



UNIVERSIDAD DE BELGRANO

# Las tesis de Belgrano

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales  
Carrera Farmacia

Estudio comparativo de la toxicidad, de  
Artemisinina administrada en solución y  
encapsulada en liposomas

N° 657

Sebastián Vargas Biason

Tutor: Jorge Martiarena

Departamento de Investigaciones  
Fecha defensa de tesina 29 de diciembre de 2014

Universidad de Belgrano  
Zabala 1837 (C1426DQ6)  
Ciudad Autónoma de Buenos Aires - Argentina  
Tel.: 011-4788-5400 int. 2533  
e-mail: [invest@ub.edu.ar](mailto:invest@ub.edu.ar)  
url: <http://www.ub.edu.ar/investigaciones>



## INDICE

1	Resumen:.....	5
2	Introducción:.....	5
3	Objetivos: .....	6
4	Marco Teórico:.....	7
	4.1 Paludismo o Malaria .....	7
	4.2 Datos y cifras .....	7
	4.3 Ciclo de vida del Plasmodium:.....	8
	Esporogonia en el mosquito (C, Sporogonic cycle):.....	9
	Esquizogonia en el huésped humano:.....	9
	Fase Preeritrocítica - Esquizogonia en el hígado (A, Exo-Eritrocyclic cycle):.....	10
	Fase Eritrocitaria-Esquizogonia (B, Eritrocyclic cycle):.....	10
	4.4 Diagnostico .....	11
5	Artemisinina: .....	12
	5.1 Absorción, biotransformación y excreción .....	14
	5.2 Usos terapéuticos .....	14
	5.3 Efectos tóxicos y contraindicaciones .....	14
	5.4 Artemisinina Según OMS.....	15
6	Reticulocitos:.....	15
	6.1 Conteo de reticulocitos .....	16
	Significado clínico: .....	17
	Expresión de resultados: .....	17
	Utilidad clínica:.....	17
7	Micronúcleos:.....	19
8	Liposomas:.....	23
	8.1 Clasificación:.....	25
	8.2 Técnicas de fabricación: .....	27
9	POLIETILENGLICOL 400 .....	29
	9.1 Descripción: .....	29
	9.2 Datos Físico-Químicos.....	29
	9.3 Polietilenglicol 4000: .....	29
	9.4 Polietilenglicol 6000: .....	29
	Propiedades y usos: .....	29
	9.5 Ejemplos de FORMULACIONES:.....	30
10	Técnicas de obtención de muestras e inoculación de drogas .....	31
	10.1 Extracción seno retro-orbital .....	31
	10.2 Técnica de administración de las muestras:.....	32
11	MATERIALES Y METODOS: .....	33
	11.1 Materiales: .....	33
	Artemisinina: .....	33
	Ratones:.....	37
	Liposomas:.....	38
	11.2 Conteo de Reticulocitos:.....	39
	11.3 Conteo de Micronúcleos: .....	40
12	RESULTADOS: .....	41
	12.1 % RETICULOCITOS en ratones tratados con ART p.o. 43 µg.....	41
	12.2 Micronúcleos en ratones tratados con ART i.p. 43 µg a las 24 y 48hs .....	42
	12.3 % RETICULOCITOS en ratones tratados con ART/LPS i.p. 43 µg .....	43
	12.4 Micronúcleos en ratones tratados con ART/LPS i.p. 43 µg a las 24 y 48hs .....	44
	12.5 reticulocitos a las 24 y 48hs en Ratones tratados con una dosis previa de EPO MÁS ART i.p. ....	46
	12.6 Micronucleos a las 24 y 48hs en Ratones tratados con una dosis previa de EPO MÁS dosis de ART i.p.....	47
13	Discusión y Conclusión: .....	48
14	Indice DE IMÁGENES:.....	49
15	Índice de tablas: .....	49
16	Bibliografía .....	50



## 1 RESUMEN:

La Artemisinina (ART) es una droga extraída de la *Artemisia Annu*, utilizada en el tratamiento de la malaria en la medicina tradicional china desde hace 5000 años aproximadamente, denominada Qinghaosu.

Debido a la presencia de un puente endoperóxido, al romperse, genera un radical libre, caracterizada por poseer uno o más electrones desapareados, con gran poder reactivo. En general, es extremadamente inestable y, por tanto, y de vida media muy corta. Este compuesto presenta efectos tóxicos de mutagenicidad, carcinogenicidad, irritante y teratogénesis en animales de experimentación.

Algunos trabajos han demostrado cierta toxicidad de la Artemisinina y sus derivados, utilizando test de micronúcleos o test del cometa como indicadores biológicos. Por ejemplo el Artesunato, que al ser administrado por vía oral, pueden ser agentes genotóxicos.

En este trabajo se llevo a cabo un análisis comparativo de toxicidad in vivo de una muestra de Artemisinina en polvo reconstituida en una solución de PEG400, donada por Artemisinin Development Co. Ltd., Abuja, Nigeria. Su pureza fue demostrada por análisis de RMN y Espectrofotometría de masa.

Se estudiaron dos preparaciones de ART. En la primera preparación se utilizó PEG400 como vehículo para la ART. En la segunda se encapsuló ART en liposomas.

Se realizaron ensayos en ratones suizos machos y hembras de 25 a 30g de peso. El primer ensayo consistió en administrar ART en solución PEG400 vía oral e intraperitoneal. En el segundo ensayo se estudió la acción de la ART bajo las mismas condiciones del primer estudio frente a una estimulación de la médula ósea por una dosis de Eritropoyetina (EPO) administrada 24 hs. antes. En el tercer ensayo se administró ART en liposomas por vía intraperitoneal.

Se administró la droga vía intraperitoneal en una concentración 5 mM (43µg/30g) Se comparó el porcentaje de reticulocitos en sangre periférica y el número de eritrocitos policromáticos micronucleados (EPM) por 1000 eritrocitos policromáticos en médula ósea.

Los resultados obtenidos mostraron una reducción de toxicidad en los animales tratados con ART/liposomas.

El estímulo de EPO se ve reducido en un 50 % aproximadamente a las 24 hs de ser administrada la ART, por lo cual, podemos pensar que la ART causa un daño considerable en medula ósea, afectando la progenie eritroide en medula ósea.

La administración de ART en liposomas mostró resultados que indican que la utilización de la droga en liposomas puede ser una vía factible para el tratamiento de parásitos como el *Plasmodium Falciparum*.

## 2 INTRODUCCIÓN:

El paludismo, o malaria, es una enfermedad potencialmente mortal causada por parásitos que se transmite al ser humano por la picadura de mosquitos infectados. En el año 2012, el paludismo causó cerca de 627 mil muertes, sobre todo en niños africanos (WHO, 2013).

El paludismo es causado por parásitos del género *Plasmodium*, que se transmite al ser humano por la picadura de mosquitos infectados del género *Anopheles*, el género principal del parásito es el *Plasmodium Falciparum*. En el organismo humano, los parásitos se multiplican en el hígado y después infectan los glóbulos rojos. Se encuentran referencias de las peculiares fiebres periódicas de la malaria a lo largo de la historia, comenzando desde 2700 a.c. en China. (Cox, 2002). Además también hay estudios que indican que la malaria ha infectado a los humanos durante más de 50.000 años, y puede que haya sido un patógeno humano durante la historia entera de nuestra especie (Joy, Feng, & Mu, 2003).

La Artemisinina (ART) es el componente activo, utilizado en la antigua China para el tratamiento de la fiebre, obtenido de la *Artemisia Annu* (Klayman, 1985). Muchas drogas han sido utilizadas en el tratamiento de esta enfermedad, siendo actualmente la Artemisinina una de las drogas más selectivas y con menor resistencia frente al parásito.

