



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

“Efecto del extracto metanólico de la corteza de *Hintonia latiflora* en la ultraestructura de las fases asexuales intraeritrocíticas de *Plasmodium yoelii yoelii*”.

TESIS

Que para obtener el título de

Biólogo

P R E S E N T A

JOSÉ ANTONIO HERNÁNDEZ APARICIO

No. De Cuenta 408084541

DIRECTORA DE TESIS:

Dra. NORMA RIVERA FERNÁNDEZ.

TUTOR INTERNO DE TESIS:

M. en C. RODRIGO ANÍBAL MATEOS NAVA.



Abril 2016

CIUDAD DE MÉXICO



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.



AGRADECIMIENTOS.

Debo agradecer de manera especial y sincera a la **Dra. Norma Rivera Fernández** por aceptarme para este proyecto. Su apoyo, su paciencia y sus conocimientos han sido invaluable.

Le agradezco también al **Biol. Armando Zepeda Rodríguez, M en C Martha Patricia Bizarro Nevares** y a **Francisco Pasos Nájera**, por haberme facilitado los medios suficientes para llevar a cabo todas las actividades propuestas durante el desarrollo de esta tesis y por brindarme su sincera amistad.

Al **M en C Rodrigo Aníbal Mateos Nava** por el interés vertido en este proyecto.

“Y a todas aquellas personas que han sido pilares en mi formación y por enseñarme que el único camino al éxito es el trabajo.”

Este trabajo se llevó a cabo en el laboratorio de Malariología del Departamento de Microbiología y Parasitología y en el Departamento de Biología Celular y Tisular de la Facultad de Medicina, UNAM.

Proyecto financiado por DGAPA PAPIIT-UNAM IA203015

DEDICATORIAS

*Esta tesis es el resultado del trabajo de varias personas que de una o de otra forma ayudaron a concluirla. Entre ellos quiero destacar en primer lugar a mi mamá **María Luisa**, que es el mejor ser humano que conozco.*

*A mis hermanos: **Miguel Ángel, Marisol y Esteban**, que siempre han estado para mí cuando más los necesite. “Gracias por alentarme siempre”.*

*A **Fabricio** por ser un verdadero amigo, que conozco desde que inicie mis estudios en la Fes Zaragoza, un amigo que pretendo conservar por siempre, así como a **Ana Laura**.*

Debo agradecer también al jurado asignado, por sus recomendaciones durante la revisión de este trabajo.

PRESIDENTE: Dra. Lucila Álvarez Barrera

VOCAL: Dra. Norma Rivera Fernández

SECRETARIO: M. en C. Rodrigo Aníbal Mateos Nava

SUPLENTE: Dr. Juan José Rodríguez Mercado

SUPLENTE: Dra. Hortensia Rosas Acevedo

“Educar no es solo impartir conocimientos. Educar es también forjar caracteres nobles, rectos y con fuertes principios, en los que no cabe la vulgaridad, la superficialidad y la arrogancia. Modificar lo que debemos hacer, por temor a que sea contraproducente o a una respuesta exagerada, significa renunciar a nuestro cometido”.

Natsume Soseki

ÍNDICE

Resumen	1
1. INTRODUCCIÓN	2
1.1 Historia de la malaria	2
1.2 Epidemiología de la malaria.....	3
1.3 Morfología de <i>Plasmodium spp</i>	4
1.3.1 Merozoíto	6
1.3.2 Anillo	8
1.3.3 Trofozoíto.....	9
1.3.4 Esquizonte.....	11
1.4 Ciclo de vida de <i>Plasmodium spp</i> en humanos.....	13
1.5 Modelo murino.....	14
1.5.1 Malaria murina.....	15
1.6 Manifestaciones clínicas en el humano	16
1.7 Tratamiento de la malaria	16
1.8 <i>Hintonia latiflora</i> , (DC) Bullock.....	18
1.8.1 Uso medicinal de <i>Hintonia latiflora</i> , (DC) Bullock.....	19
1.9 Antecedentes	20
2. JUSTIFICACIÓN	22
3. HIPÓTESIS	23

4. OBJETIVOS	23
4.1 Objetivo general.....	23
4.2 Objetivos particulares	23
5. MATERIALES Y MÉTODOS	24
5.1 Material vegetal	24
5.1.2 Obtención del extracto	24
5.2 Evaluación biológica	24
5.2.1 Animales	24
5.2.2 Parásitos	25
5.2.3 Infección de ratones CD1 con la cepa <i>Pyy</i>	25
5.2.4 Dosis y administración del extracto.....	25
5.2.5 Grupos experimentales (n=5)	26
5.2.6 Determinación de parasitemia en frotis sanguíneo.....	26
5.2.7 Microscopía Electrónica de Transmisión.....	26
5.2.8 Análisis estadístico	27
6. DISEÑO EXPERIMENTAL	28
7. RESULTADOS	29
7.1 Eficacia antimalárica del extracto metanólico de <i>Hintonia latiflora</i>	29
7.2 Efecto del extracto metanólico de <i>Hintonia latiflora</i> en la ultraestructura parasitaria	32
7.2.1 Microscopía de campo claro	32

7.2.2 Microscopía electrónica de transmisión	33
8. DISCUSIÓN	39
9. CONCLUSIÓN	43
10. LITERATURA CITADA.....	44

Resumen

Actualmente ha aumentado el uso de plantas medicinales debido a la creencia de que natural significa inocuo. Estos son tomados por los pacientes, sin prescripción médica; tal es el caso de la corteza de *Hintonia latiflora* que se consume en América y Europa debido a sus propiedades antioxidantes, para controlar la diabetes y su uso empírico reporta ser buen remedio para la malaria. Se ha evaluado la eficacia antimalárica de extractos crudos de *Hintonia latiflora* en modelo murino, donde demostró que retarda el período de patencia de los plasmodios y aumenta la sobrevivencia de los animales infectados; también se constató que es un excelente febrífugo, sin embargo, aún se desconocen muchos efectos biológicos como el que causa sobre el parásito plasmodio, por lo que en el presente estudio, se evaluó 1000 mg/kg del extracto metanólico de *Hintonia latiflora* sobre la ultraestructura parasitaria de *Plasmodium yoelii yoelii* mediante el ensayo de Peters, el cual consto de un tratamiento oral de cuatro días, cada 24 horas. Los ratones se dividieron en cuatro grupos de cinco ratones cada uno; primer grupo ratones infectados sin tratamiento, segundo grupo ratones infectados y tratados con el extracto metanólico de *Hintonia latiflora*, tercer grupo ratones infectados y tratados con el vehículo Tween 80 al 0.4% y cuarto grupo ratones infectados y tratados con 15 mg/kg de cloroquina. Como consecuencia del tratamiento, se observó disminución significativa en la parasitemia de los animales tratados en comparación con los del grupo control sin tratamiento y en la mayoría de los parásitos evaluados, los cambios ultraestructurales más evidentes fueron la desorganización y ruptura de membranas celulares, alteración en la vacuola parasitófora y depleción de ribosomas. Los parásitos intraeritrocíticos de los ratones CD1 infectados con *Plasmodium yoelii yoelii*, sufren cambios ultraestructurales severos como consecuencia de la administración oral de 1000 mg/kg del extracto metanólico de la corteza de *Hintonia latiflora*.

PALABRAS CLAVE: Malaria, *Plasmodium yoelii yoelii*, *Hintonia latiflora*, extractos, productos naturales.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Historia de la malaria

El término malaria tiene sus orígenes en el italiano medieval (*mala aria*, que significa mal aire). También se le conoce como paludismo, que proviene del latín *palus* y significa pantano. Esta connotación etimológica ilustra la forma más común en la que se suponía se adquiría la enfermedad en el pasado, que era inhalando el aire contaminado de los pantanos donde estaba presente el vector biológico (Hommel, 2007).

Charles Louis Alphonse Laveran, identificó el parásito de la malaria en 1881 cuando examinaba la sangre de un paciente que había muerto por fiebre del pantano, lo que él dedujo fue que el parásito sanguíneo había sido la causa del deceso; Laveran recibió el premio Nobel en Medicina en 1907, su descubrimiento explica los síntomas de la malaria causados por el protozoo (Mundwiler-Pachlatko y Hansen-Peter, 2013). Posteriormente investigadores como Ettore Marchiafava, buscaba demostrar que la transmisión de la malaria se efectuaba a través de la sangre de los pacientes febriles, de tal forma que le dio el nombre de *Plasmodium* (Ledermann y Valle, 2009).

El *Plasmodium* está clasificada dentro del Reino Protista, Filum Apicomplexa, Clase Aconoidasida, Orden Haemosporida, Familia Plasmodiidae, Género *Plasmodium* (Chiodini *et al.*, 2001). Se sabe que existen más de 100 especies de plasmodios que infectan mamíferos, aves y reptiles, también que la enfermedad se inicia con la inoculación del parásito por medio de la picadura del mosquito hembra del género *Anopheles*, el cual agrupa cerca de 400 especies; aunque solo tres se han confirmado como los principales vectores del paludismo humano en México: *Anopheles albimanus*, *Anopheles pseudopunctipennis* y *Anopheles vectipennis* (Casas y Bonilla, 2006).

1.2 Epidemiología de la malaria

La malaria continúa siendo la enfermedad parasitaria más importante a nivel mundial. De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud publicado en 2014, menciona que en 97 países la malaria es endémica, y se distribuye principalmente en las zonas tropicales y subtropicales del mundo. Se estima que en el año 2013, 198 millones de personas se infectaron y que de esos casos 584 000 murieron. La situación más grave ocurre en los países de África al sur del Sahara, donde los niños menores de cinco años están particularmente expuestos y es una de las principales causas de mortalidad infantil (WHO, 2014).

En México la malaria se controló a mitad del siglo pasado, pero la migración humana desde países centroamericanos donde no se ha logrado un control adecuado, representa un riesgo que pudiera favorecer la transmisión autóctona en las diversas regiones del país donde los mosquitos transmisores están presentes. Las zonas que presentan mayor riesgo son las comunidades rurales de los estados de Tabasco, Campeche, Quintana Roo, Chiapas, Oaxaca, Guerrero, Michoacán, Nayarit, Sinaloa, Jalisco, Sonora, Chihuahua y Durango (Rodríguez y Reyes, 2011).

Tradicionalmente la malaria se ha atribuido a cuatro especies de plasmodios: *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium malariae* y *Plasmodium ovale*, las cuales presentan una distribución geográfica particular: *Plasmodium falciparum* se distribuye en todas las zonas palúdicas del mundo pero predomina en África Subsahariana. *Plasmodium malariae* tiene un área de distribución similar a la de *Plasmodium falciparum* pero es mucho menos frecuente. *Plasmodium vivax* predomina en América central e India y *Plasmodium ovale* se encuentra en África y es muy raro fuera de ella (Baird, 2009). Hace más de 50 años se reportó que bajo condiciones de laboratorio, algunos plasmodios de mono se transmitían al humano (Coatney *et al.*, 1971), ahora se conoce que *Plasmodium knowlesi* está emergiendo como un patógeno zoonótico muy importante y que está siendo exportado de las zonas endémicas a otras partes del mundo a través de viajeros. La infección puede ser potencialmente propagada a través de transfusiones

sanguíneas, trasplante de medula ósea e infecciones congénitas (Carrasco y Malagón, 2011).

Cabe destacar que en todos los países las áreas maláricas endémicas corresponden a poblaciones pobres y dispersas, situadas en la periferia del desarrollo económico. En nuestro país se incluyen a los grupos Mixtecos, Zapotecos y varios grupos Mayas en el sureste mexicano (Rodríguez y Reyes, 2011).

1.3 Morfología de Plasmodium spp

Los plasmodios pertenecen al Filum Apicomplexa el cual incluye a otros protozoarios de interés médico y veterinario como *Toxoplasma gondii*, *Cryptosporidium* spp, *Isospora* spp, *Babesia* spp, *Eimeria* spp, *Sarcocystis* spp y *Neospora caninum*. Son parásitos intracelulares obligados y la mayoría se desarrollan y se replican dentro de una vacuola parasitófora. La proliferación de estos microorganismos, ocurre a través de la invasión de la célula huésped y continúa con el desarrollo y replicación de los parásitos hasta lisis de la célula. Los parásitos liberados no pueden sobrevivir extracelularmente, por lo que tienen que invadir de nuevo otras células para continuar su ciclo de vida. Todos ellos comparten algunos rasgos morfológicos como son “zoítos”, que son estadios parasitarios especializados, los cuales tienen en común una organización estructural; son alargados, se mueven por deslizamiento y poseen un complejo apical y organelos secretorios llamados roptrias, micronemos y gránulos densos que son de naturaleza proteica (Meñard, 2001).

Su estructura es mantenida por un citoesqueleto que está compuesto por microtúbulos y microfilamentos y diversas proteínas como tubulina, actina y miosina. El conjunto de microtúbulos está anclado a un anillo polar que corre de manera longitudinal por debajo del películo que es una estructura formada por la membrana plasmática y dos membranas internas y que aparentemente están involucradas en fenómenos de secreción, motilidad y evasión de la respuesta

inmune. Asociada a la membrana interna del películo existe un complejo membranoso interno que sirve de anclaje al citoesqueleto de microtúbulos (Striepen *et al.*, 2007). Las roptrias y los micronemos se encuentran exclusivamente en el extremo apical y secretan su contenido en esta zona, a diferencia de los gránulos densos que están distribuidos en todo el parásito y secretan su contenido en cualquier parte de la superficie parasitaria (figura 1).

