatment, (Ed.) Norma Rivera Fernández, *Antiprotozoal Drug Discovery: A Challenge that Remains*, 6: 156-179. Ciudad Sharjah, Emiratos Árabes Unidos editorial Bentham eBooksimprint

**Rodríguez-Mercado** J. J., Mateos-Nava R. A. y Altamirano-Lozano M. A. (2011) DNA damage induction in human cells exposed to vanadium oxides *in vitro*. *Toxicol in Vitro*. 25(8), 1996-2002.

**Rojas** E., Valverde M., López M.C., Naufal I., Sanchez I., Bizarro P., Lopezl. *et al.*(2000) Evaluation of DNA damage in exfoliated tear duct epithelial cells from individuals exposed to air pollution assessed by single cell gel electrophoresis assay. *Mutat. Res.*, 468, 11-17.

**Sánchez-Delgado** R. A., Navarro M., Pérez H., y Urbina J. A. (1996). Toward a novel metal-based chemotherapy against tropical diseases - Synthesis and antimalarial activity *in vitro* and *in vivo* of new ruthenium- and rhodium- chloroquine complexes. *Eur. J. Med. Chem.*, 39(5), 1095-1099.

**Schneider** B. M., Würzler F. E., Romagna F. (1995). Distinct area distribution differences of micronuclei induced by clastogenic and aneuploidogenic chemicals in the bone marrow of the CD-1 mouse. *Mutat. Res.*, 334, 81-89.

**Schlesinger** P.H., Krogstad D.J, Herwaldt B.L. (1988). Antimalarial agents: mechanisms of action, *Antimicrob. Agents. Chemother.*, 32,793-798.

**Schmid** W., (1975) The micronucleus test. *Mutat. Res.*, 31, 9–15.

**Schwarzer** E., Ludwig P., Valente E. y Arese, P. (1999). 15 (S)-hydroxyeicosatetraenoic acid (15-HETE), a product of arachidonic acid peroxidation, is an active component of hemozoin toxicity to monocytes. *Parasitol*; 41(1-3), 199-202.

**Singh** N. P., McCoy M. T., Tice R. R. y Schneider E. L. (1988) A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp. Cell. Res.*, 175(1),184-191.

**Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica (SINAVE)**, vigilancia epidemiológica del paludismo en México, Secretaria de Salud. Consulta en línea [[https://www.ssaver.gob.mx/etv/files/2015/10/Panorama-Paludismo\\_Reuni%C3%B3n-Vectores-May2017-f.pdf](https://www.ssaver.gob.mx/etv/files/2015/10/Panorama-Paludismo_Reuni%C3%B3n-Vectores-May2017-f.pdf)] última consulta 10,07, 2018

**Snow** R. W., Guerra C. A., Noor A. M., Myint H. Y., Hay S. I. (2005) The global distribution of clinical episodes of *Plasmodium falciparum* malaria. *Nature.*, 434, 214-217.

**Strauss** G. H. S. (1991) Non- random cell killing in cryopreservation: Implications for performance of the battery of leukocytes tests (BLT), I. Toxic and immunotoxic effects. *Mutat. Res.*, 252, 1 –15.

**Sturm** A., Amino R., Van De Sand C., Regen T., Retzlaff S., Renneberg A., ... y Heussler, V. T. (2006). Manipulation of host hepatocytes by the malaria parasite for delivery in to liver sinusoids. *Science*, 313, 1287–90.

**Sylke Müller** (2004) Redox and antioxidant systems of the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Mol. Biol.*, 53 (5), 1291–1305.

**Takasugi** M. (1971) An improved fluorochromatic cytotoxic test. *Trans. 12*: 148-150.

**Tappel** A. (1955).Unsaturated lipide oxidation catalyzed by hematin compounds. *J. Biol. Chem.*, 217, 721.

**Tarimo** D. S., Moshiri C., Mpembeni R. y Minjas, J. N. (1999). Field trial of the direct acridine orange method and Para Sight. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 93(5), 521-522.

**Tice** R. R., Argurell A., Anderson D., Burlinson B., Hartmann A., Kobayashi H., *et al.* (2000) Single cell gel/comet assay: guidelines for *in vitro* and *in vivo* genetic toxicology testing. *Environ. Mol. Mutagen.*, 35 (3), 206-221.

**Tinwell** H., y Ashby, J. (1989). Comparison of acridineorange and Giemsa stains in several mouse bonemarrowmicronucleus assays—including a triple dose study. *Mutat.* 4(6), 476-481.

**Uniprot-** The UniProt Consortium UniProt: the universal protein knowledge base *Nucleic Acids* (2017) Res. 45: D158-D169.

**Usende** I. L., Alimba C. G., Emikpe B. O., Bakare A. A. y Olopade, J. O. (2018). Intraperitoneal sodiummetavanadateexposureinducedsevereclinicopathologicalalterations, hepato-renal toxicity and cytogenotoxicity in Africanianrats (*Cricetomysgambianus*, Waterhouse, 1840). *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.* 1-11.

**Valko M.**, Rhodes C. J., Moncol J., Izakovic M., Mazur M. (2006) Freeradicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chem. Biol. Interact.*, 160, 1-40.

**Wang Q.**, Liu T. T., Fu Y., Wang K. y Yang, X. G. (2010). Vanadium compounds discriminate hepatoma and normal hepatic cells by differential regulation of reactive oxygen species; *J. Biol. Inorg. Chem.*, 15(7), 1087-1097.

**Warhurst D.C.**, (1986). [Antimalarial drugs: mode of action and resistance, J. Antimicrob. Chemother; 18, 51-59.](#)

**WHO** Datos preliminares- Informes de los programas nacionales del control del paludismo (2018)

**WHO** World malaria report(2015). WorldHealthOrganization.

**WHO** World malaria report(2017). Geneva: WorldHealthOrganization; 2017. Licence: CC BY-NC-SA3.0 IGO.

**Wu J. X.**, Hong Y. H. y Yang, X. G. (2016). Bis (acetylacetonato)-oxidovanadium (IV) and sodium metavanadate inhibit cell proliferation via ROS-induced sustained MAPK/ERK activation but with elevated AKT activity in human pancreatic cancer AsPC-1 cells. ; *J. Biol. Inorg. Chem.*, 21(8), 919-929.

**WWARN.** Molecular Surveyor pfmldr1 & pfcr1; (2018) Disponible en [http://www.wwarn.org/explorer/app/#filter=1&Date=2000-2017&Drug=AQ--AV--CL--CP--CQ--CQP--DAP--HL--LUM--MQ--NQ--PG--PQP--PYR--QN--SP--SX--TET&TreatmentType=act;mapset=1&lat=20.966&long=-15.91&zoom=3] Ultima consulta 12,07, 2018.

**Zwolak I.** (2015). Comparison of five different in vitro assays for assessment of sodium metavanadate cytotoxicity in Chinese hamster ovary cells (CHO-K1 line). *Toxicol Ind Health*, 31(8), 677-690.