El desarrollo de técnicas que permiten el mantenimiento de parásitos palúdicos *in vitro* ha tenido una importancia fundamental en el desarrollo de agentes quimioterápicos (Trager & Jensen, 1976). Otro adelanto fue el establecimiento de métodos prácticos para determinar la susceptibilidad a los fármacos de las cepas palúdicas humanas (Rieckman, Sax, Campbell, & Mrema, 1978). Todo esto ha permitido grandes avances sobre el estudio de fármacos antipalúdicos.

La droga presenta un puente peróxido, que se rompe y produce radicales libres altamente reactivos que producen genotoxicidad (Sicardi, Martiarena, & Iglesias, 1991), comprometiendo la integridad genética de la población celular.

Algunos trabajos han demostrado cierta toxicidad de la Artemisinina, utilizando test de micronúcleos o test del cometa como indicadores biológicos, y de algunos de sus derivados, por ejemplo el Artesunato, que administrado por vía oral, puede ser un agente genotóxicos (Maistro, Aquino, & Perazzo, 2011).

Basados en estudios anteriores sobre la toxicidad de la Artemisinina y en la utilización de fármacos administrados en liposomas en la actualidad, se procede a realizar estudios comparativos *in vivo* entre ART administrada directamente en solución y ART encapsulada en liposomas, en ratones swiss machos y hembras, evaluando indirectamente alteraciones cromosomales y una posible insuficiencia en medula ósea a través del test de micronúcleos y un conteo de reticulocitos en sangre periférica. (Schmid, 1975).

Los liposomas constituyen un desafío tecnológico y son utilizados en la tecnología farmacéutica (Clares, 2003) y dermatológica para administrar componentes tóxicos, biodegradables y por su capacidad de contener principios activos (Ball, 1995). Son utilizados en preparaciones oncológicas como Metotrexato y Doxorubicina, y en fungicidas como Anfotericina B (Gabizon, Tzemach, Mack, Bronstein, & Horowitz, 1988).

De este modo, podemos pensar que el complejo ART-Liposoma puede ser una vía factible para realizar un tratamiento frente a la malaria, disminuyendo sus efectos adversos.

### 3 OBJETIVOS:

El objetivo principal es proporcionar un sistema de administración de ART que disminuya la citotoxicidad de la misma, por medio de ensayos biológicos comparativos de la droga en solución y encapsulada en Liposomas administradas por vía oral e intraperitoneal respectivamente.

Evaluar indirectamente alteraciones cromosomales en médula ósea, utilizando el test de micronúcleos.

Evaluación de una posible insuficiencia en medula ósea mediante un conteo de reticulocitos en extendidos de sangre periférica.

Evaluar la actividad estimuladora de la Eritropoyetina frente a una dosis de Artemisinina, lo cual, nos podrá dar indicios de la respuesta estimuladora de EPO en médula ósea y la acción inhibitoria de ART sobre la EPO.

Los liposomas cargados con ART, realmente podrían representar una nueva estrategia para el desarrollo de nanovehículos terapéuticos, bien tolerados y eficaces para el tratamiento de enfermedades parasitarias, proporcionando una vía factible para el tratamiento de la Malaria con un menor porcentaje de efectos tóxicos. Por esa razón, el objetivo principal es formar un sistema ART-Liposoma que disminuya los efectos citotóxicos de la ART y su vez sean altamente eficiente para el tratamiento de la Malaria.

Este trabajo deja las puertas abiertas para una futura evaluación de la eficacia de ART-liposoma sobre el parásito *Plasmodium Falciparum*.

## 4 MARCO TEÓRICO:

### 4.1 PALUDISMO O MALARIA

Según la OMS, el paludismo es causado por un parásito denominado Plasmodium que se transmite a través de la picadura de mosquitos infectados del género Anopheles. En el organismo humano, los parásitos se multiplican en el hígado y después infectan los glóbulos rojos.

Entre los síntomas del paludismo se destacan la fiebre, las cefaleas y los vómitos, que generalmente aparecen 10 a 15 días después de la picadura del mosquito. Si no se trata, el paludismo puede poner en peligro la vida del paciente en poco tiempo, pues altera el aporte de sangre a órganos vitales debido a la destrucción de eritrocitos por el parásito. En muchas zonas del mundo los parásitos se han vuelto resistentes a varios antipalúdicos (WHO, 2013).

Entre las intervenciones fundamentales para controlar la malaria se encuentran el tratamiento rápido y eficaz con combinaciones de medicamentos basadas en la Artemisinina (Woodrow, Haynes, & Krishna, 2005), el uso de mosquiteros impregnados en insecticida por parte de las personas en riesgo y la fumigación de los espacios cerrados con insecticidas de acción residual, a fin de controlar los mosquitos vectores.

### 4.2 DATOS Y CIFRAS

El paludismo, o malaria, es una enfermedad potencialmente mortal causada por parásitos que se transmiten al ser humano por la picadura de mosquitos infectados.

Según las últimas estimaciones, en 2012 se produjeron 207 millones de casos de paludismo (con un margen de incertidumbre que oscila entre 135 millones y 287 millones) que ocasionaron la muerte de unas 627 000 personas (con un margen de incertidumbre que oscila entre 473 000 y 789 000). La tasa de mortalidad por malaria, según la OMS, se ha reducido en más de un 45% desde el año 2000 a nivel mundial, y en un 49% en la Región de África.

El paludismo es prevenible y curable. Gracias al aumento de las medidas de prevención y control de la enfermedad se está reduciendo notablemente en diferentes zonas endémicas.

Los viajeros no inmunes procedentes de zonas sin paludismo que contraen la infección son muy vulnerables a la enfermedad.

En las zonas afectadas por la malaria, los niños y las mujeres embarazadas son especialmente vulnerables, esto se ve agravado por la pobreza y la falta de recursos. En África, donde el 80% de los casos de malaria se tratan en el hogar, la enfermedad mata a un niño de cada veinte antes de la edad de cinco años.

La mayoría de las muertes se producen entre niños que viven en África, cuya tasa de mortalidad por paludismo se ha reducido desde el año 2000 en un porcentaje estimado del 54%.

El paludismo es causado por parásitos del género Plasmodium, que es un protozoario. Plasmodium, del género de protistas del filo Apicomplexa, clase Aconoidasida, orden Haemosporida y familia Plasmodiidae del que se conocen más de 175 especies (Chavette, Chiron, Chabaud, & Landau, 2007). Se transmiten al ser humano por la picadura de mosquitos infectados del género Anopheles, los llamados vectores del paludismo, que pican sobre todo entre al anochecer y el amanecer.

Hay cuatro tipos de paludismo humano:

- Plasmodium falciparum;
- Plasmodium vivax;
- Plasmodium malariae;
- Plasmodium ovale.

Los más frecuentes son el paludismo por *Plasmodium falciparum*, siendo este el más mortal, y por *Plasmodium vivax*.

El aumento constante de casos de Malaria se debe: a) a una resistencia del parásito hacia a los fármacos; b) los mosquitos resistentes a los insecticidas; c) el cambio climático global; d) la continua pobreza; e) inestabilidad política.

Un rápido aumento de la malaria podría haber tenido lugar hace unos 10.000 años. Los patrones de variación genética en el ADN mitocondrial del parásito apoyan este modelo. Las mitocondrias de los parásitos del paludismo tiene algunas características evolutivas y funcionales inusuales, su maquinaria de traducción inusual según lo revelado por los genes del RNA ribosomal mitocondrial, podrían ser el motivo de la evolución de la resistencia a los medicamentos y la evasión de la vacuna (Vaidya & Mather, 2009).