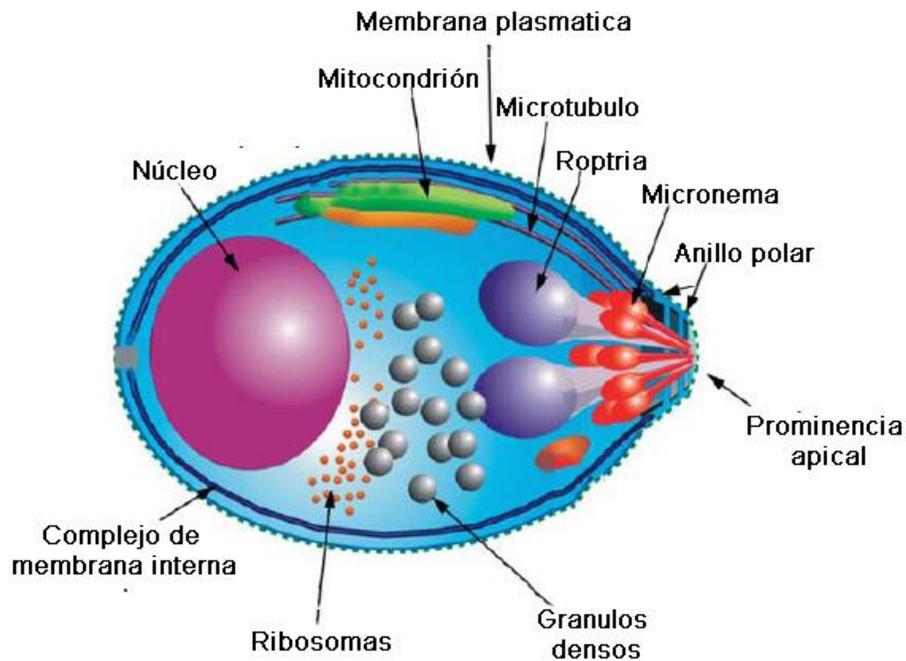


Figura 1. Principales organelos de *Plasmodium spp* en etapa de merozoíto. Tomado de Bannister y Sherman, 2009.

Las roptrias son organelos en forma de sacos alargados y los micronemos son organelos vesiculares. Las secreciones de estos organelos contienen numerosas proteínas con propiedades adhesivas y son responsables aparentemente de cuatro interacciones importantes entre los zoítos y la célula huésped:

1. Adhesión a la membrana plasmática de la célula huésped.
2. Desmantelamiento local del citoesqueleto de la membrana plasmática de la célula huésped.
3. Transformación de la membrana plasmática de la célula huésped en una vacuola parasitófora.
4. Vincular el motor de actina-miosina del parásito a la célula huésped para impulsar al zoíto dentro de la vacuola parasitófora o a la matriz extracelular.

Los gránulos densos son estructuras vesiculares que una vez que el zoíto ha entrado a su célula huésped, se mueven a la superficie del parásito y liberan su contenido para provocar una expansión de la vacuola parasitófora (Blackman y Bannister, 2001).

A continuación se describen las fases de *Plasmodium spp* en el humano:

1.3.1 Merozoíto

El merozoíto es una de las fases invasivas del plasmodio. En *Plasmodium falciparum* tienen la apariencia de un limón, son ovoides y quizás los más pequeños del género ya que miden entre 1-2 μm (Bannister y Mitchell, 2009; Cowman y Crabb, 2006). A pesar de su pequeño tamaño, cada merozoíto contiene toda la maquinaria necesaria para invadir y alimentarse de su hospedero (Bannister *et al.*, 2000).

En el ápice del merozoíto, se localizan los organelos secretores, numerosos ribosomas libres, un mitocondrion y un plástido trimembranal que está anclado a la red subpelicular de los microtúbulos. En la zona localizada entre las roptrias y el núcleo se observa una gran cantidad de ribosomas libres, el núcleo está ubicado basalmente y contenido dentro de una envoltura nuclear; presenta poros, la

cromatina es homogénea y no existe nucléolo (Bannister y Sherman, 2009). Las roptrias del merozoíto miden 650 x 300 nm, los micronemos 120 x 40 nm y los gránulos densos menos de 80 nm. Después de la invasión, los gránulos densos del merozoíto se mueven hacia la superficie del parásito y liberan su contenido dentro de la vacuola parasitófora (Atkinson y Aikawa, 1990)

La cantidad de citoesqueleto en el merozoíto de *Plasmodium falciparum* es mínima, presenta solamente dos a tres microtúbulos y tres anillos polares de naturaleza proteica que están anclados al borde apical del películo. El merozoíto también presenta actina G y F (Tardieux *et al.*, 1998).

La invasión del merozoíto inicia con la adhesión y reorientación del ápice hacia la membrana del eritrocito, formando una unión estrecha e irreversible (Gilson y Crabb, 2009). Esta unión permite que tenga un punto de tracción y pueda desplazarse al interior del eritrocito (figura 2). Conforme avanza el proceso de invasión, la membrana del eritrocito forma una vacuola parasitófora que será el nicho intracelular del parásito en la célula huésped. El proceso de invasión se completa cuando se cierra la unión estrecha sellando la membrana plasmática de la célula huésped y la membrana de la vacuola parasitófora; este proceso se lleva a cabo en aproximadamente un minuto (Gilson y Crabb, 2009; Zuccala y Baum, 2011).

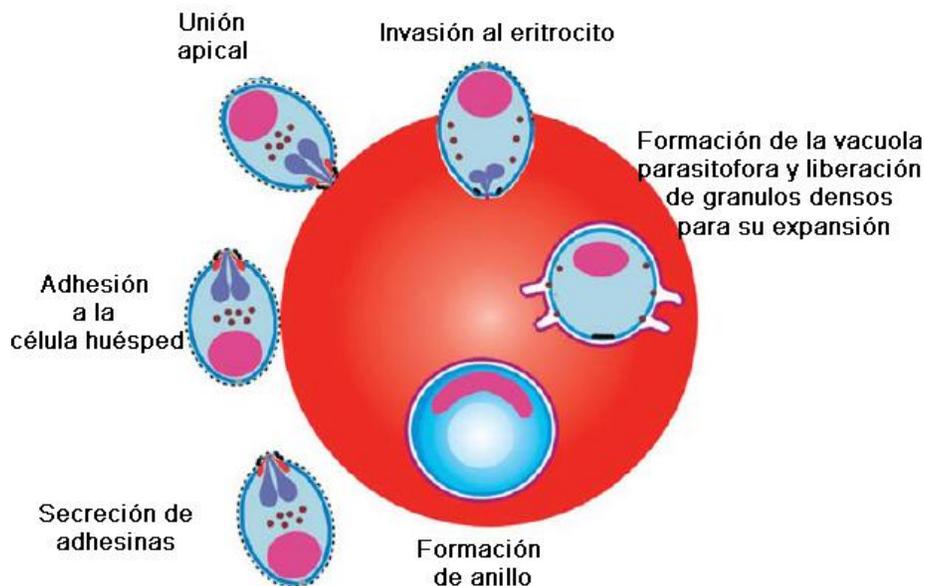


Figura 2. Diagrama de la invasión del merozoíto al eritrocito. Tomado de Bannister y Sherman, 2009.

1.3.2 Anillo

Después de la invasión, el merozoíto se transforma en una fase llamada anillo o también conocido como trofozoide, el cual presenta una apariencia plana o discoidal y posee un citoplasma grueso, núcleo, mitocondrion, plástido, varios ribosomas, retículo endoplásmico liso y rugoso, y un pequeño cuerpo de Golgi. El núcleo presenta forma discoidal (figura 3). Debido al grosor del perímetro del trofozoide y a la posición del núcleo en la periferia celular, el parásito semeja un anillo cuando se tiñe con tinción de Giemsa y se observa al microscopio de luz (Elliot *et al.*, 2007).

El anillo se alimenta de pequeñas porciones del citoplasma del eritrocito a través de un citostoma y digiere el material ingerido en una vacuola digestiva. El grupo hemo (ferriprotoporfirina IX) es un derivado del catabolismo de la hemoglobina

presente en el citoplasma del eritrocito, es convertido en la vacuola digestiva del parásito en cristales de hemozoína o también llamado pigmento malárico, que perduran por toda la vida del parásito (Hanssen *et al.*, 2010). En etapas tempranas del desarrollo del anillo, se pueden apreciar en el citoplasma pequeñas vacuolas que pueden derivar de un proceso de endocitosis. A medida que el anillo crece, la vacuola parasitófora se alarga y desarrolla prolongaciones digitiformes y vesículas que alcanzan la membrana del eritrocito. Eventualmente, el anillo cambia de forma y se convierte en un trofozoide más grueso e irregular (Bannister *et al.*, 2000).

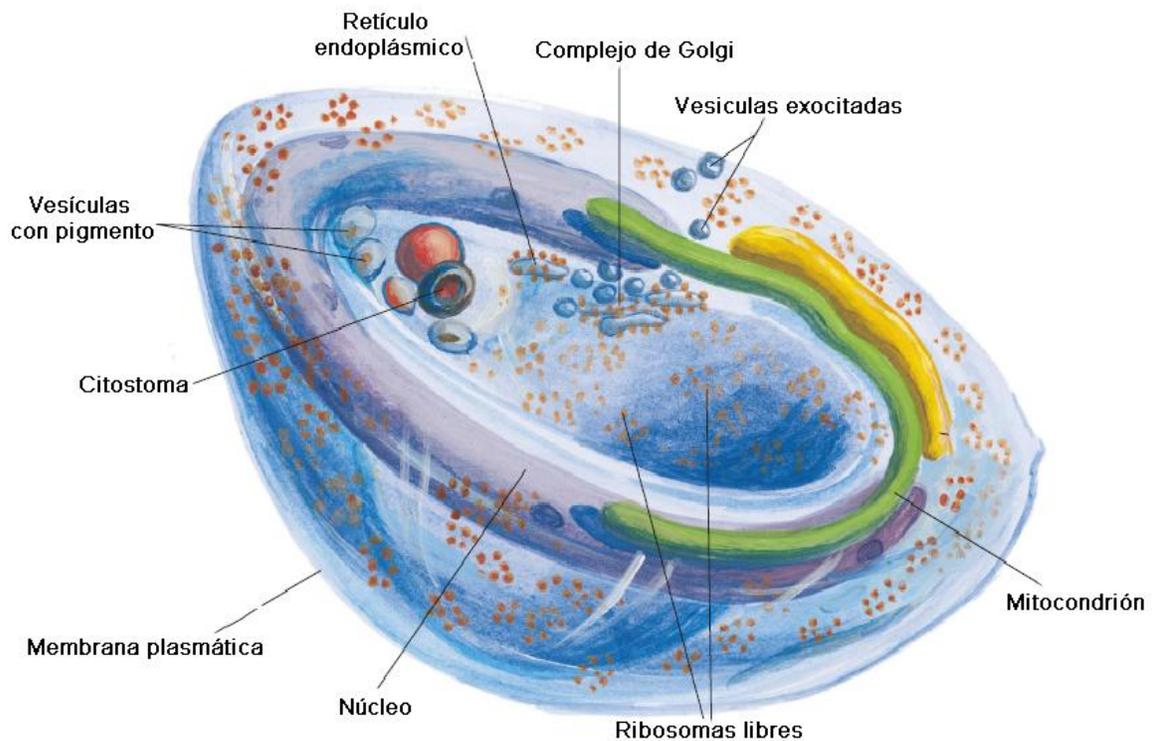


Figura 3. *Plasmodium spp* en etapa de anillo teñido con Giemsa, así como sus principales organelos. Tomado de Bannister y Sherman, 2009.

1.3.3 Trofozoíto

La diferencia morfológica entre un anillo y un trofozoíto, radica en el tamaño y la forma del parásito ya que no existen cambios perceptibles en su interior. El

número de ribosomas libres aumenta y el retículo endoplásmico se alarga, ambos cambios denotan el incremento de síntesis de proteínas en estas estructuras. El plástido desarrolla complejos espirales de membrana que entran en contacto con el pigmento vacuolar y con las membranas de otros organelos, este contacto quizás indique las interacciones metabólicas que se llevan a cabo dentro del parásito (Bannister *et al.*, 2000).

El trofozoíto se alarga y en su superficie aparecen unas protuberancias e invaginaciones profundas de forma tubular. Algunas de estas protuberancias se extienden hasta el citoplasma del eritrocito en forma de espirales que contienen restos del citoplasma del parásito. La membrana de la vacuola parasitófora forma prolongaciones que llegan hasta la membrana del eritrocito donde se aprecian como manchas en el microscopio de luz y reciben el nombre de manchas de Maurer; están involucradas en el transporte de sustancias entre el parásito y el eritrocito y tienen la capacidad de sintetizar esfingolípidos (Lauer *et al.*, 1995).

En esta etapa del desarrollo del parásito, el retículo endoplásmico prolifera considerablemente, el complejo de Golgi incrementa su tamaño y complejidad y se observa incremento en el tráfico de sustancias al exterior. El mecanismo de exportación de proteínas del eritrocito hacia el parásito es incierto, pero algunas proteínas probablemente realizan su síntesis en el retículo endoplásmico rugoso y pasan a través del complejo de Golgi dentro de vesículas citoplasmáticas, que son exocitadas hacia la vacuola parasitófora. Algunas de estas proteínas, se unen al citoesqueleto y a la membrana del eritrocito y forman pequeñas elevaciones angulares en la superficie del eritrocito. Esos cambios paralelamente incrementan la selección adhesiva de la membrana del eritrocito, responsable de la adhesión del trofozoíto y el esquizonte al endotelio de los vasos sanguíneos, figura 4 (Bannister y Sherman, 2009).

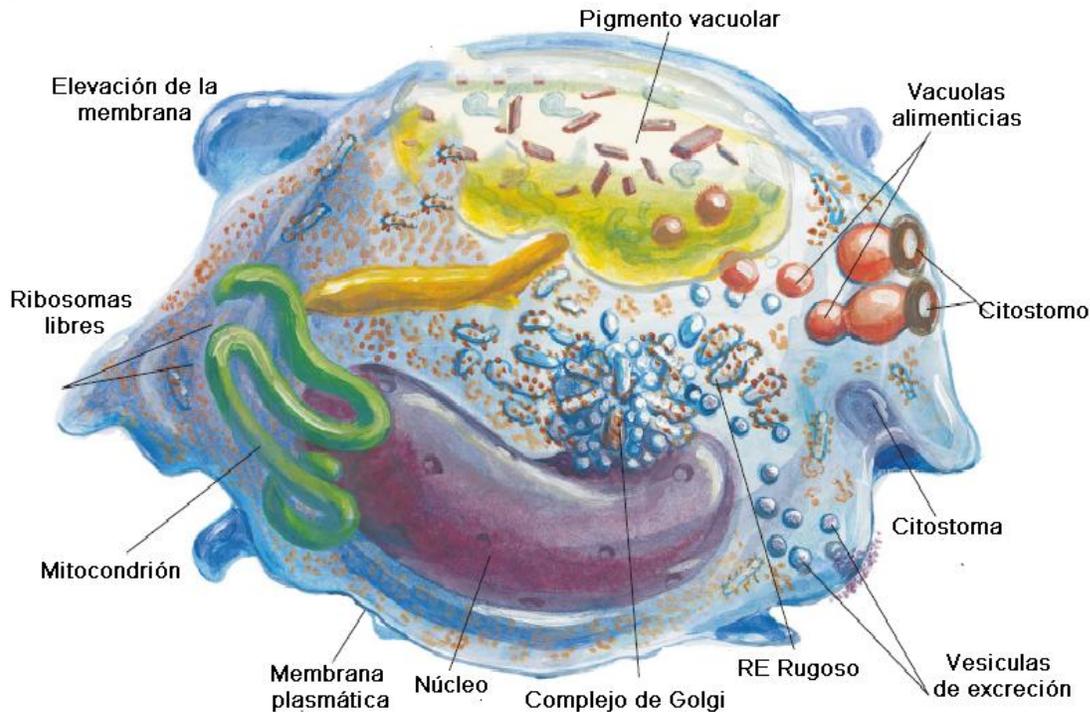


Figura 4. Trofozoito con forma irregular, se observa un incremento de tamaño y aumento en la síntesis de proteínas. Tomado de Bannister y Sherman, 2009.

1.3.4 Esquizonte

Un esquizonte se puede definir como un parásito intraeritrocítico que está en división mitótica constante, la síntesis de algunas moléculas requeridas para la multiplicación parasitaria, incluyendo el DNA; inician en la fase de trofozoito (Bannister *et al.*, 2003). En la etapa de esquizonte, existen cambios estructurales en la membrana del eritrocito infectado que se aprecian en forma de protuberancias de naturaleza proteica que son exportadas del parásito a su superficie (Bannister *et al.*, 2000).

Los parásitos continúan alimentándose de hemoglobina hasta que abandonan la célula huésped, agotando casi por completo la hemoglobina del eritrocito aproximadamente un 80%, lo que trae como consecuencia la agregación de cristales de hemozoína al pigmento vacuolar que queda compactado en una masa densa y redonda (Hanssen *et al.*, 2010). La exportación de proteínas continúa

hasta finales del ciclo de vida del esquizonte. La división nuclear se acompaña de numerosos cambios citoplasmáticos, se observa una gran proliferación de retículo endoplásmico rugoso y ribosomas libres en todo el parásito, multiplicación del mitocondrion y plástido y la acumulación de una o más vacuolas lipídicas. Esta fase es seguida por un centro de creación de merozoítos, en el que varios parásitos son ensamblados, iniciando por sus organelos apicales. Al final de la esquizogonia, se producen alrededor de 16 merozoítos (Figura 5). Finalmente la membrana parasitófora y la membrana del eritrocito se rompen, en un evento probablemente desencadenado por secreciones de los organelos apicales del merozoíto. El parásito esta ahora listo para infectar eritrocitos sanos (Bannister *et al*, 2000).

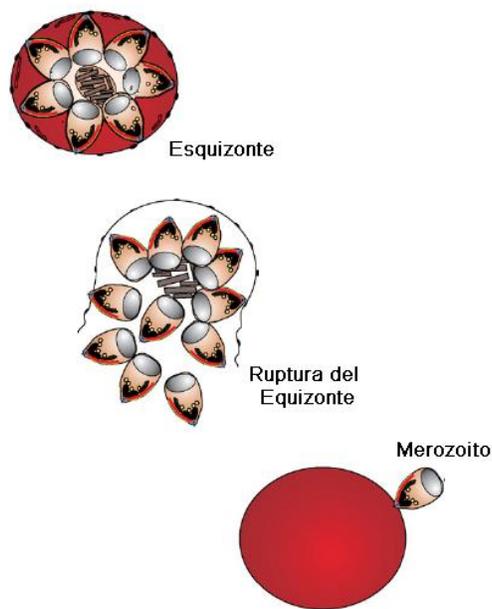


Figura 5. Diagrama de un esquizonte maduro y liberación de merozoítos, para iniciar la invasión al eritrocito. Tomado de Tilley *et al.*, 2011.

1.4 Ciclo de vida de *Plasmodium spp* en humanos

El parásito Apicomplexa causante de la malaria, presenta estadios de vida extracelular e intracelular, la infección se inicia con un vector que infecta a varios tipos de hospederos como mamíferos, aves y reptiles. En el humano, la infección inicia con la picadura del mosquito hembra del género *Anopheles* que contiene en sus glándulas salivales los esporozoítos del parásito (Sinnis y Zavala, 2012).

Después de inoculados, los esporozoítos móviles, entran al sistema circulatorio, llegan al hígado e invaden a los hepatocitos, en esta etapa la infección es asintomática y dura de 5 a 17 días (Zurzate *et al.*, 2014). Los esporozoítos llevan a cabo una esquizogonia en los hepatocitos de la que se liberaran miles de merozoítos al torrente sanguíneo para invadir eritrocitos e iniciar el ciclo intraeritrocítico causante de las manifestaciones clínicas de la malaria (Prudencio *et al.*, 2006; Sand *et al.*, 2005). El ciclo de replicación del parásito dentro del eritrocito es corto puede durar 24,48 o 72 horas, dependiendo de la especie de plasmodio (Zurzate *et al.*, 2014).

En el caso de una infección por *Plasmodium vivax* y *Plasmodium ovale*, los parásitos pueden permanecer en estado de latencia en forma de hipnozoítos dentro de los hepatocitos, los cuales pueden reactivarse hasta años después de la infección inicial. El merozoíto dentro del eritrocito, formará un anillo, posteriormente un trofozoíto y finalmente un esquizonte en el que se desarrollarán más parásitos invasivos (merozoítos), que serán liberados de nuevo a la circulación sanguínea para invadir más eritrocitos o para formar gametocitos los cuales serán succionados por el vector (Walker *et al.*, 2014).

En el intestino del mosquito *Anopheles* hembra los gametocitos son transformados en gametos haploides que después de la fertilización, dan como resultado un cigoto diploide que forma un ooquineto, que atraviesa el epitelio del intestino del mosquito, se hospeda en el homocelo y forma el oocisto, que crece y se desarrolla para producir a los esporozoítos que migran hacia las glándulas salivales del mosquito, figura 6 (Sibley, 2004).

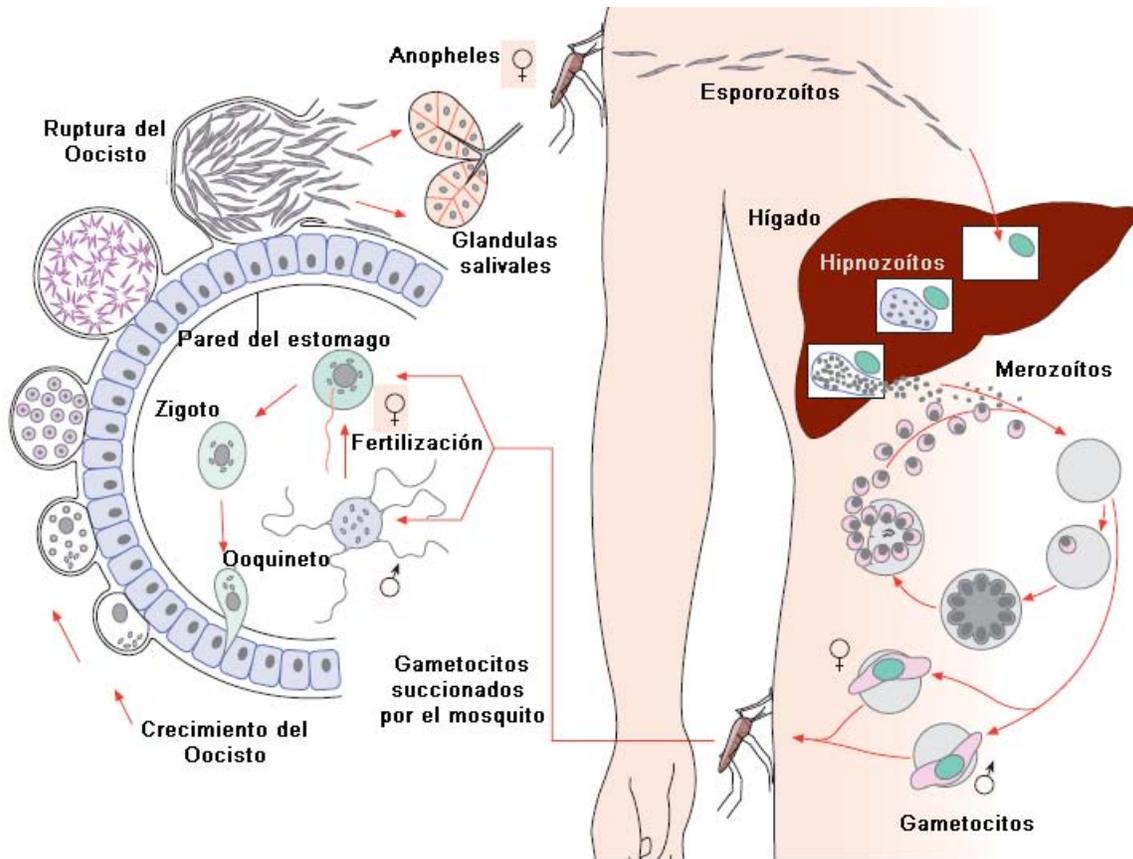


Figura 6. Fases del ciclo de vida de *Plasmodium* spp. Tomado de Bannister y Sherman, 2009.

1.5 Modelo murino

El ratón perteneciente a la orden Rodentia del género y especie *Mus musculus* es el más utilizado en la investigación. Las áreas en las que es más usado es la inmunología, toxicología, metabolismo, biología del desarrollo, diabetes, cáncer y estudios cardiovasculares (Sucko *et al.*, 2001).

Para la medicina experimental las ventajas que ofrece son:

- Al tratarse de un mamífero, gran parte de sus proceso bioquímicos son similares a las del hombre.

- Tienen un tiempo generacional muy corto, alcanza la pubertad entre las 6 y 8 semanas, son prolíficos y se adaptan fácilmente a la vida en el bioterio, lo que permite controlar las variables ambientales.
- Tiene uno de los genomas mejor estudiados.
- Existe una gran cantidad de líneas genéticamente definidas, como las consanguíneas y congénitas, además de miles de mutaciones y un gran número de rearrreglos cromosómicos disponibles.
- Es el único animal que posee sistemas eficientes de cultivo de células embrionarias pluripotenciales, lo que permite generar mutaciones dirigidas.

(Benavides y Guenet, 2000).

1.5.1 Malaria murina

El parásito que provoca la malaria murina fue aislada de ratones salvajes entre los años de 1948 y 1974, de cinco diferentes países: Camerún, República Centroafricana, Congo, Zaire y Nigeria. Desde su descubrimiento *Plasmodium berghei*, *Plasmodium chabaudi*, *Plasmodium vickei* y *Plasmodium yoelii yoelii* se han convertido en el principal modelo de estudio de la malaria. Se ha probado la utilidad de estos parásitos en diversas interacciones parasito-hospedero, así como en su control, infecciones dinámicas y la respuesta inmune de la enfermedad (Killick, 1978).

En el caso de *Plasmodium yoelii yoelii* fue aislada alopátricamente de *Plasmodium berghei*, se desarrolla en condiciones óptimas en Camerún y al oeste de Nigeria. Es usado principalmente para analizar la resistencia a drogas, para estudiar la bioquímica y la biología molecular de los parásitos de la malaria (Carlton *et al.*, 2001).

1.6 Manifestaciones clínicas en el humano

La incidencia de la malaria es similar en los hombres y en las mujeres pero en los varones las infecciones son más severas y tienen mayor mortalidad, esto sugiere que la circulación de hormonas sexuales interfieren en el dimorfismo sexual de esta enfermedad (Landgraf *et al.*, 1994).

El estado intraeritrocítico del parásito es el responsable de los síntomas clínicos. Cuando esta enfermedad no es tratada, la infección produce síndromes severos y causa la muerte del individuo (Haldar *et al.*, 2007; Tilley *et al.*, 2011).

En la malaria no complicada, inicialmente se presenta fiebre, náuseas, cefalea y escalofríos. Las complicaciones clínicas se presentan en adultos y en niños, que la mayoría de las veces permanecen sin tratamiento por varios días, o que no han tenido contacto previo con el parásito o se encuentran en estado de inmunocompromiso (Pongponrath *et al.*, 2012).

La malaria complicada es una enfermedad multiorgánica que se manifiesta principalmente como malaria cerebral, malaria pulmonar, malaria placentaria, insuficiencia renal aguda y acidosis metabólica (Mishra y Wies, 2009; Elias *et al.*, 2012).

En el cerebro afecta el sistema nervioso central y puede ocasionar coma y muerte del paciente. En los pulmones se manifiesta principalmente con disnea, tos, estertores y edema pulmonar. En mujeres embarazadas se asocia con abortos, mortinatos, restricción de crecimiento fetal y partos prematuros (Taylor *et al.*, 2012; WHO, 2013).

1.7 Tratamiento de la malaria

El primer fármaco empleado como tratamiento eficaz para combatir la malaria fue la corteza del árbol Cinchona, que contiene el alcaloide quinina. La quinina se continuó utilizando como el único tratamiento para esta enfermedad por más de tres siglos, hasta que en 1940 se introdujo la cloroquina que reemplazó a la

quinina, por poseer menos efectos colaterales y por lo tanto ser mejor tolerada. Se sabe que desde el año 350, los chinos utilizaban la planta del Qin hao (*Artemisa annua*) de forma efectiva para el tratamiento de la malaria, planta de donde se deriva la artemisinina, que ha demostrado ser altamente efectiva contra las cepas de *Plasmodium falciparum* resistentes a la cloroquina (Maude *et al.*, 2009).

Por lo que respecta a la malaria causada por *Plasmodium vivax*, el tratamiento de elección para la cura radical, a pesar de cierto porcentaje de recaídas, es primaquina + cloroquina. Las combinaciones de fármacos basadas en artemisinina parecen ser equivalentes a la cloroquina y se recomiendan ante casos de *Plasmodium vivax* resistentes a la cloroquina. En la actualidad la primaquina es el único fármaco disponible para tratar las formas hepáticas llamados hipnozoítos (WHO, 2014). Las artemisininas como la dehidroartemisinina-piperquina es la combinación más estudiada, con un efecto profiláctico postratamiento de hasta seis semanas. Otras combinaciones utilizadas son: artemeter–lumefantrina, artesunato–amodiaquina, artesunato–mefloquina y artesunato–sulfadoxina–pirimetamina (Meshnick, 2002).