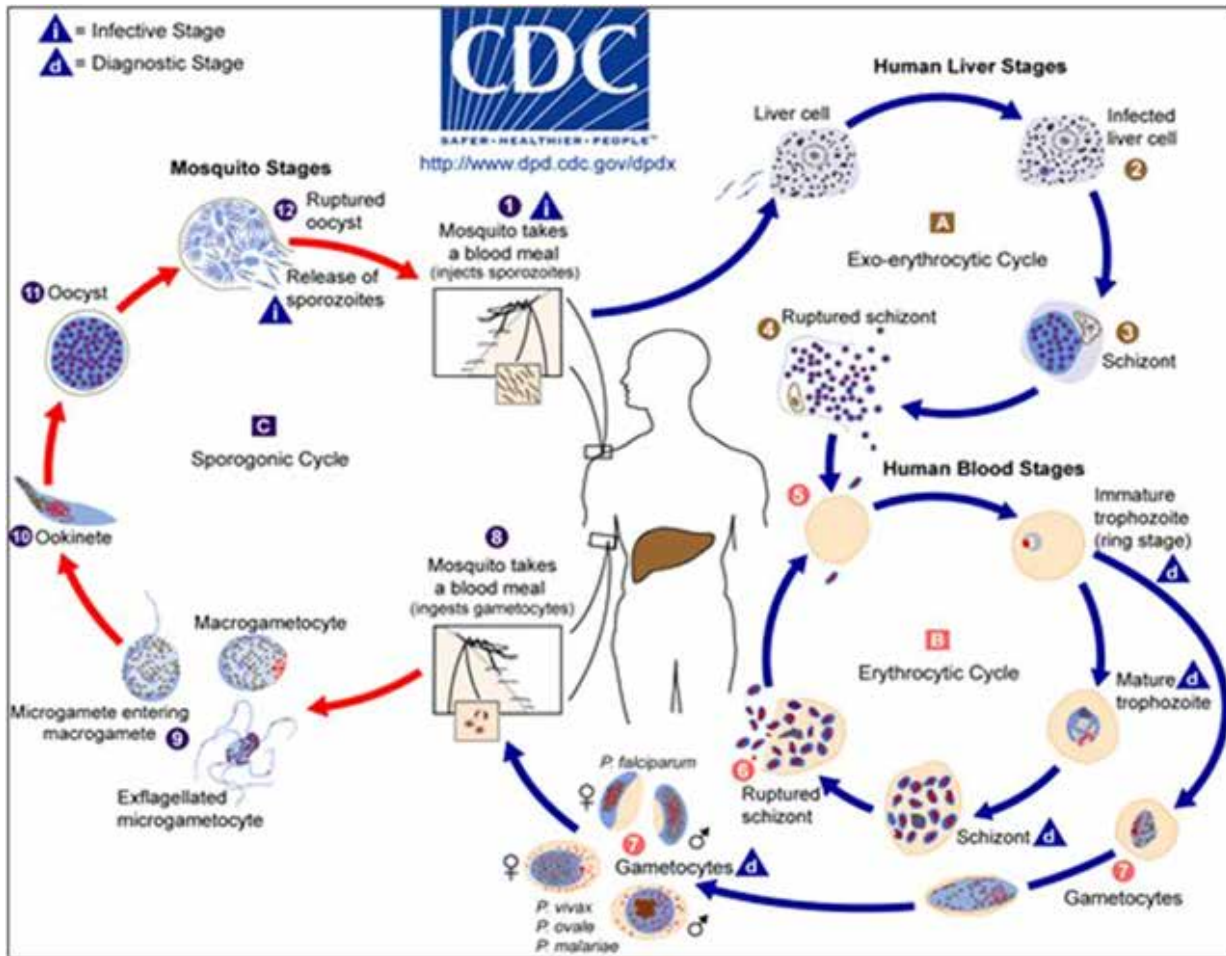
Actualmente, no hay ninguna vacuna autorizada contra el paludismo u otro parásito humano alguno. Sin embargo, la investigación sobre una vacuna contra el paludismo por *Plasmodium Falciparum*, está muy avanzada, por ejemplo las vacunas SPf66 (Wiley & Sons, 2009) y RTS S/AS01, están muy avanzadas (Agnandji ST, 2011). En este momento, la vacuna es objeto de evaluación mediante un gran ensayo clínico que se lleva a cabo en siete países africanos. La OMS recomendará su uso en función de los resultados finales obtenidos en los ensayos clínicos. Se prevé que esos resultados estén listos en 2014 y que la OMS formule una recomendación acerca de si la vacuna debe incluirse entre los medios de lucha antipalúdica en 2015 (Schwartz, Graham, Genton, & Moorthy, 2012).

### **4.3 CICLO DE VIDA DEL PLASMODIUM:**

El parásito de la malaria tiene un ciclo de vida complejo de varias etapas que ocurren dentro de los mosquitos (vectores) y luego en los huéspedes (humanos). La supervivencia y el desarrollo del parásito dentro de los invertebrados y vertebrados, en ambientes intracelulares y extracelulares, es posible gracias a un conjunto de herramientas de más de 5.000 genes y sus proteínas especializadas que ayudan al parásito a invadir y crecer dentro de múltiples tipos de células y al mismo tiempo, evadir respuestas inmunes del huésped (Greenwood, y otros, 2008). El parásito pasa por varias etapas de desarrollo, tales como los Esporozoitos, la forma infecciosa inyectada por el mosquito. Merozoítos, la etapa que invaden los eritrocitos. Trofozoítos, la forma que se multiplica en los eritrocitos, y Gametocitos, en las etapas sexuales. Cada etapa tiene sus propias formas, estructuras y complementos de proteínas únicas. Las proteínas de la superficie y las vías metabólicas van cambiando durante estas diferentes etapas, que ayudan al parásito a evadir la respuesta inmunitaria (aspecto de cierta similitud con el cáncer), Esto dificulta el desarrollo de medicamentos y vacunas. (Floren, Washburn, Raine, & otros, 2002).

Los mosquitos son los huéspedes definitivos para los parásitos de la malaria, en él, se produce la fase sexual del ciclo de vida del parásito. La fase sexual se denomina Esporogonia y da como resultado el desarrollo de innumerables formas infectantes del parásito, que inducen la enfermedad en el huésped humano.





1: Ciclo de vida del parásito dentro del mosquito y dentro del ser humano. (CDC, 2012)

Esporogonia en el mosquito (C. Sporogonic cycle):

Los gametocitos masculinos y femeninos se alojan en el intestino del mosquito, fusionándose para formar los cigotos. El crecimiento y la división de cada gametocito produce miles de formas haploides activas llamadas Esporozoítos. Después de la fase esporogónica, 8 a 15 días aproximadamente, los esporozoítos viajan e invaden las glándulas salivales del mosquito. Cuando el mosquito pica a otro huésped, causa la infección de la malaria. (Barillas-Mury & Kumar, 2005)

Se ha encontrado que el mosquito infectado y el parásito se benefician mutuamente entre sí y de ese modo promueven la transmisión de la infección. Los mosquitos infectados con Plasmodium tienen una mejor supervivencia y muestran una mayor tasa de alimentación de la sangre, sobre todo de un huésped infectado. (Ferguson & Read, 2004)

Esquizogonia en el huésped humano:

El hombre es el huésped intermediario para la malaria, en el que se produce la fase asexual del ciclo de vida. Los Esporozoítos, inoculados por el mosquito infectado, inician esta fase del ciclo desde el hígado, y la última parte continúa dentro de los glóbulos rojos de la sangre, lo que resulta en las diversas manifestaciones clínicas de la enfermedad.