En México el tratamiento para *Plasmodium falciparum* según la NOM-032-SSA2-2002 es la cloroquina aun que se sugiere individualizar al paciente y decidir un ajuste terapéutico en base a su evolución. Actualmente, se dispone de la combinación de artesunato y mefloquina en una sola tableta para el tratamiento de la malaria no complicada (Gogtay *et al.*, 1999; Whitty *et al.*, 2008; WHO, 2013).

Algunos de los antimaláricos más comúnmente utilizados se describen a continuación:

Fármaco	Acción	Cita
Cloroquina	Síntesis de DNA y RNA, degradación de hemoglobina.	Olliaro, 2001; Egan, 2008.
Quinina	Vacuola digestiva y degradación de hemoglobina.	Davies <i>et al.</i> , 1975.
Primaquina	Actúa en el mitocondrion de hipnozoitos y gametocitos.	Idowu <i>et al.</i> , 1995.
Mefloquina	Transporte de hemoglobina y vacuola digestiva.	Olliaro, 2001.
Halofantrina/Lumenfantrina	Formación de hemozeína.	Sánchez <i>et al.</i> , 2008; McGready <i>et al.</i> , 2008.
Artemisinina	Inhibe la degradación de hemoglobina.	Meshnick, 2002.
Atovaquona y Proguanil/Dapsona.	Inhibe la cadena de transporte.	Joy <i>et al.</i> , 2003.
Clindamicina, Doxiciclina y Azitromicina.	Inhiben la síntesis de proteínas.	Dharia y <i>et al.</i> , 2010; Krause <i>et al.</i> , 2000.

1.8 Hintonia latiflora, (DC) Bullock

Hintonia latiflora es un árbol mexicano perteneciente a la familia de las Rubiaceas, cuyo nombre del género honra al Ingles George B. Hinton quien emigró a México y realizó notables colecciones botánicas en Guerrero, el Estado de México y Michoacán (figura 7). Es de talla pequeña mide entre 6 y 8 m de altura máxima, con crecimiento rápido sus ramas son de color gris o café muy amargas de

corteza color café-rojiza, crece en un clima cálido-templado, entre 80 y 1200 metros sobre el nivel del mar. Tiene un follaje caducifolio; hojas simples, opuestas y ovaladas, presentas flores de color blanco, fragantes; flores solitarias, bisexuales; cáliz simpétalo con lóbulos, corola simpétala que florece en agosto (López *et al.*, 2011).

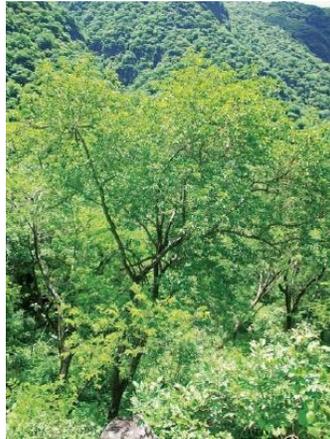


Figura 7. Árbol de *Hintonia latiflora*, (DC) Bullock. Tomado de López *et al.*, 2011.

1.8.1 Uso medicinal de Hintonia latiflora, (DC) Bullock

En México la eficacia de *Hintonia latiflora* en el uso contra enfermedades infecciosas, ha hecho que sea utilizada de manera empírica, un ejemplo de esta afirmación es que en el código florentino, del siglo XVI la refiere como diurético y eupéptico (Biblioteca digital de la medicina tradicional mexicana, 2009).

En la actualidad su corteza extremadamente amarga es utilizada para tratar la diabetes tipo 2. Además la aplicación de 20 g diarios de la tintura obtenida de la corteza en pacientes con malaria ha presentando resultados satisfactorios. También se ha demostrado que actúa de manera positiva en contra del dengue y que es un excelente antinociceptivo (Cristians *et al.*, 2009).

1.9 Antecedentes

Sabemos que la población mundial ha hecho uso de plantas medicinales desde tiempos ancestrales, en la actualidad se estima que aproximadamente el 60% de la población las usa como primer elección para tratarse (Djeussi *et al.*, 2015). En la malaria, la herbolaria nos ha proporcionado dos de los fármacos más utilizados para su control y tratamiento: la quinina y la artemisinina (Maude *et al.*, 2009).

La propagación de la resistencia farmacológica a la malaria es la clave en la complejidad del control de esta parasitosis cuyo pilar sigue siendo la quimioterapia, debido a que no existen hasta el momento vacunas efectivas (Bagavan *et al.*, 2011; Kesera *et al.*, 2013). Derivado de esto el desarrollo científico actual en el campo farmacéutico ha resurgido el interés por las plantas medicinales y las sustancias naturales que tienen actividad biológica, puesto que entre otros factores, el diseño racional de fármacos *in silico* ha resultado más complicado de lo que se esperaba (Prudencio *et al.*, 2006).

También hay que mencionar que los tratamientos antimaláricos tienen un costo elevado y no se encuentran fácilmente por lo que la mayoría de las personas que viven en zonas endémicas tienen que hacer uso de los remedios naturales para tratar esta enfermedad (Muregi *et al.*, 2011).

En México existen alrededor de 4500 especies de plantas medicinales para tratar diversas enfermedades de acuerdo a un reporte hecho por la Universidad Autónoma de Chapingo (Pérez y Lugo, 2009). Algunas de estas plantas han sido utilizadas empíricamente como antipalúdicos por poblaciones en su mayoría rurales. Tal es el caso de *Hintonia latiflora*, llamada comúnmente copalquín, copalchi, palo amargo, palo amargoso y huetetillo (Biblioteca digital de la medicina tradicional mexicana, 2009). La corteza de esta planta está siendo utilizada sin prescripción médica como hipoglicemiante y antioxidante y en los datos empíricos de su uso rural se describe que posee acción febrífuga y antimalárica; en España y Alemania es comercializada en presentación de cápsulas que contienen 1000 mg de corteza micronizada (Bruguera *et al.*, 2007).

Ahora se sabe que la corteza contiene un aceite fijo, resina neutra y ácido, colorante y taninos, además se han identificado las 5-beta-galactoil-3'-4'-dihidroxi-7-metoxi-4-fenil-cumarina, el derivado acetilado en 6', el derivado monohidroxilado en 4' y el 5-beta-glucósido, además de la 5-beta-glucosil-3'-4'-7-trihidroxi-4-fenil-cumarina; el flavonoide 7-metil-luteolín y el triterpeno 3-beta-glucosil-23-24-dihidroxi-cucurbitacina (Sociedad Química de México, 2007). Argotte y colaboradores (2006) describieron la actividad antimalárica *in vitro* contra *Plasmodium falciparum* de una cumarina (4-fenil-cumarina) aislada a partir de la corteza de *Hintonia latiflora*.

Recientemente se evaluó la eficacia *in vivo* del extracto metanólico de *Hintonia latiflora* en un modelo de malaria murino; el extracto demostró una buena eficacia febrífuga y antiparasitaria a una dosis oral de 1200 mg/kg y no afectó la viabilidad celular (Rivera *et al.*, 2014), sin embargo, se desconoce el efecto del extracto en el parásito.

2. JUSTIFICACIÓN

La actividad antimalárica y composición química de *Hintonia latiflora* han sido evaluadas recientemente, sin embargo, su actividad biológica tiene que ser estudiada en detalle en beneficio de las personas que la consumen. Hasta el momento no se conoce el efecto que pueda tener la corteza de la planta en el parásito por lo que en el presente estudio, se identificaron mediante microscopía electrónica de transmisión, los cambios ultraestructurales de las fases intraeritrocíticas de *Plasmodium yoelii yoelii* como consecuencia del tratamiento con el extracto metanólico de *Hintonia latiflora*.

La microscopía electrónica de transmisión, es una herramienta sumamente útil en la evaluación de nuevos fármacos ya que mediante esta, se pueden observar evidencias morfológicas de los microorganismos tratados que pueden orientar hacia posibles mecanismos de acción (Cacciorate *et al.*, 2015; Ramírez-Granillo *et al.*, 2015). El estudio de los cambios ultraestructurales en *Plasmodium yoelii yoelii* como consecuencia del tratamiento con el extracto, permitirá elucidar un posible mecanismo de acción del extracto en el parásito y aportar algunas de las bases preliminares para el aislamiento de posibles moléculas puras y así desarrollar un compuesto líder que a su vez permita el diseño y síntesis de moléculas útiles en la terapéutica antimalárica.

3. HIPÓTESIS

El tratamiento oral de los ratones CD1 infectados con *Pyy* tratados con el extracto metanólico de la corteza de *Hintonia latiflora* a dosis de 1000 mg/kg, provocará un daño ultraestructural en las membranas y organelos de las fases asexuales intraeritrocíticas del parásito.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo general

Determinar los cambios ultraestructurales de *Pyy* como consecuencia del tratamiento con el extracto metanólico de *Hintonia latiflora*.

4.2 Objetivos particulares

- Recolecta de *Hintonia latiflora* en el estado de Jalisco donde se cita su existencia.
- Realizar la identificación taxonómica de la especie a evaluar en el instituto de Biología de la UNAM.
- Obtener el extracto metanólico a partir de la corteza de *Hintonia latiflora*.
- Infectar a los ratones CD1 con *Pyy* y tratarlos vía oral con 1000 mg/kg del extracto metanólico de *Hintonia latiflora*.
- Obtener muestras sanguíneas a partir de los ratones infectados y tratados con el extracto.
- Realizar frotis sanguíneos para obtener el porcentaje de parasitemia de los animales infectados y tratados con el extracto.
- Procesar las muestras sanguíneas para microscopía electrónica de transmisión y así poder comparar los cambios ultraestructurales como resultado del tratamiento del extracto con los parásitos no tratados.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Material vegetal

La recolecta de la especie *Hintonia latiflora* se realizó en la Estación de Biología Chamela del Instituto de Biología de la UNAM. La identificación taxonómica se realizó en el Herbario del Instituto de Biología de la UNAM, con numero de recolecta 7772.

5.1.2 Obtención del extracto

La obtención del extracto metanólico de *Hintonia latiflora* se llevó a cabo en el Departamento de Ciencias Naturales de la UAM Cuajimalpa.

Una vez colectada la planta se transportó a la ciudad de México, posteriormente se separó la corteza, hojas y frutos para su desecación en un cuarto a 37°C. 100 g de la corteza de la planta se sometió a un sistema de extracción continuo solido-liquido-liquido por un lapso de tiempo variable (48-72 horas), utilizando como disolvente metanol. Transcurrido ese tiempo, se eliminó el exceso de disolvente empleando un rotavapor hasta secar el extracto (Andrade-Cetto et al., 2008). El extracto metanólico fue donado por el Departamento de Ciencias Naturales de la UAM Cuajimalpa.

5.2 Evaluación biológica

Los ensayos de evaluación biológica se realizaron en el Laboratorio de Malariología del Departamento de Microbiología y Parasitología y en el Departamento de Biología Celular y Tisular de la Facultad de Medicina, UNAM.

5.2.1 Animales

Se utilizaron 20 ratones machos CD1 de 30 g de peso corporal, que corresponden a una edad de 6 a 8 semanas. El manejo de los animales de laboratorio se realizó en base a los lineamientos internacionales, institucionales y en base a la Norma Oficial Mexicana (NOM-062-Z00-1999). El uso de animales en el presente estudio

fue aprobado por la Comisión de Ética e Investigación de la Facultad de Medicina, UNAM para el proyecto DGAPA-PAPIIT IA203015 y CONACyT 182003.

5.2.2 Parásitos

Se utilizaron parásitos de la cepa *Pyy* para quienes la cloroquina es mortal, fue obtenida de la Escuela de Medicina Tropical de Londres y mantenida en pasajes sucesivos ratón-ratón en el Laboratorio de Malariología del Departamento de Microbiología y Parasitología de la Facultad de Medicina.

5.2.3 Infección de ratones CD1 con la cepa *Pyy*

La infección de *Pyy* en los ratones CD1 se llevó a cabo vía intraperitoneal, la cual contenía 0.25 mL de sangre total de donadores infectados con 30% de parasitemia.

5.2.4 Dosis y administración del extracto

La dosis utilizada en el estudio se obtuvo a partir de un ensayo previo de toxicidad aguda en la especie ratón (Rivera et al., 2014). El extracto se administró por vía oral utilizando una sonda orogástrica de acero inoxidable del número 18; se evaluó la dosis de 1000 mg/kg del extracto metanólico de *Hintonia latiflora* disuelto en tween 80 al 0.4% en un volumen final máximo de 250 µL por ratón. El tratamiento se realizó en base al ensayo de Peters *et al.*, (1987), durante 4 días y cada 24 horas, los animales de los grupos tratados recibieron una dosis del extracto o del vehículo, administrando la primera dosis a las 2 horas postinfección. Se utilizó cloroquina oral (15 mg/kg) como fármaco de referencia.

5.2.5 Grupos experimentales (n=5)

1. Ratones CD1 infectados con *Pyy*.
2. Ratones CD1 infectados con *Pyy* y tratados con tween 80 al 0.4%.
3. Ratones CD1 infectados con *Pyy* y tratados con 1000 mg/kg del extracto metanólico de *Hintonia latiflora*.
4. Ratones CD1 infectados con *Pyy* y tratados con cloroquina, 15 mg/kg.

5.2.6 Determinación de parasitemia en frotis sanguíneo

La infección de *Pyy* sobre los ratones CD1 se determinó a partir de frotis sanguíneos de sangre periférica extraída de la vena caudal de los ratones infectados al día 6 postinfección. Se dejó secar y posteriormente se fijaron con metanol al 100%, después se tiñeron con una solución amortiguadora con pH de 7.2 y con colorante de Giemsa al 100 % en relación 9:1 respectivamente, por 30 minutos. Se lavó con agua destilada, se dejó secar al aire y se observaron al microscopio de luz con el objetivo de inmersión. Se contaron eritrocitos sanos e infectados, hasta completar 1000 células y se calculó el porcentaje de eritrocitos parasitados:

$$\% \text{ de parasitemia} = \frac{\text{No. de parasitos}}{1000 \text{ células.}} \times 100$$

5.2.7 Microscopía Electrónica de Transmisión

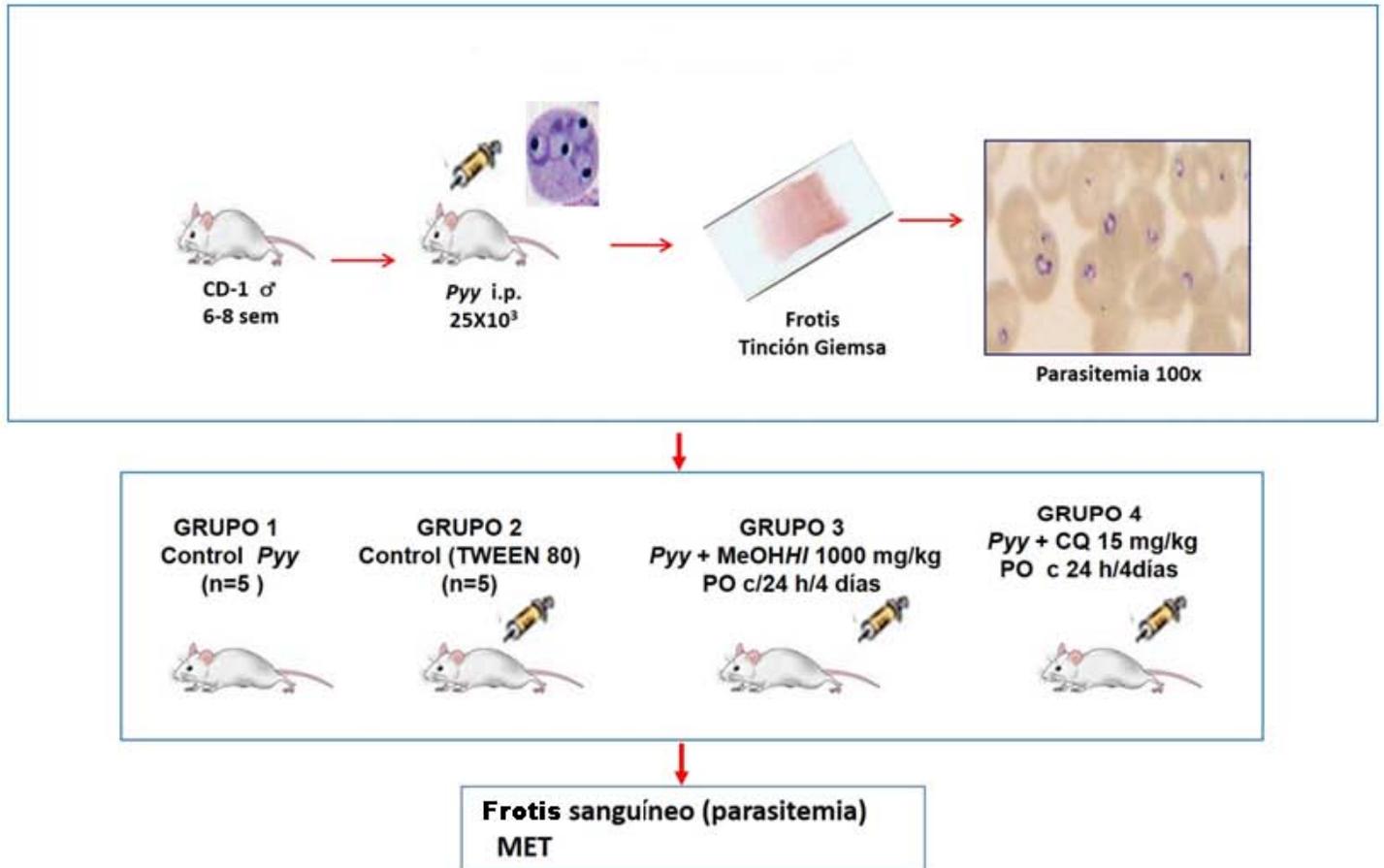
La obtención de muestras sanguíneas para el estudio de la ultraestructura parasitaria se realizó a partir de la sangre periférica de la vena caudal de los ratones la cual se obtuvo a los seis días postinfección. Se obtuvieron 25 μ de sangre completa en 2.5 μ de citrato de sodio como anticoagulante por animal al día 6 postinfección. Posteriormente las muestras se fijaron con glutaraldehído al

2.5% en solución amortiguadora de cacodilatos durante 1 hora para posteriormente ser fijadas en tetraóxido de osmio al 1% en solución amortiguadora de cacodilatos por 30 minutos a 4° C y 30 minutos a temperatura ambiente. Finalmente fueron deshidratados en concentraciones ascendentes de etanol (50, 60, 70, 80, 90 y 100%) e infiltradas en resina epóxica Araldita 6005 durante 48 horas a 60°C. Se obtuvieron cortes ultrafinos 0.2 μ que se contrastaron con uranilo y plomo y se observaron en un microscopio electrónico de transmisión marca Zeiss modelo EM-10. Se obtuvieron micrografías de transmisión de las fases asexuales intraeritrocíticas de los diferentes grupos y se realizó una comparación morfológica entre las estructuras parasitarias normales y alteradas. Todos los reactivos fueron adquiridos en Electron Microscopy Sciences®.

5.2.8 Análisis estadístico

Con la finalidad de establecer si hay diferencia significativa ($P < 0.05$) entre el porcentaje de parasitemía en los grupos *Pyy*, Tween 80 al 0.4% y el tratado con el extracto metanólico de *Hintonia latiflora* se aplicó la prueba de ANOVA, con el programa estadístico Sigma Plot 13.0®.

6. DISEÑO EXPERIMENTAL



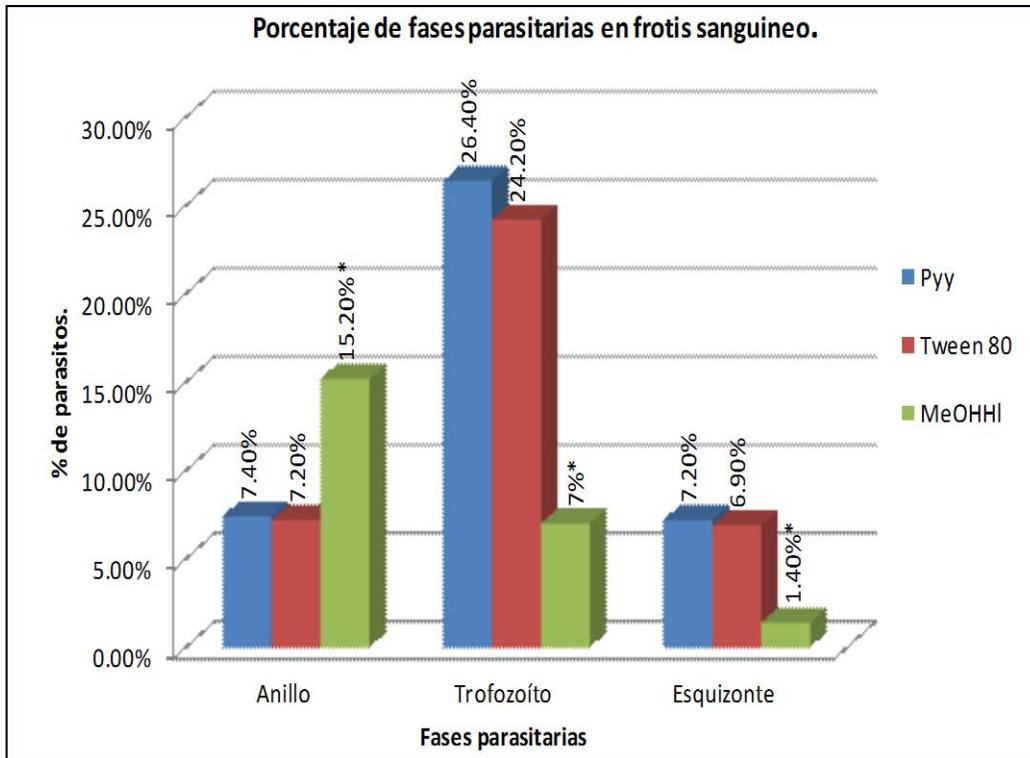
7. RESULTADOS

7.1 Eficacia antimalárica del extracto metanólico de *Hintonia latiflora*

En los frotis sanguíneos de todos los animales infectados, se observaron parásitos intraeritrocíticos al sexto día postinfección con excepción del grupo control cloroquina; en el grupo control *Pyy* se obtuvo una parasitemia de 41%, en el grupo control Tween 80 al 0.40% de 38.30% y en el grupo tratado con el extracto metanólico de *Hintonia latiflora* de 23.60%.

En el grupo control *Pyy*, al sexto día postinfección se observaron los siguientes porcentajes en las fases parasitarias: anillos 7.40%, trofozoítos 26.40% y esquizontes 7.20%; en el grupo control Tween 80 al 0.4% se obtuvieron porcentajes de 7.20, 24.20 y 6.90% para los mismos estadios parasitarios; en el grupo tratado con el extracto metanólico de *Hintonia latiflora*, los porcentajes de anillos, esquizontes y trofozoítos fueron del 15.20, 7.00 y 1.40% respectivamente (gráfica 1).

Los animales del grupo control *Pyy* y Tween 80 al 0.4%, murieron a los 6 días postinfección con una parasitemia del 41% y del 38.30% respectivamente. Los animales tratados con *Hintonia latiflora*, murieron a los 14 días postinfección con una parasitemia del 22.60%. Los animales tratados con cloroquina sobrevivieron al experimento. Los resultados se presentan en la tabla 1.



Grafica 1. Porcentaje de fases parasitarias al sexto día postinfección. Los resultados se reportan como promedio \pm error estándar. * $P < 0.05$ en comparación al grupo control *Pyy* y Tween 80 al 0.4%. Todos los animales tratados con cloroquina sanaron.

MeOHHL= 1000 mg/kg del extracto metanólico de *Hintonia latiflora*.

Tabla 1. Evaluación del efecto antimalárico del extracto metanólico de la corteza de *Hintonia latiflora* a dosis de 1000 mg/kg en las fases intraeritrocíticas de *Plasmodium yoelii yoelii* en ratones CD-1.

Grupo	Parasitemia al sexto día PI	Porcentaje de esquizontes al sexto día PI	Parasitemia al día de la muerte	Sobrevida (días)
<i>Hintonia latiflora</i> (n=5)	23.60±1.28*	1.40±0.24*	22.60±1.63*	14.20±0.86*
Control Cloroquina 15mg/kg oral (n=5)	0*	0*	**	**
Control <i>Pyy</i> (n=5)	41±1.80	7.20±0.37	41±2.50	0
Control Tween 80 al 0.4%	38.30±1.30	6.90±0.27	38.30±2.00	0

Los resultados se reportan como promedio ± error estándar.

* P<0.05 en comparación al grupo control *Pyy* y Tween 80 al 0.4%.

** Todos los animales tratados con cloroquina sanaron.

PI= postinfección.

7.2 Efecto del extracto metanólico de *Hintonia latiflora* en la ultraestructura parasitaria

7.2.1 Microscopía de campo claro

Los frotis sanguíneos teñidos con Giemsa observados mediante microscopía de campo claro, de animales infectados con *Pyy* y tratados con Tween 80 al 0.4%, presentaban alto porcentaje de eritrocitos parasitados a los seis días postinfección, observándose las fases intraeritrocíticas de anillos, trofozoítos, esquizontes y merozoítos con pigmento malárico visible. Los animales tratados con el extracto metanólico de *Hintonia latiflora* durante cuatro días, mostraron eritrocitos infectados en los que solamente se observaron las fases de anillos y trofozoítos y en algunos casos de uno a dos esquizontes por laminilla (figura 8).

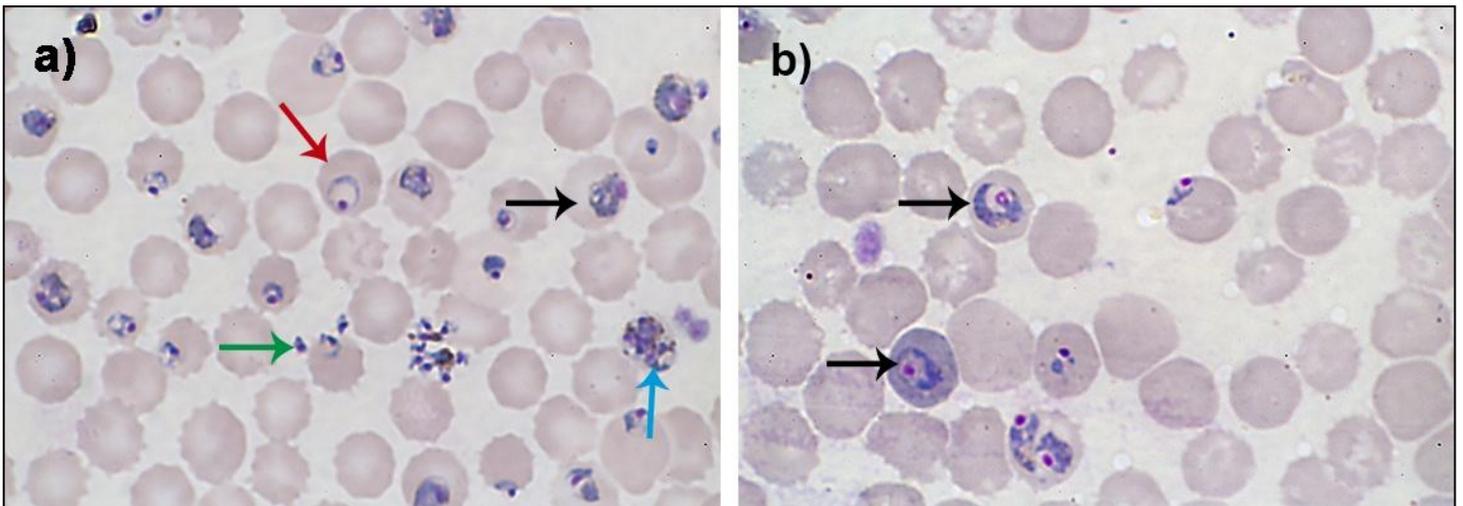


Figura 8. Frotis sanguíneos de ratones infectados durante 6 días con *Pyy* y tratados con 1000 mg/kg del extracto de *Hintonia latiflora* durante 4 días. **a)** Grupo control *Pyy*; se observan eritrocitos infectados con todas las fases parasitarias; merozoítos (flecha verde), anillos (flecha roja), trofozoítos (flecha negra) y esquizonte (flecha azul). **b)** Grupo *Pyy+Hintonia latiflora*; se observa un número reducido de eritrocitos infectados, en su mayoría trofozoítos jóvenes y maduros (flechas negras).