### Fase Preeritrocítica - Esquizogonia en el hígado (A. Exo-Erythrocytic cycle):

Con la picadura del mosquito, decenas a unos pocos cientos de esporozoítos invasores se introducen en la piel. Después de la deposición intradérmica, algunos esporozoítos son destruidos por los macrófagos locales, otros entran en los vasos linfáticos, y algunos otros por vasos sanguíneos (Vaughan, Aly, & Kappe, 2008). Los esporozoítos que entran en un vaso linfático pueden cebar las células T para montar una respuesta inmune protectora. (Good & Doolan, 2007).

Los esporozoítos que encuentran un vaso sanguíneo, alcanzan el hígado dentro de unas pocas horas. Se ha demostrado recientemente, que los esporozoítos viajan por una secuencia continua de motilidad palillo y deslizamiento, utilizando proteína anónima relacionada con Trombospondina (TRAP) y un motor de actina-miosina (Münter, Sabass, Selhuber-Unke, & otros, 2009). TRAP interacciona con la miosina y forma un complejo miosina-TRAP-ligando a lo largo de los filamentos de actina, lo que genera el movimiento del esporozoíto hacia adelante (Naitza, Spano, Robson, & Cristanti, 1998).

Los esporozoítos migran hacia los hepatocitos, luego se multiplican y crecen dentro de las vacuolas parasitóforas. Cada esporozoíto se desarrolla en un esquizonte que contiene 10.000 a 30.000 merozoítos (o más en el caso de *P. Falciparum*), (Kebaier, Voza, & Vanderberg, 2009). La fase Preeritrocítica dura aproximadamente 5-16 días, dependiendo de la especie del parásito. En un promedio de 5-6 días para *Plasmodium Falciparum*, 8 días para *Plasmodium vivax*, 9 días para *Plasmodium ovale*, 13 días para *Plasmodium malariae* y 8-9 días para *Plasmodium knowlesi*. La fase Preeritrocítica sigue siendo una fase "silenciosa", no presenta síntomas, ya que sólo unos pocos hepatocitos se ven afectados. (Vaughan, Aly, & Kappe, Malaria parasite pre-erythrocytic stage infection: Gliding and Hiding, 2008). Esta fase el ciclo se produce una sola vez, a diferencia de la siguiente, fase eritrocítica, que se produce repetidamente.

Los merozoítos que se desarrollan dentro del hepatocito están contenidos dentro de vesículas denominadas merozomas, salen del hígado protegiendo a los merozoítos de la fagocitosis por las células de Kupffer que forman parte de la barrera sinusoidal. Estos merozoítos se liberan con el tiempo en el torrente sanguíneo e inician la etapa de infección en la sangre. (Silvie, Mota, Matuschewski, & Prudêncio, 2008).

En *P. vivax* y *P. ovale*, algunos de los esporozoítos pueden permanecer latentes durante meses dentro del hígado. Denominados como hipnozoítos, (Cogswell, 1992), estas formas se transforman en esquizontes después de un período de latencia, por lo general, después de unas pocas semanas o meses. Se ha sugerido que estos hipnozoítos, en desarrollo, son genotípicamente diferentes de los esporozoítos que causan infección aguda poco después de la inoculación por una picadura de mosquito y en muchos pacientes causa recaídas de la infección clínica después de semanas a meses. (Collins, 2007).

### Fase Eritrocitaria-Esquizogonia (B. Erythrocytic cycle):

Los glóbulos rojos son el "lugar central" para el desarrollo asexual del parásito de la malaria. Dentro de los glóbulos rojos, ciclos repetidos de desarrollo parasitario se producen con periodicidad precisa, y al final de cada ciclo, cientos de parásitos se liberan e invaden más cantidad de glóbulos rojos.

Los merozoítos liberados por el hígado reconocen, se unen y entran en los glóbulos rojos por múltiples interacciones ligando-receptor en tan sólo 60 segundos. Esta rápida desaparición de la circulación reduce al mínimo la exposición de los antígenos en la superficie del parásito, protegiendo así estas formas parasitarias de la respuesta inmune del huésped, (Cowman & Crabb, 2006).

La invasión de los merozoítos en las células rojas se ve facilitada por las interacciones moleculares entre diferentes ligandos sobre los merozoítos y los receptores de membrana. El esporozoíto entra al hepatocito atravesando la célula de Kupffer (CK) sin causarle estallido. Esto se logra mediante un mecanismo determinado donde la proteína principal del esporozoíto, circumsporozoíto, se une a la lipoproteína de baja densidad relacionada con la proteína 1 (LRP1) que se encuentra en el hepatocito del huésped humano. LRP1 es un receptor acoplado a una proteína G, por lo tanto al unirse desencadena una serie de mecanismos que induce la formación de AMPc y el favorece el aumento de IP3, esto impide la formación de especies reactivas de oxígeno (ROS) y evita el estallido de las CK, manteniendo una cantidad normal de CK y favorecer la infección por otros esporozoítos (S. Yalaoui, 2008).

La forma más virulenta es *P. Falciparum*, que utiliza varias familias de receptores diferentes y vías de invasión alternativas. El *P. Falciparum* tiene cuatro uniones en comparación de *P. vivax*, permitiendo al *P. Falciparum* invadir a cualquier célula roja, (Mayera, y otros, 2009).

Dentro de los glóbulos rojos, los números de parásitos se expanden rápidamente con un ciclo sostenido aumentando la población de parásitos. A pesar de que las células rojas proporcionan alguna ventaja inmunológica al parásito creciente, la falta de vías biosintéticas estándar y orgánulos intracelulares en las células rojas tiende a crear obstáculos para los parásitos intracelulares. La hemoglobina de los glóbulos rojos, es el principal nutriente para el parásito, se ingiere en una vacuola alimentaria y se degrada. El parásito depende de la glucólisis anaeróbica para la energía, la utilización de enzimas tales como lactato deshidrogenasa del *Plasmodium* (pLDH). A medida que el parásito crece y se multiplica, se modifica la permeabilidad de la membrana citosólica del glóbulo rojo y la composición de la célula huésped. Estas nuevas vías de permeación inducidos por el parásito en la membrana de la célula huésped ayuda no sólo en la absorción de solutos desde el medio extracelular, también a la eliminación de desechos metabólicos, y en el origen y mantenimiento de gradientes iónicos electroquímicos. Al mismo tiempo, la hemólisis prematura de la célula roja infectada se evita por la ingestión excesiva, la digestión, y la desintoxicación de la hemoglobina de la célula huésped y su descarga fuera de los glóbulos rojos infectados a través de las nuevas vías de permeación, preservando así la estabilidad osmótica de los glóbulos rojos infectados, (Lew, Tiffert, & Ginsburg, 2003).

El ciclo eritrocítico se produce cada 24 horas en caso de *P. Knowlesi*, 48 horas en casos de *P. Falciparum*, *P. vivax* y *P. ovale* y 72 h en el caso de *P. malariae*. Durante cada ciclo, cada merozoíto crece y se divide dentro de la vacuola en 8 a 32 merozoítos nuevos, a través de las etapas de anillo, trofozoítos y esquizonte. Al final del ciclo, los glóbulos rojos infectados se rompen, liberando los nuevos merozoítos que a su vez infectan más glóbulos rojos, repitiéndose cíclicamente el proceso de infección.

La rotura simultánea de millones de glóbulos rojos causa los síntomas del paludismo: escalofríos seguidos de fiebres altas provocadas por las sustancias tóxicas liberadas por el parásito, que afectan otros órganos del huésped.

#### 4.4 DIAGNOSTICO

Los síntomas de la malaria no complicada son bastante inespecíficos, fiebre y escalofríos, de modo tal que al principio es difícil detectar el diagnóstico.

La malaria no tratada puede provocar la muerte, por eso es importante un diagnóstico de sospecha en cualquier paciente con antecedentes de viajes o residencia en áreas endémicas.

Los síntomas más comunes, además de la fiebre y los escalofríos son: dolor de cabeza, dolores musculares (mialgias), dolores articulares (artralgias), malestar general, dolor de cabeza, marcado decaimiento y trastornos digestivos (náuseas, vómitos y diarrea). Estos síntomas pueden ser fácilmente confundidos con gripe, gastroenteritis o, inclusive fiebre tifoidea, fiebre reumática o meningitis bacteriana. Si la infección persiste pueden presentarse síntomas como esplenomegalia, anemia con o sin trombocitopenia, hipoglucemia, disfunción renal o pulmonar y alteraciones neurológicas.

Todos los signos y síntomas varían en función de la especie de *Plasmodium*, la carga parasitaria y el estado inmune del paciente.

Los síntomas se manifiestan inicialmente como una gripe o gastroenteritis. Se presenta fiebre por encima de los 38°C. La fiebre se presenta después de 48 a 72hs, luego que el parásito haya ingresado a la circulación sanguínea y puede presentarse en ciclos de cuatro u ocho horas.

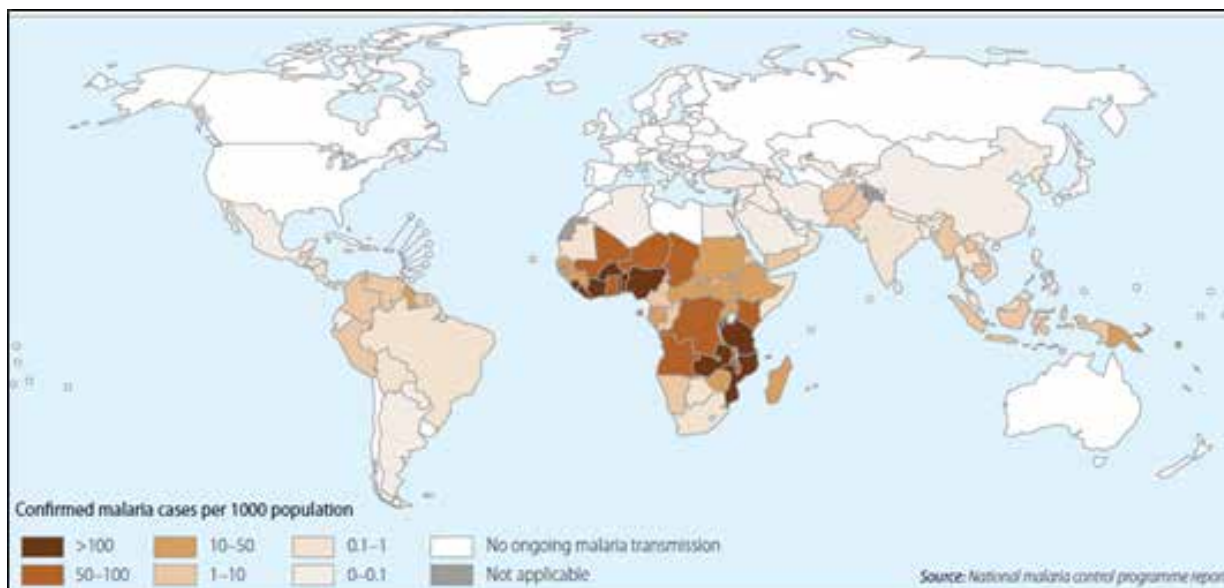
Hay tres escenarios en malaria clásica. Éstos son:

Frío con temblor

Fiebre, dolores de cabeza, vómitos

Pérdida de fuerza intensa, con mal estar general.

Aproximadamente la mitad de la población mundial corre el riesgo de padecer el paludismo. La mayoría de los casos y de las muertes se registran en el África subsahariana. No obstante, también se ven afectadas Asia, Latinoamérica y, en menor medida, Oriente Medio y algunas zonas de Europa. En 2013 el paludismo estaba presente en 97 países y territorios. (WHO, 2013).



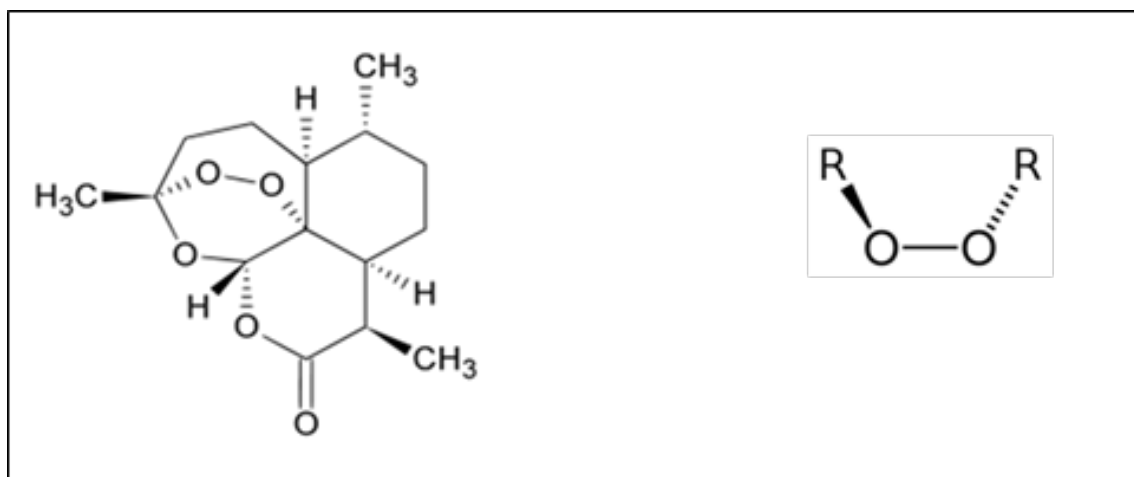
2: Countries with ongoing transmission of malaria, 2013. (WHO, 2013).