A pesar de que fue difícil apreciar cambios morfológicos en los parásitos observados mediante microscopía de campo claro, algunos tratados con el

extracto metanólico de *Hintonia latiflora*, se observa el citoplasma amorfo (figura 9).

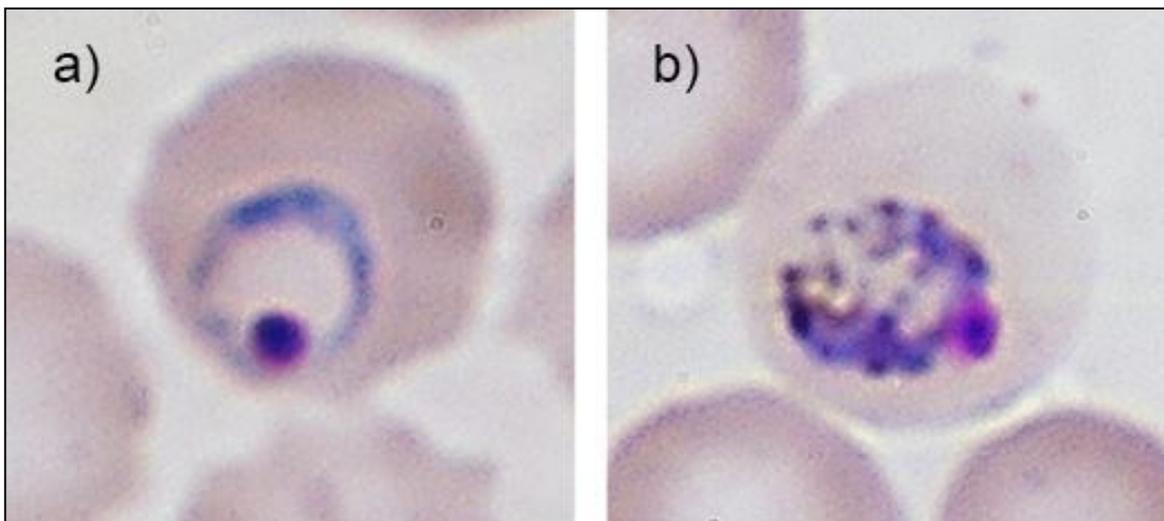


Figura 9. Frotis sanguíneo al sexto día de ratones infectados con *Pyy*. **a)** Grupo control *Pyy*, se observa un eritrocito con que contiene a *Pyy* en fase de anillo en su periferia, el cual presenta un citoplasma íntegro y núcleo bien definido. **b)** Grupo tratado con 1000 mg/kg del extracto metanólico de *Hintonia latiflora*, se observa un eritrocito infectado con *Pyy* en fase de trofozoíto que presenta citoplasma amorfo.

7.2.2 Microscopía electrónica de transmisión

En las micrografías de microscopía electrónica de transmisión de los parásitos obtenidos de los animales del grupo *Pyy* y del grupo Tween 80 al 0.4%, se observaron parásitos intraeritrocíticos bien conservados, la mayoría de las muestras evaluadas presentaban las fases de anillo, trofozoíto y esquizonte; la fase de merozoíto se observó solo en algunas muestras y en cantidad reducida. Los eritrocitos infectados, contenían a los parásitos en forma de anillo en la periferia. Los anillos observados, presentaron una apariencia de disco delgado con la presencia de un citoplasma conteniendo un núcleo y ribosomas libres, presentaban vacuolas digestivas que abarcaban el 40% del volumen del parásito. En algunas muestras, se observó el citostoma y el pigmento malárico. Los trofozoíto observados en estas muestras, presentaron bordes gruesos y

citoplasma conteniendo diferentes organelos como el núcleo, mitocondrion y ribosomas. En algunos especimenes evaluados se observaron merozoitos intracelulares en division. Fue dificil determinar merozoitos libres en las muestras observadas, los pocos encontrados presentaron organelos bien definidos como roptrias, micronemos, granulos densos y en algunos especimenes, citostoma. En la figura 10, se pueden apreciar la ultraestructura de los diferentes estadios parasitarios de *Pyy* sin tratamiento.

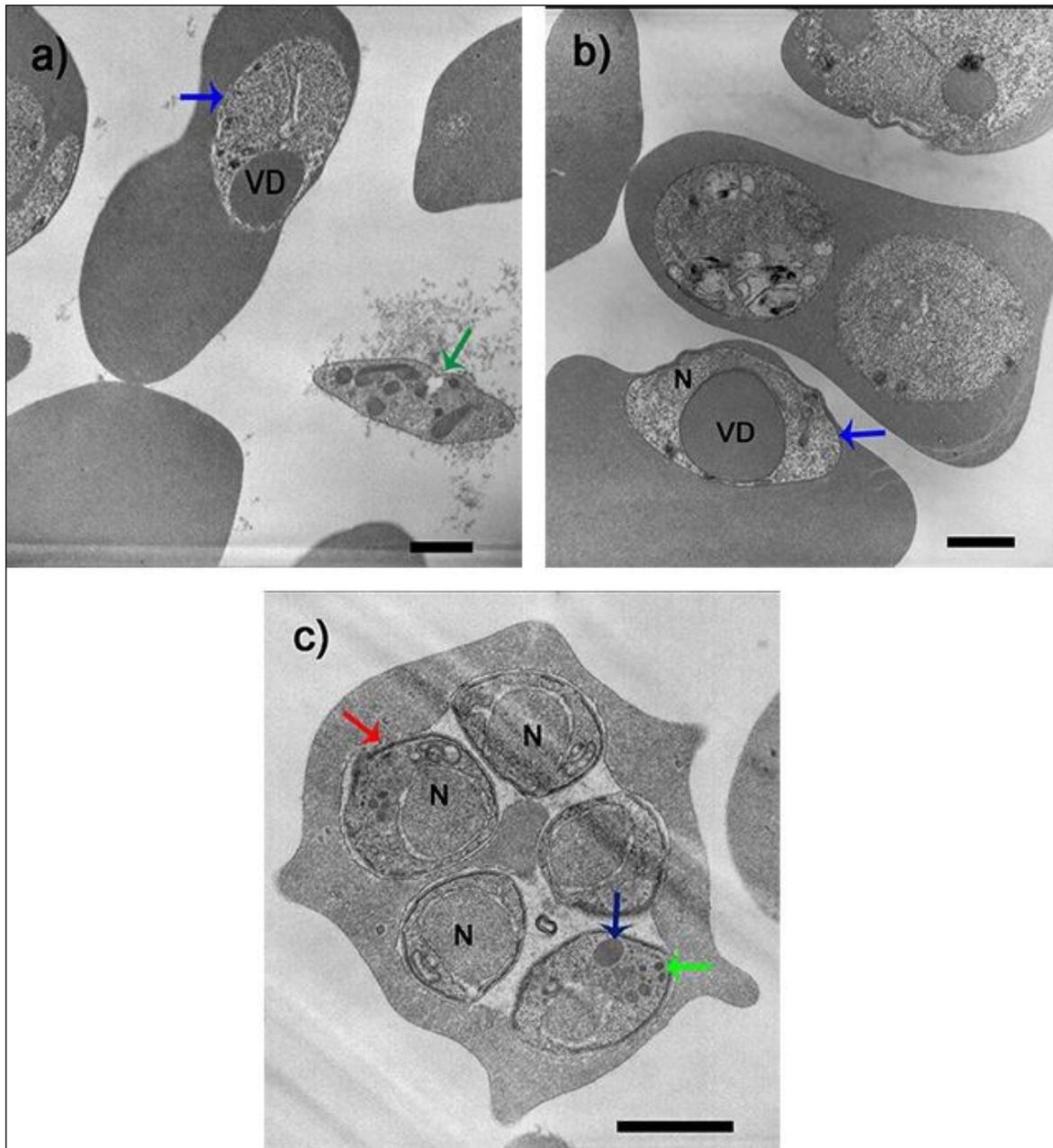


Figura 10. Microfotografías de transmisión de las diferentes fases parasitarias al sexto día de *Pyy*. **a)** En la parte superior izquierda se puede observar un trofozoíto que presenta una vacuola digestiva (VD) y membrana vacuolar parasitófora (flecha azul); en la parte inferior derecha, se observa un merozoíto con citostoma (flecha verde) y organelos intracitoplasmáticos. **b)** Se observa un parásito en fase de anillo con membrana vacuolar parasitófora (flecha azul), vacuola digestiva y núcleo. **c)** Se observa un esquizonte con merozoíto (flecha roja) los cuales contienen un núcleo (N), micronemos (flecha verde) y roptrias (flecha azul). Barras = 1 μ m.

En las microfotografías obtenidas de los parásitos de los animales infectados y tratados con el extracto metanólico de *Hintonia latiflora*, se observaron las fases de anillos y trofozoítos. En la mayoría de las muestras observadas, se apreciaron parásitos amorfos con vacuolas citoplasmáticas y en algunos casos sin membrana vacuolar parasitófora. Las membranas celulares se apreciaron hinchadas, discontinuas y en algunas ocasiones vacuolizadas. En algunos especímenes fue posible identificar la vacuola digestiva con cristales de hemozoína dentro, así como la presencia de vesículas de transporte con hemoglobina. En los casos más severos se observó una destrucción casi total del parásito (figura 11). Los animales tratados con cloroquina no presentaron parásitos intraeritrocíticos al día seis postinfección.

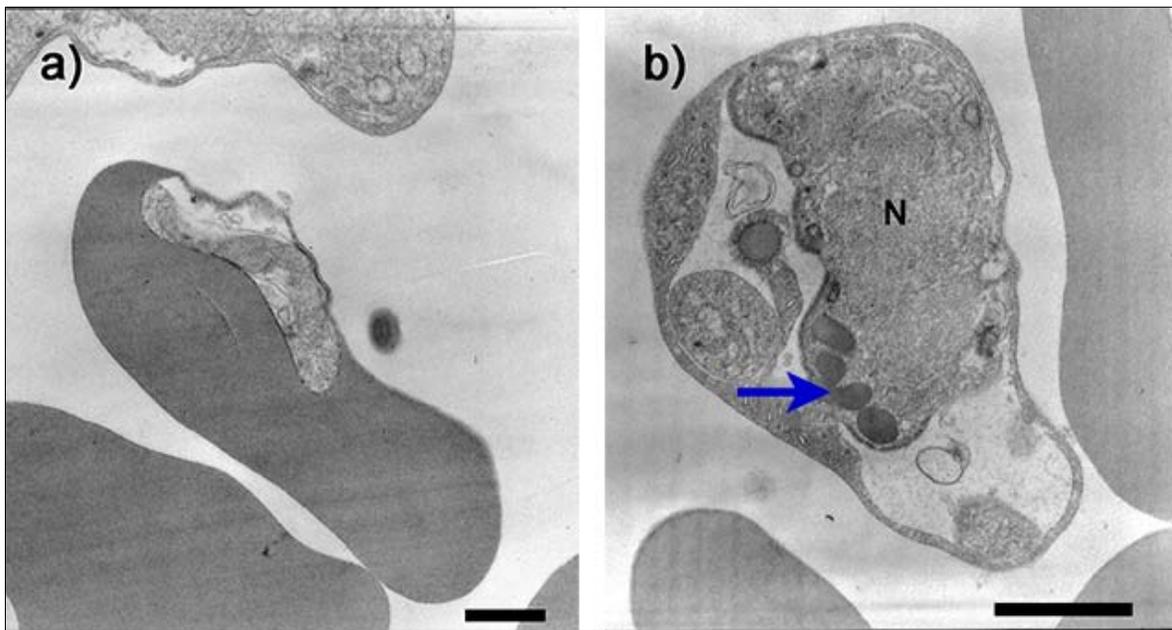


Figura 11. Microfotografías de transmisión de *Pyy* al sexto día, tratados con 1000 mg/kg del extracto metanólico de *Hintonia latiflora* por 4 días. **a)** Se observa a un parásito amorfo en etapa de anillo que presenta membranas celulares hinchadas y discontinuas; citoplasma vacuolizado y no se pueden identificar los organelos en el interior del parásito. **b)** Se observa un trofozoíto con un núcleo irregular (N) e hinchado, membranas celulares hinchadas, citoplasma vacuolizado y vesículas de transporte con hemoglobina sin digerir (flecha azul). Barras = 1 μ m.

En otras microfotografías de las fases asexuales de *Pyg* tratado con el extracto metanólico de *Hintonia latiflora*, mostró alteraciones importantes en los diferentes estadios parasitarios; los hallazgos más frecuentemente observados fueron la vacuolización citoplasmática, la depleción ribosomal y en algunos casos la ruptura y desorganización de membranas celulares e hinchamiento del mitocondrion. En los casos más severos se observaron parásitos destruidos en su totalidad y aún delimitados por una vacuola parasitófora (figura 12).