## 5 ARTEMISININA:

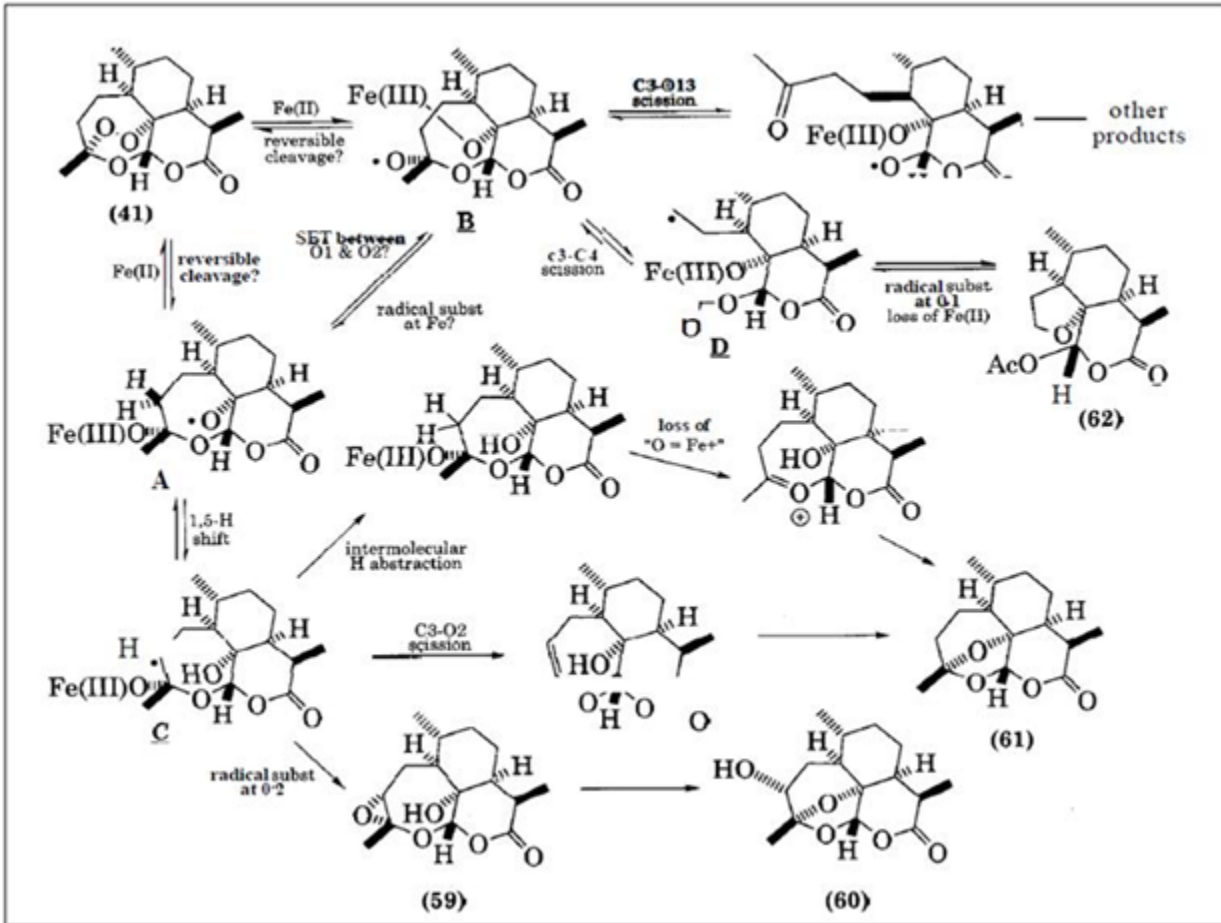
La Artemisinina o Qinghaosu, y sus derivados son una familia de fármacos que poseen la acción más rápida de todos los medicamentos comunes contra la malaria Falciparum (White, 1997). Los tratamientos que contienen derivados de la Artemisinina son hoy día el tratamiento estándar a nivel mundial para la Malaria. El componente principal de la Artemisinina es aislado de la planta Artemisia Annuua, una hierba descrita en la Medicina tradicional china. Los chinos concedieron valor nutricional a esta planta por más de 2000 años (Klayman, 1985). Desde el año 340 de nuestra era Ge Hong recetaba té hecho con Qinghaosu como remedio para la fiebre y en 1956 Li Shizhen recomendó su uso para combatir el paludismo.

En 1972 los científicos chinos extrajeron y cristalizaron el principal componente de Qinghaosu.

El compuesto es una lactona sesquiterpénica, tiene un puente peróxido en su estructura que al romperse produce radicales libres, constituyendo compuestos clastogénicos (Sicardi, Martiarena, & Iglesias, 1991).



3: Molécula de Artemisinina y su puente endoperóxido. (Brunton, Lazo, & Parker, 2013)



4: Posibles radicales de la Artemisinina. (Abraham, 2003)

La Artemisinina y sus derivados pueden clasificarse como antipalúdicos potentes y de acción rápida que no muestran signos de resistencia clínica. Son especialmente adecuados para tratar paludismo grave por *Plasmodium falciparum*.

En China, millones de pacientes fueron tratados con endoperóxidos que por lo común son considerados como inocuos. Sin embargo la FDA no ha aprobado su venta, por lo tanto no están regulados y es frecuente la distribución de sustitutos inactivos, como ser falsificaciones o de calidad inferior. (Newton, Dondorp, Green, & otros, 2003b).

Su actividad antiparasitaria ha sido demostrada por estudios de estructura/actividad que han confirmado la necesidad de una fracción endoperóxido para que el fármaco tenga actividad antipalúdica (O'Neill & Posner, 2004). Los compuestos de esta categoría actúan rápidamente contra las fases eritrocíticas asexuales de *P. falciparum*. Su potencia es de 10 a 100 veces mayor que otros antipalúdicos (White N., 1997).

El modelo actual de la ART comprende dos etapas (Meshnick, 2001). En primer lugar el hierro del grupo hemo dentro del parásito cataliza la separación del puente endoperóxido, a la fase anterior sigue la reducción de un radical, que alquila y daña las macromoléculas del parásito (Eckstein-Ludwig, Webb, Goethem, & otros, 2003).

La Artemisinina y sus derivados muestran actividad antiparasitaria in vitro contra otros protozoos que incluyen *Leishmania major* y *Toxoplasma gondii*, y se han utilizado solos o en combinación en individuos con esquistosomiasis (Utzinger, Keiser, Shuhua, & otros, 2003).

## 5.1 ABSORCIÓN, BIOTRANSFORMACIÓN Y EXCRECIÓN

Las Artemisininas semisintéticas han sido preparadas para uso por varias vías que incluyen la oral (dihidroartemisinina, artesunato y artemeter); la intramuscular (artesunato y artemeter); la intravenosa (artesunato) y la rectal (artesunato). En términos generales no se conocen a detalle la biotransformación y la eliminación de las artemisininas (Giao & Vries, 2001). La absorción después de ingerir el fármaco, en forma típica, es de 30% o menos. Surgen niveles plasmáticos máximos en término de minutos de haber administrado artesunato y de 2 a 6 h después de la administración de artemeter. Los endoperóxidos no se fijan ávidamente a las proteínas plasmáticas, aunque la unión puede ser covalente. El artesunato y el artemeter son convertidos extensamente hasta la forma de dihidroartemisinina, que genera gran parte de su actividad antipalúdica y tiene una semivida plasmática de 1 a 2 h solamente; su metabolito principal en la orina es un glucurónido. Con dosis repetidas la Artemisinina y el Artesunato se induce su propio metabolismo mediado por el citocromo P450 que puede intensificar su velocidad de eliminación hasta 5 veces. Quedan por estudiar los aspectos complejos e importantes no dilucidados de las interacciones metabólicas entre las Artemisininas y otros antipalúdicos con los que casi siempre se les administra conjuntamente (Giao & Vries, 2001); sin embargo, al parecer no surgen interacciones farmacocinéticas tóxicas de importancia clínica entre los compuestos de Artemisinina y la Mefloquina por ejemplo (Brunton, Lazo, & Parker, 2013).

## 5.2 USOS TERAPÉUTICOS

Dada su actividad potente y rápida incluso contra parásitos resistentes a múltiples fármacos, las Artemisininas son útiles para el tratamiento inicial de infecciones por *P. falciparum* graves. Los fármacos de esta categoría por lo común no se utilizan solos, porque su eficacia es incompleta y también para evitar que surjan parásitos resistentes. Sin embargo, en una serie de investigaciones en África, América del Sur y Asia, el Artesunato resultó extraordinariamente útil en combinación con otros antipalúdicos como tratamiento de primera línea del paludismo (Adjuik, Babiker, Garner, & otros, 2004). En la actualidad se recomiendan las combinaciones terapéuticas que incluyan Artemisinina (Artemisinin combination treatment, 2013), porque la adición de endoperóxidos permite la disminución rápida y sustancial del número de parásitos, baja la posibilidad de que surja resistencia y disminuye la transmisión de la enfermedad al reducir el estado de portador de gametocitos. No deben utilizarse tales fármacos en profilaxis, dada su semivida breve, por la definición incompleta de su inocuidad en personas sanas y por su poca fiabilidad terapéutica cuando se utilizan solos (Brunton, Lazo, & Parker, 2013).