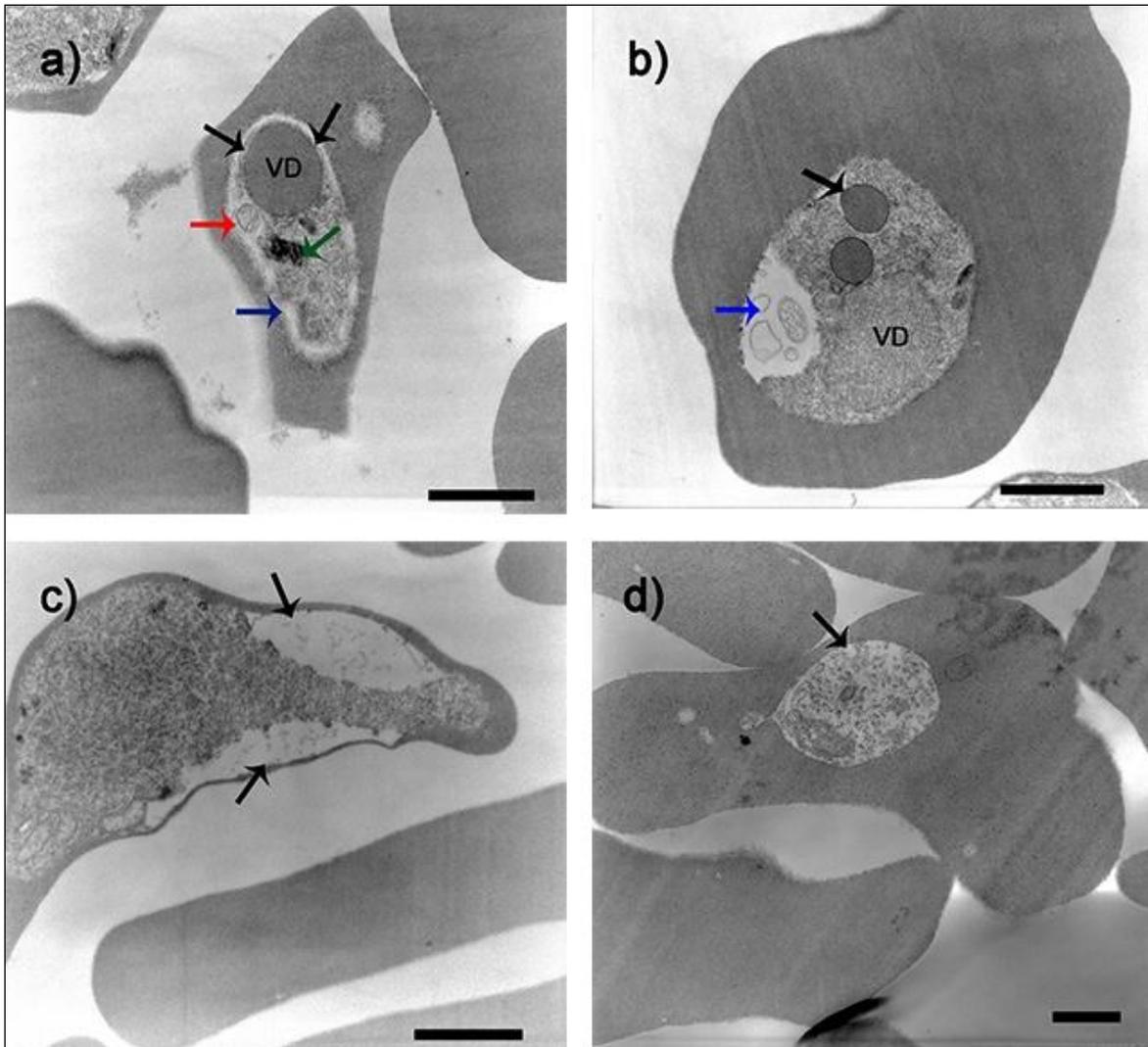


Figura 12. Microfotografías de transmisión de *Pyy* al sexto día, tratado con 1000 mg/kg del extracto metanólico de *Hintonia latiflora*. **a)** Se observa la vacuola digestiva (VD) hinchada (flechas negras), restos de pigmento malárico (flecha verde), la membrana vacuolar parasitófora discontinua (flecha azul) y con formación de vacuolas (flecha roja). **b)** Vesículas de transporte con hemoglobina (flecha negra), la vacuola digestiva (VD) irregular y con la membrana vacuolar parasitófora muy hinchada (flecha azul). **c)** Se observa un anillo con depleción ribosomal (flechas negras). En el inciso **d)** Se distingue a un parásito (flecha negra) en proceso de destrucción. Barras = 1 μ m.

8. DISCUSIÓN

En el presente estudio se evaluó el efecto del extracto metanólico de *Hintonia latiflora* a dosis de 1000 mg/kg sobre la parasitemia, el desarrollo de las fases parasitarias y la ultraestructura parasitaria en un modelo de malaria murino infectado con *Pyy*.

El análisis de la parasitemia mostró que el número de eritrocitos infectados por cada 1000 células analizadas a los 6 días postinfección disminuyó de manera significativa en el grupo tratado con el extracto metanólico de *Hintonia latiflora* y aumentó los días de sobrevivencia hasta 14, en comparación con el grupo *Pyy* sin tratamiento en el que los animales murieron a los 6 días postinfección. La disminución de la parasitemia así como la sobrevivencia de los animales tratados, concuerda con los resultados obtenidos en un estudio realizado por Rivera *et al.*, (2014) en el que la parasitemia de los ratones infectados con *Pyy*, disminuyó a los 5 días postinfección como consecuencia de la administración oral de 1200 mg/kg del extracto crudo de *Hintonia latiflora*, y los animales tratados tuvieron una sobrevivencia de 23 días probablemente por el uso de una dosis mayor del extracto.

En los animales tratados con el extracto metanólico de *Hintonia latiflora*, la fase parasitaria que se observó con más frecuencia fue la anular, resultado que coincide con lo obtenido por Sachanonta *et al.*, (2011), quienes encontraron que el tratamiento con artesunato, quinina y piperquina, retrasan el desarrollo parasitario, aumentando el número de anillos y disminuye el número de esquizontes en las muestras sanguíneas. La artemisinina y sus derivados como el artesunato, inhiben el desarrollo de las formas parasitarias intraeritrocíticas tempranas durante una infección malárica y en consecuencia el desarrollo de gametocitos; la artemisinina contiene sesquiterpenos, que son los responsables de la actividad antimalárica por lo que la acción de la corteza de *Hintonia latiflora* sobre el desarrollo parasitario, podría deberse a la acción de este tipo de isoprenoides presentes también en *Hintonia latiflora* (Meshinck, 2002).

En las imágenes obtenidas del microscopio de campo claro de los parásitos tratados, únicamente se apreciaron citoplasmas más amorfos que en las muestras de los animales no tratados, distinguiéndose en ellos pigmento malárico. La mayoría de los fármacos antimaláricos sobre todo los derivados de las 4-aminoquinolínas y los derivados de la artemisinina, interfieren con el proceso de digestión de la hemoglobina en el parásito (Meshinck, 2002), lo que provoca que en un frotis sanguíneo los plasmodios observados carezcan en su mayoría de pigmento malárico, por lo que probablemente la acción parasiticida de alguno de los componentes de *Hintonia latiflora* tenga el mecanismo de acción diferente a los fármacos quinolínicos, ya que en la mayoría de los especímenes evaluados, se apreció la vacuola digestiva con pigmento malárico.

Para evaluar los cambios ultraestructurales ocasionados por la administración de algún fármaco o sustancia, es importante asegurarse de que la respuesta al tratamiento son efectos del fármaco y no de un mal manejo de la muestra, ya que muchos de los cambios observados en los parásitos pueden deberse a una mala fijación (Rosende, 1994). En el presente estudio se utilizaron las condiciones adecuadas para procesar las muestras y asegurar que los cambios en la ultraestructura se debieran directamente al efecto del extracto.

Los hallazgos más frecuentes observados en las fases asexuales de *Pyy* tratados con el extracto fueron; la vacuolización citoplasmática, la depleción ribosomal y en algunos casos la ruptura y desorganización de membranas celulares e hinchamiento del mitocondrion. En los casos más severos se observa al parásito delimitado solo por la membrana vacuolar parasitófora. Estos resultados son semejantes a los reportados por Maeno y colaboradores en 1993 quienes observaron alteraciones morfológicas en el mitocondrion, en la membrana del núcleo y en las membranas celulares, así como depleción ribosomal en *Plasmodium falciparum* expuesto *in vitro* a artemisinina.

El verapamil (un antagonista del calcio), ha sido utilizado junto con la cloroquina para aumentar la eficacia de esta última en cepas cloroquina sensibles de *Plasmodium falciparum*. Los cambios ultraestructurales, obtenidos *in vitro* como consecuencia de la exposición de Verapamil-cloroquina a cepas de *Plasmodium falciparum* cloroquina resistentes, consistieron en aumento de volumen de la vacuola digestiva, degeneración nuclear y aumento del mitocondrion (Jacobs y et al., 1988).

Cuando las mitocondrias aumentan su volumen, aumenta por igual el contenido de agua en su matriz, disminuye la producción de ATP y esto modifica el transporte activo de iones de la membrana celular y de la bomba de sodio-potasio, especialmente del sodio y agua intracelular. La liberación de ion calcio y su aumento intramitocondrial inhibe la fosforilación oxidativa, aumenta así la glicólisis anaeróbica y con ello la acumulación de ácido láctico en el citoplasma, el pH desciende, lo que conduce a un mayor daño de membranas y aumento de la permeabilidad celular. En un estado de acidez celular, se liberan enzimas lisosomales las cuales degradan ribonucleoproteínas y causan necrosis del citoplasma celular. La degradación de las membranas celulares puede causar acumulo de gotas lipídicas en el citoplasma (Marín *et al.*, 2011).

En el estudio realizado por Marín y colaboradores en 2011, también se evaluó el efecto de algunos flavonoides de la planta *Delphinium staphisagria* en *Trypanosoma cruzi*; los parásitos expuestos a estos flavonoides, ocasionaron lesiones ultraestructurales en los tripanosomas similares a los encontrados en los plasmodios como consecuencia del tratamiento con el extracto metanólico de *Hintonia latiflora*. Entre los múltiples componentes de *Hintonia latiflora*, se sabe que contiene flavonoides (taninos) y terpenos, los cuales ejercen actividad antioxidante y podrían estar relacionados con los daños morfológicos observados en los parásitos (Eckstein *et al.*, 2003).

No pudieron obtenerse muestras de cloroquina ya que los animales tratados con este fármaco, no presentaron parasitemia a los seis días postinfección, sin embargo, estudios realizados por diversos autores (Jacobs *et al.*, 1988; Marin *et al.*, 2011), reportan que el daño ultraestructural ocasionado a los plasmodios como consecuencia a la exposición *in vitro* a cloroquina, se ubica principalmente a nivel de la vacuola digestiva y en menor grado en el citoplasma y organelos del parásito.

En la actualidad no existen muchos fármacos disponibles para controlar la malaria sobre todo por la resistencia farmacológica a nivel mundial, por lo tanto, la investigación de nuevos agentes de origen natural, utilizando principalmente métodos etnofarmacológicos, es particularmente importante, sin descartar las oportunidades que significa la explotación en fuentes marinas. El principal papel de las investigaciones etnofarmacológicas, es evaluar y validar el uso tradicional de las plantas medicinales en los países en desarrollo. El aislamiento de nuevas moléculas activas, es el paso básico para comprender el mecanismo de acción y emprender estudios toxicológicos y pruebas clínicas confiables (Cacciorate *et al.* 2015). Muchos extractos han sido probados por su actividad antiplasmodio, pero sólo un número limitado de compuestos, pertenecientes a diferentes clases moleculares se han podido aislar e identificar, algunos de ellos no son particularmente activos, pero pueden ser interesantes debido a que podrían incrementar la actividad de los antimaláricos existentes (Ramírez *et al.*, 2015). La investigación fundamentada en métodos antimaláricos tradicionales ó Research Initiative on Traditional Antimalarial Methods (RITAM), facilita el intercambio y la colaboración entre las investigaciones fitoquímicas en antimaláricos, con el ánimo de desarrollar una estrategia coordinada que garantice de una forma más efectiva el uso de métodos antimaláricos tradicionales basados en la evidencia (Gaitán, 2007).

9. CONCLUSIÓN

Bajo las condiciones experimentales en las que se realizó el presente estudio, el tratamiento oral con 1000 mg/kg de extracto metanólico de *Hintonia latiflora* en ratones machos CD1 infectados con *Pyy*, produce alteraciones ultraestructurales importantes en las fases parasitarias asexuales intraeritrocíticas, y el tipo de daño apreciado, podría estar relacionado con la acción de flavonoides y terpenos presentes en la planta; el extracto disminuye la parasitemia significativamente y retrasa el desarrollo parasitario alargando así la vida de los animales infectados.

10. LITERATURA CITADA

Andrade-Cetto A, Becerra-Jiménez J, Cárdenas-Vázquez R (2008). Alfa-glucosidase inhibiting activity of some Mexican plants used in the treatment of type 2 diabetes. *J Ethnopharmacol.* 116:27-32.

Argotte-Ramos R, Ramírez-Ávila G, Rodríguez-Gutiérrez MC, Ovilla-Muñoz M, Lanz-Mendoza H, Rodríguez M, González-Cortázar M, and Álvarez L (2006). Antimalarial 4-phenylcoumarins from the stem bark of *Hintonia latiflora*. *J Nat Prod.* 69:1442-1444.

Atkinson CT, Aikawa M (1990). Ultrastructure of malaria-infected erythrocytes. *Blo Cel.* 16:351–368.

Bagavan A, Rahuman AA, Kaushik NK, Sahal D (2011). *In vitro* antimalarial activity of medicinal plant extracts against *Plasmodium falciparum*. *Parasitol Res.* 108:15-22.

Baird JK (2009). Resistance to therapies for infection by *Plasmodium vivax*. *Clin Microbiol.* 22:508-534.

Bannister LH, and Sherman IW (2009). *Plasmodium*. In: eLS. John Wiley & Sons Ltd. 1-12.

Bannister LH, Hopkins JM, Fowler RE, Krishna S. and Mitchell GH (2000). A Brief Illustrated Guide to the Ultrastructure of *Plasmodium falciparum* Asexual Blood Stage. *Parasitol Tod.* 16:427-433.

Bannister LH, Mitchell GH (2009). The malaria merozoite, forty years on. *Parasitol.* Pp:1435–1444.

Benavides F, Guenet JL (2000). Modelos murinos de enfermedades humanas. *Med.* 61:215-231.

Biblioteca digital de la medicina tradicional mexicana 2009 © D.R. Hecho en México. Sitio en internet: <http://www.medicinatradicionalmexicana.unam.mx/index.php>. Ultimo acceso: 05/11/2015.