## 5.3 EFECTOS TÓXICOS Y CONTRAINDICACIONES

A pesar de la falta relativa de estudios formales de inocuidad en seres humanos, después de tres decenios y empleo en millones de personas, las Artemisininas se han ganado la reputación de inocuas (Taylor & White, 2004). Sin embargo, persiste la necesidad apremiante de contar con datos sistemáticos sobre tales renglones en los humanos, especialmente en niños (Johann-Liang y Albrecht, 2003). En estudios preclínicos de toxicidad los principales órganos estudiados fueron encéfalo, hígado, médula ósea y el feto. La neurotoxicidad en ratas y perros se manifestó más en núcleos del tallo encefálico y fue más intensa con derivados lipófilicos. En humanos, los innumerables cambios neurológicos que surgen en el paludismo grave desorientan en la evaluación de los efectos tóxicos en el sistema nervioso; sin embargo, no se identificaron cambios sistemáticos atribuibles al tratamiento en personas mayores de cinco años de vida. Como ocurrió en animales, se han observado cambios propios de las dosis y reversibles en el número de reticulocitos y neutrófilos y en los niveles de transaminasa en pacientes. En promedio, uno de cada 3000 pacientes termina por mostrar una reacción alérgica. En animales las Artemisininas son embriotoxinas potentes. Sólo unos cuantos estudios pequeños han vigilado en forma seriada la culminación de embarazos en mujeres tratadas con endoperóxidos, pero hasta la fecha no ha habido incremento notificado en el número de anomalías congénitas o del desarrollo (McGready, Cho, Cho, & otros, 1998). No se ha estudiado el dilema de la pérdida fetal temprana en seres humanos. Ante el estado actual de datos sobre inocuidad, habrá que utilizar con cautela las Artemisininas en niños de muy corta edad y en embarazadas (Brunton, Lazo, & Parker, 2013).

## 5.4 ARTEMISININA SEGÚN OMS

Grupo: agente antipalúdico

Información general: La Artemisinina es un esquizotónico hemático potente y rápido. Es una lactona sesquiterpénica aislada de *Artemisia Annua*. Es menos potente que sus derivados y, por consiguiente, se debe aplicar en dosis más elevadas.

Aplicación clínica: Tratamiento del paludismo *Falciparum* sin complicaciones en zonas donde hay indicios de que la cloroquina, la pirimetamina/sulfadoxina, la mefloquina y la quinina son ineficaces.

Dosificación y administración: Adultos y niños: 25 mg/kg el primer día seguidos de 12,5 mg/kg los días segundo y tercero en combinación con mefloquina (15 mg/kg) en una dosis única el segundo día. En algunas zonas puede ser necesaria una dosis mayor de mefloquina (25 mg/kg) para lograr la curación.

Contraindicaciones: Embarazo durante el primer trimestre.

Precauciones: La Artemisinina se debe emplear para el tratamiento del paludismo *Falciparum* grave únicamente cuando hay pruebas de que la eficacia antipalúdica de la Quinina se ve disminuida.

Empleo en el embarazo: Se tiene escasa experiencia con respecto al empleo de este fármaco en el embarazo, pero se puede utilizar después del primer trimestre.

Efectos adversos: Se puede producir fiebre de origen medicamentoso.

Se ha observado neurotoxicidad en estudios sobre animales, pero no en seres humanos. Dada la incertidumbre acerca de los efectos tóxicos, se debe actuar con cautela cuando se aplica un tratamiento de más de tres días.

## 6 RETICULOCITOS:

Los reticulocitos son glóbulos rojos que no han alcanzado la madurez. Se generan en la médula ósea y son liberados en el torrente sanguíneo en donde circulan durante aproximadamente de uno a dos días antes de transformarse en glóbulos rojos maduros. En general, sólo cerca del 1% de los glóbulos rojos presentes en el torrente sanguíneo son reticulocitos. (Rodak & Bernadette, 2005).

El recuento de reticulocitos mide la velocidad con la que estas células se producen en la médula ósea e ingresan en el torrente sanguíneo.

La presencia de glóbulos rojos ligeramente inmaduros (reticulocitos) puede indicar:

- Anemia con recuperación de médula ósea
- Anemia hemolítica
- Hemorragia

La anemia es una afección en la cual el cuerpo no tiene suficientes glóbulos rojos sanos. Los glóbulos rojos proporcionan el oxígeno a los tejidos del cuerpo.

Normalmente, los glóbulos rojos tienen una vida media aproximadamente de 120 días. En la anemia hemolítica, los glóbulos rojos en la sangre se destruyen antes de lo normal.

Los glóbulos rojos se pueden destruir debido a:

- Anomalías genéticas dentro de los glóbulos ( talasemia y deficiencia de glucosa-6-fosfato deshidrogenasa)
- Exposición a ciertos químicos, fármacos y toxinas
- Infecciones

El test de reticulocitos es un examen sanguíneo que mide el porcentaje de reticulocitos (glóbulos rojos ligeramente inmaduros) en la sangre (Joan Lluís Vives Corrons, 2006).

El examen se realiza para determinar si los glóbulos rojos sanguíneos se están produciendo en la médula ósea a una tasa apropiada. El número de reticulocitos en la sangre es un signo de la rapidez con la cual están siendo producidos y liberados por parte de la médula ósea.

Un resultado normal para adultos sanos que no son anémicos es alrededor de 0.5 a 1.5%.

El rango normal depende del nivel de hemoglobina. El rango es más alto si hay baja hemoglobina debido a sangrado o lisis de los glóbulos rojos. Los eritrocitos pueden romperse debido a hemotoxinas, por una reacción antígeno-anticuerpo, como eritroblastosis fetal (Wagle, 2011) o una reacción transfusional.

Un conteo de reticulocitos superior al normal puede indicar:

- Anemia debido a que los glóbulos se destruyen más pronto de lo normal (anemia hemolítica)
- Sangrado
- Trastorno sanguíneo en un feto o en un recién nacido, conocido como eritroblastosis fetal
- Enfermedad renal con aumento en la producción de una hormona llamada eritropoyetina
- Un conteo de reticulocitos inferior al normal puede indicar:
  - Insuficiencia de la médula ósea (como por ejemplo a causa de toxicidad por drogas, tumor, radioterapia o infección)
  - Cirrosis hepática
  - Anemia causada por bajos niveles de hierro
  - Enfermedad renal crónica
  - Anemia causada por niveles bajos de vitamina B12

Por ejemplo, es posible que la cantidad de reticulocitos en la sangre sea baja si la anemia se debe a una menor producción de reticulocitos en la médula ósea. El recuento puede ser superior porque se producen más reticulocitos para reemplazar a los glóbulos rojos que son destruidos por alguna enfermedad. El análisis también sirve para determinar si el tratamiento contra la anemia está haciendo efecto.

## 6.1 CONTEO DE RETICULOCITOS

Método: coloración supravital (azul de metileno, azul brillante de cresilo, nuevo azul de metileno); citometría de flujo, es una tecnología biofísica basada en la utilización de luz láser, empleada en el recuento y clasificación de células según sus características morfológicas, presencia de biomarcadores, y en la estructura de las proteínas. En los citómetros de flujo, las células suspendidas en un fluido atraviesan un finísimo tubo transparente sobre el que incide un delgado rayo de luz láser, la luz transmitida y dispersada por el pasaje de las células a través del tubo se recoge por medio de unos dispositivos de detección, permitiendo hacer inferencias en cuanto a tamaño y complejidad de las células (Ornatsky, Bandura, Baranov, Nitz, Winnik, & Tanner, 2010).