- Blackman MJ, Bannister LH** (2001). Apical organelles of Apicomplexa: biology and isolation by subcellular fractionation. *Mol Biochem Parasitol.* 117:11–25.
- Bruguera M, Herrera S, Lázaro E, Madurga M, Navarro M y de Abajo F** (2007). Hepatitis aguda asociada al consumo de Copalchi. A propósito de 5 casos. *Gastroenterol Hepatol.* 30:66-68.
- Cacciorate I, Giulio M, Fornasari E, Stefano A, Cesarasa L, Marinelli L, Turkez H, Campi E, Bartolomeo S, Robuffo I, Cellini L** (2015). Carvacrol Codrugs: A New Approach in the Antimicrobial Plan. *PLOS ONE.* 10:1-20.
- Carlton JM, Hayton K, Cravo PV, Walliker D** (2001). Of mice and malaria mutants: Unravelling the genetics of drug resistance using rodent malaria models. *Trends Parasitol.* 17:236-242.
- Carrasco E, Malagón F** (2011). La malaria como una zoonosis. *Med Lab.* 5:4-10.
- Casas M y Bonilla OA** (2006). Diversidad y distribución geográfica del genero *Anopheles* en el sur de México. *CONABIO. Biodiv.* 67:12-15.
- Chiodini LP, Moody HA, Manser WD** (2001). Atlas of Medical Helminthology and Protozoology. ED Churchill Livingstone 4 Ed London Pp:1-82.
- Coatney G.R, Collins W.E, Warren M, Contacos P.G** (1971). *Plasmodium knowlesi*. The Prim Mal. Pp:317-331.
- Cowman A.F and Crabb B.S** (2006). Invasion of Reed Blood Cells by Malaria Parasites. *Cell.* 124:755-766.
- Cristians S, Guerrero-Analco JA, Pérez-Vázquez A, Palacios-Espinosa F, Ciangherotti C, Bye R, Mata R** (2009). Hypoglycemic Activity of Extracts and Compounds from the Leaves of *Hintonia standleyana* and *Hintonia latiflora*: Potential Alternatives to the Use of the Stem Bark of These Species. *J Nat.* 72:408-413.
- Davies E, Warhurst D, Peters W** (1975). The chemotherapy of rodent malaria, XXI. Action of quinine and WR 122 (a 9-phenanthrenemetanol) on the fine

structure of *Plasmodium berghei* in mouse blood. Ann Trop Med Parasitol. 69:147-153.

Dharia NV, Plouffe D, Bopp SE, Gonzalez-Paez GE, Lucas C, Salas C, Soberon V, Bursulaya B, Kochel TJ, Bacon DJ et al (2010). Genome scanning of Amazonian *Plasmodium falciparum* shows subtelomeric instability and clindamycin-resistant parasites. Gen Res. 20:1534–1544.

Djeussi D, Sandjo L, Noumedem A, Omosa L, Ngadjui B, Kuete V (2015). Antibacterial activities of the methanol extracts and compounds from *Erythrina sigmoidea* against Gram-negative multi-drug resistant phenotypes. BMC. 15:453-459.

Eckstein E, Webb RJ, Van Goethem ID, East JM, Lee AG, Kimura M, O'Neill PM, Bray PG, Ward SA, Krishna S (2003). Artemisinins target the SERCA of *Plasmodium falciparum*. Nat. 424:957-961.

Egan TJ (2008). Recent advances in understanding the mechanism of hemozoin (malaria pigment) formation. J Inorg Biochem. 102:1288–1299.

Elias RM, Correa-Costa M, Barreto CR, Silva RC, Hayashida CY, Castoldi A, Goncalves GM, Braga T, Barboza T, Rios R, Keller A, Cendeze M, Hyane M, D'Imperio-Lima M, Figueiredo-Neto A, Reis M, Marinho C, Pacheco-Silva A, Camara N (2012). Oxidative stress and modification of renal vascular permeability are associated with acute kidney injury during *Plasmodium berghei* ANKA infection. PLOS ONE. 7:1-11.

Elliot D, McIntosh M, Hosgood D, Chen S, Zhang G, Baevova P, Joiner K (2007). Four distinct pathways of hemoglobin uptake in the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. PNAS. 105:2463-2468.

Gaitán IR (2007). Una visión a la terapia antimalarica tradicional y actual desde el descubrimiento hasta su posible desarrollo. Scientia Et Technica. XIII : 5-12.

Gilson PR, Crabb BS (2009). Morphology and kinetics of the three distinct phases of red blood cell invasion by *Plasmodium falciparum* merozoites. *Int J Parasitol.* 39:91–96.

Gogtay NJ, Desai S, Kamtekar KD, Kadam VS, Dalvi S, Kshirsagar NA (1999). Efficacies of 5 and 14 day primaquine regimens in the prevention of relapses in *Plasmodium vivax* infections. *Ann of Trop Med and Parasitol.* 93:809–812.

Haldar K, Murphy SC, Milner DA, Taylor TE (2007). Malaria: mechanisms of erythrocytic infection and pathological correlates of severe disease. *Annu Rev Pathol.* 2:217-249.

Hanssen E, McMillan P, Tilley L (2010). Cellular architecture of *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes. *Jour for Parasit.* 40:1127-1135.

Hommel M (2007). Morphology, biology and life-cycle of *Plasmodium* parasites. *Bull Acad Natl Med.* 191:1235-1245.

Idowu OR, Peggins JO, Brewer TG (1995). Side-chain hydroxylation in the metabolism of 8-aminoquinoline antiparasitic agents. *Drug Metab Dispos.* 23:18–27.

Jacobs GH, Oduola AM, Kyle DE, Milhous WK, Martin SK, Aikawa M (1988). Ultrastructural study of the effects of chloroquine and verapamil on *Plasmodium falciparum*. *Am J Trop Med Hyg.* 39:15-20.

Joy DA, Feng X, Mu J, Furuya T, Chotivanich K, Krettli AU, Ho M, Wang A, White NJ, Suh E, Beerli P, Su XZ (2003). Early origin and recent expansion of *Plasmodium falciparum*. *Scin.* 300:318–321.

Kesera N, Phunuch M, Ronnatari R, Wanna C, Juntra K (2013). Identification of resistance of *Plasmodium falciparum* to artesunate-mefloquine combination in an area along the Thai-Myanmar border. *Mala J.* 12:1-14.

Killick-Kendrick R (1978). *Taxonomy, Zoography and Evolution.* Rod Mal. Pp:1-52.

Krause PJ, Lepore T, Sikand VK, Gadbow J Jr, Burke G, Telford SR, Brassard P, Pearl D, Azlanzadeh J, Christianson D, McGrath D, Spielman A (2000). Atovaquone and azithromycin for the treatment of babesiosis. *N Engl J Med.* 343:1454–1458.

Landgraf B, Kollaritsch H, Wiedermann G, Wernsdorfer WH (1994). Parasite density of *Plasmodium falciparum* malaria in Ghanaian schoolchildren: evidence for influence of sex hormones? *Trans R Soc Med Hyg.* 88:73-84.

Lauer SA, Ghori N, Haldar K (1995). Sphingolipid synthesis as a target for chemotherapy against malaria parasites. *Proc Natl Acad Sci.* 92(20):9181–9185.

Ledermann W, Valle D (2009). Ética e investigación en la historia de la malaria. *Rev Chil de Infec.* 26:466-471.

López Velarde R, Chazaro Bazañez M, González Maldonado R (2011). Árboles de las Barrancas de los ríos Santiago y Verde CEA Jalisco. Dirección de Cuencas y Sustentabilidad. Gerencia Ambiental y Desarrollo. Pp:56-58.

Maeno Y, Toyoshima T, Fujioka H, Ito Y, Meshnick SR, Benakis A, Milhous WK, Aikawa M (1993). Morphologic effects of artemisinin in *Plasmodium falciparum*. *Am J Trop Med Hyg.* 49:485-91.

Marín C, Ramírez I, López CA, Francisco Olmo F, Villegas N, Díaz J, Rosales MJ, Gutiérrez SR, Sánchez MM (2011). *In Vitro* and *in Vivo* Trypanocidal Activity of Flavonoids from *Delphinium staphisagria* against Chagas Disease. *J Nat Prod.* 74:744–750.

Maude RJ, Pontavornpinyo W, Saralamba S, Aguas R, Yeung S, Dondorp AM, Day NP, White NJ, White LJ (2009). The last man standing is the most resistant: eliminating artemisinin-resistant malaria in Cambodia. *Malar J.* 8:31.

McGready R, Tan SO, Ashley EA, Pimanpanarak M, Viladpai-Nguen J, Phaiphun L, Wustefeld K, Barends M, Laochan N, Keereecharoen L et al (2008). A randomised controlled trial of artemether-lumefantrine versus artesunate for uncomplicated *Plasmodium falciparum* treatment in pregnancy. *PLoS Med.* 5:1699-1715.

MeÂnard R (2001). Gliding motility and cell invasion by Apicomplexa: insights from the *Plasmodium* sporozoite. *Cell Microbiol.* 3:63-73.

Meshnick SR (2002). Artemisinin: mechanisms of action, resistance and toxicity. *Int J Parasitol.* 32:1655–1660.

Mishra SK, Wiese L (2009). Advances in the management of cerebral malaria in adults. *Curr Opin Neurol.* 22:302-307.

Mundwiler-Pachlatko E, Hansen-Peter B (2013). Maurer’s clefts, the enigma of *Plasmodium falciparum*. *PNAS.* 10:19987-19994.

Muregi FW, Kirira PG, Ishih A (2011). Novel rational drug design strategies with potential to revolutionize malaria chemotherapy. *Curr Med Chem.* 18:113-143.

Olliaro P (2001). Mode of action and mechanisms of resistance for antimalarial drugs. *Pharmacol Ther.* 89:207–219.

Pérez P, Lugo E (2009). Plantas medicinales: un complemento vital para la salud de los mexicanos. *Rev Dig Uni.* 10: 1-9.

Peters W, Robinson BL, Ellis DS (1987). The chemotherapy of rodent malaria. XLII. Halofantrine and halofantrine resistance. *Ann Trop Med Parasitol.* 81:639-646.

Pongponrath E, Prommano O, Chaisri U, Viriyavejakul P, Wilairatana P (2012). *Plasmodium malarie*-infected erithrocytes in the peripheral blood, liver, stomach and duodenum: an ultrastructural study. *Am J Trop Med.* 43:1080-1086.

Prudencio M, Rodriguez A, Mota M (2006). The silent path to thousands of merozoitos: the *Plasmodium* liver stage. *Nat Rev Microbiol.* 4:849-856.

Ramírez-Granillo A, Canales-Medina M, Sanchez-Espindola M, Martinez-Rivera M, Bautista V, Rodriguez-Tovar A (2015). Antibiosis interaction of *Staphylococcus aureus* on *Aspergillus fumigaatus* assessed *in vitro* by mixed biofilm formation. *BMC Microbiol.* 15:1-15.

Rivera N, Lopez P, Rojas M, Fortoul T, Reynada D, Reyes A, Rivera E, Beltram H, Malagon F (2014). Antimalarial efficacy, cytotoxicity, and genotoxicity of methanolic stem bark extract from *Hintonia latiflora* in a *Plasmodium yoelii yelii* lethal murine malaria model. Parasitol Res. 113:1529-1536.

Rodríguez MH, Reyes A (2011). Plan del mejoramiento del control de la malaria hacia su eliminación en Mesoamérica. Salud pública de México. 53:333-348.

Rosende A (1994). Metodología de la microscopia electrónica de transmisión y barrido. Universidad de Coruña. Pp:53-62.

Sachanonta N, Kesinee C, Urai C, Gareth DH, David JP, Nicholas PJ, and Pongponratn E (2011). Ultrastructural and Real-time Microscopic Changes in *P. falciparum*-infected Red Blood Cells Following Treatment with Antimalarial Drugs. Ultrastruct Pathol. 35:214–225.

Sánchez CP, Rotmann A, Stein WD, Lanzer M (2008). Polymorphisms within PfMDR1 alter the substrate specificity for anti-malarial drugs in *Plasmodium falciparum*. Mol Microbiol. 70:786–798.

Sand C, Horstmann S, Schmit A, Sturm A, Bolte S, Krueger A, Lutgehetmann M, Pollok J, Libert C, Heussler T (2005). The liver stage of *Plasmodium berghei* inhibits host cell apoptosis. Mol Microbiol. 58:731-742.

Sibley L.D (2004). Intracellular Parasite Invasion Strategies. Scien. 304:248-253.

Sinnis P, Zavala F, (2012). The skin; where malaria infection and the host immune response begin. Semin Immunopathol. 34:787-792.

Sociedad Química de México (2007). La industrialización químico-farmacéutica mexicana y la flora: el caso de los Laboratorios Garcol. Bol. Soc. Quím. Méx. 1:107-114.

Striepen B, Jordan CN, Reiff S, Dooren GG (2007). Building the Perfect Parasite: Cell Division in Apicomplexa. PLoS Path. 3:691-698.

Suckow M, Danneman P, Brayton C (2001). The laboratory mouse. CRC Press, USA, Pp: 1-167.

Tardieux I, Baines I, Mossakowska M, Ward GE (1998). Actin-binding proteins of invasive malaria parasites and the regulation of actin polymerization by a complex of 32/34-kDa proteins associated with heat-shock protein 70 kDa. *Mol Biochem Parasitol.* 93:295–308.

Taylor WR, Hanson J, Turne GD, White NJ, Dondorp AM (2012). Respiratory manifestations of malaria. *CHEST.* 142:492-505.

Tilley L, Goldie K, Hanssen E (2011). Ultrastructure of the Asexual Blood Stages of *Plasmodium falciparum*. *Meth in Cell Biol.* 96:93-116.

Walker FN, Nadjam B, Whitty CJ (2014). Malaria. *Med.* 42:100-106.

Whitty CJ, Lubell Y, Reyburn H, MBakilwa H, Mwangi R, Chonya S, Mills A (2008). The impact of response to the results of diagnostics tests for malaria; cost-benefit analysis. *BMJ.* 336:202-205.

WHO (2013). World malaria report. Ultimo acceso: 29/10/2015. Sitio en internet: http://www.who.int/malaria/publications/world_malaria_report_2013/report/en/.

WHO (2014). World malaria report. Ultimo acceso: 30/10/2015. Sitio en internet: http://www.who.int/malaria/publications/world_malaria_report_2014/en/.

Zuccala ES, Baum J (2011). Cytoskeletal and membrane remodelling during malaria parasite invasion of the human erythrocyte. *BJH.* 154:680-689.

Zurzate-Luis V, Mota M, Vigário A (2014). Malaria infections: What and how can mice teach us?. *JIM.*11856:1-10.