Valores de referencia para métodos manuales:

Proporción relativa: niños y adultos: 0.5 -1.5 %

neonatos: 2 – 6 %

Valor absoluto: adultos: 30 - 100.103 / $\mu$ l

neonatos: 65 - 230.103 / $\mu$ l

Para Métodos automatizados: niños y adultos: 0.5 – 2 %



### Significado clínico:

Los reticulocitos son células de transición entre los eritroblastos nucleados y los hematíes maduros. Cuando se someten a coloración supravital se observa el ARN durante el proceso de maduración de los precursores de los hematíes en la médula ósea; la reducción del tamaño se asocia con condensación aumentada de la cromatina nuclear y expulsión final del núcleo picnótico. A la vez, la síntesis de hemoglobina (Hb) va aumentando (Lothar, 1998).

Las células rojas no nucleadas permanecen en la médula ósea hasta cuatro días pasando por varios estadios de maduración (tipos I a IV). Debido a que la síntesis de Hb no es completa, las coloraciones habituales permiten observar a los reticulocitos como células policromáticas.

### Expresión de resultados:

Los reticulocitos se expresan como porcentaje relativo de hematíes y/o en valor absoluto.

Se han propuesto varias correcciones para la expresión de los resultados.

El índice de reticulocitos corregidos (IRC) se determina cuando el recuento de hematíes es muy alto o cuando el número de células rojas maduras está disminuido, realizando la corrección por hematocrito que se requiera.

$$\text{IRC} = \frac{\% \text{ reticulocitos} \times (\text{Hto paciente} / \text{Hto normal})}{\text{Factor de corrección}}$$

Hematocrito Normal= 45%

Factor = 1.0 si el hematocrito es de 45%

Factor = 1.5 si el hematocrito es de 35%

Factor = 2.0 si el hematocrito es de 25%

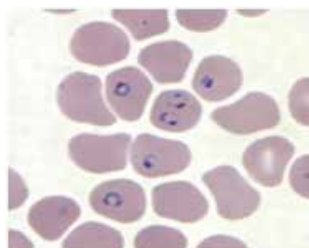
Factor = 3.0 si el hematocrito es de 15%

Se considera un índice regenerativo mayor o igual a 3, (Walters & Abelson, 1996).

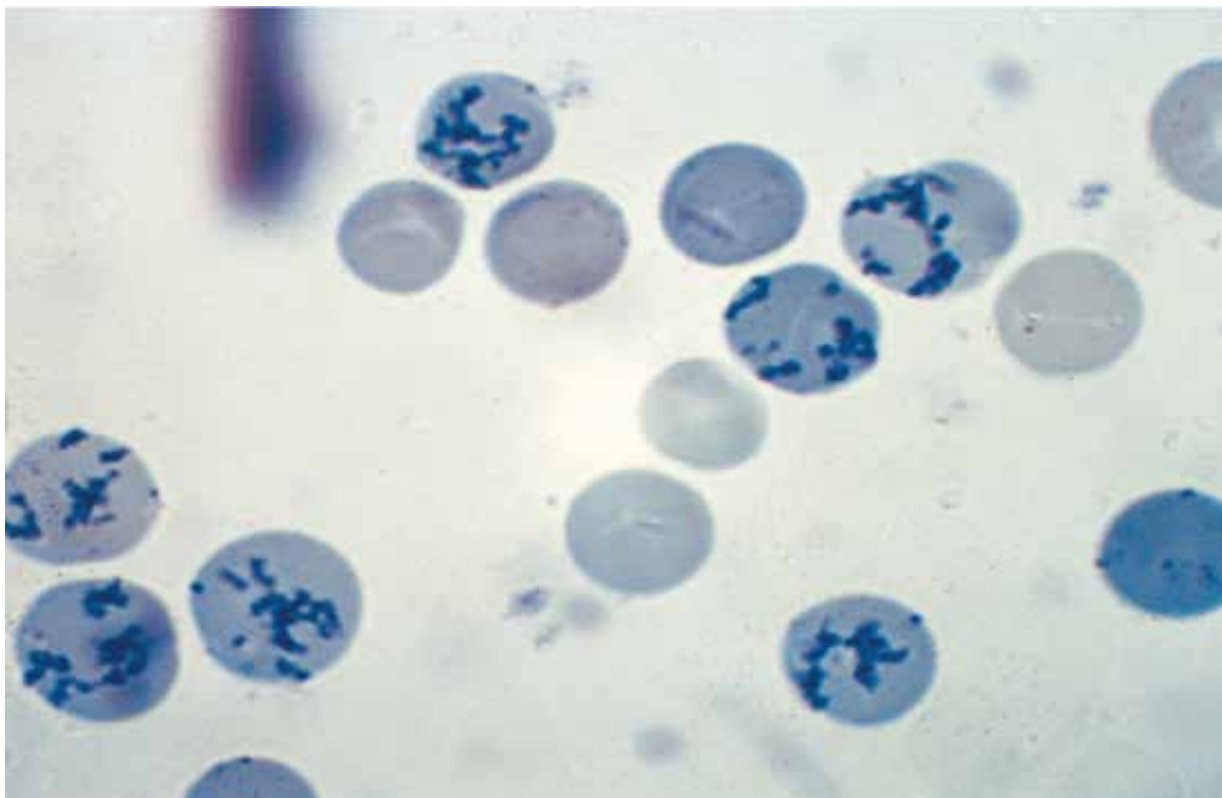
Si el índice es mayor o igual de 3 indica aumento de actividad eritropoyética medular (anemias regenerativa), mientras que un IMR menor a 2 indica una escasa actividad eritropoyética.

### Utilidad clínica:

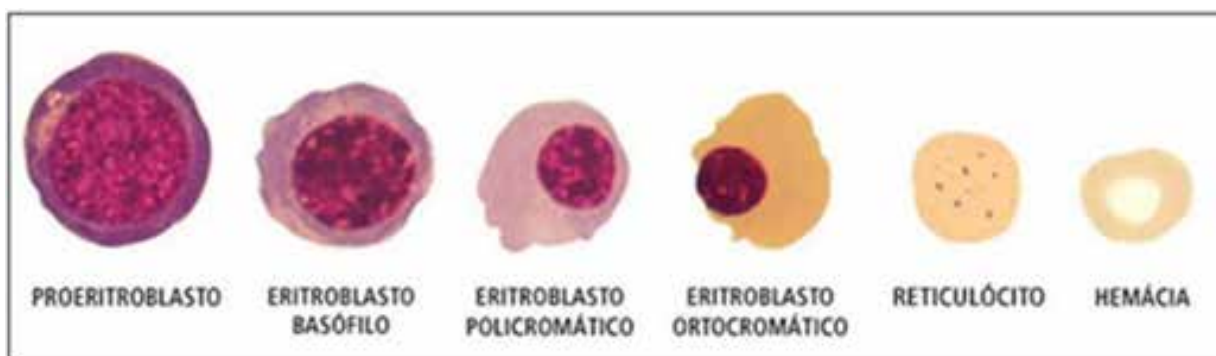
- Evaluación de la función eritropoyética.
- Diagnóstico diferencial de anemias no regenerativas y formas hiperregenerativas.
- Monitoreo de la respuesta a terapias en caso de anemias por deficiencia de Fe, cobre, vitamina B12 y B6.
- Monitoreo de eritropoyesis después de trasplante de médula ósea en el caso de anemia aplásica.
- Evaluación y clasificación de anemias en base al IRC y el recuento de reticulocitos:



5: Reticulocitos al microscopio óptico.

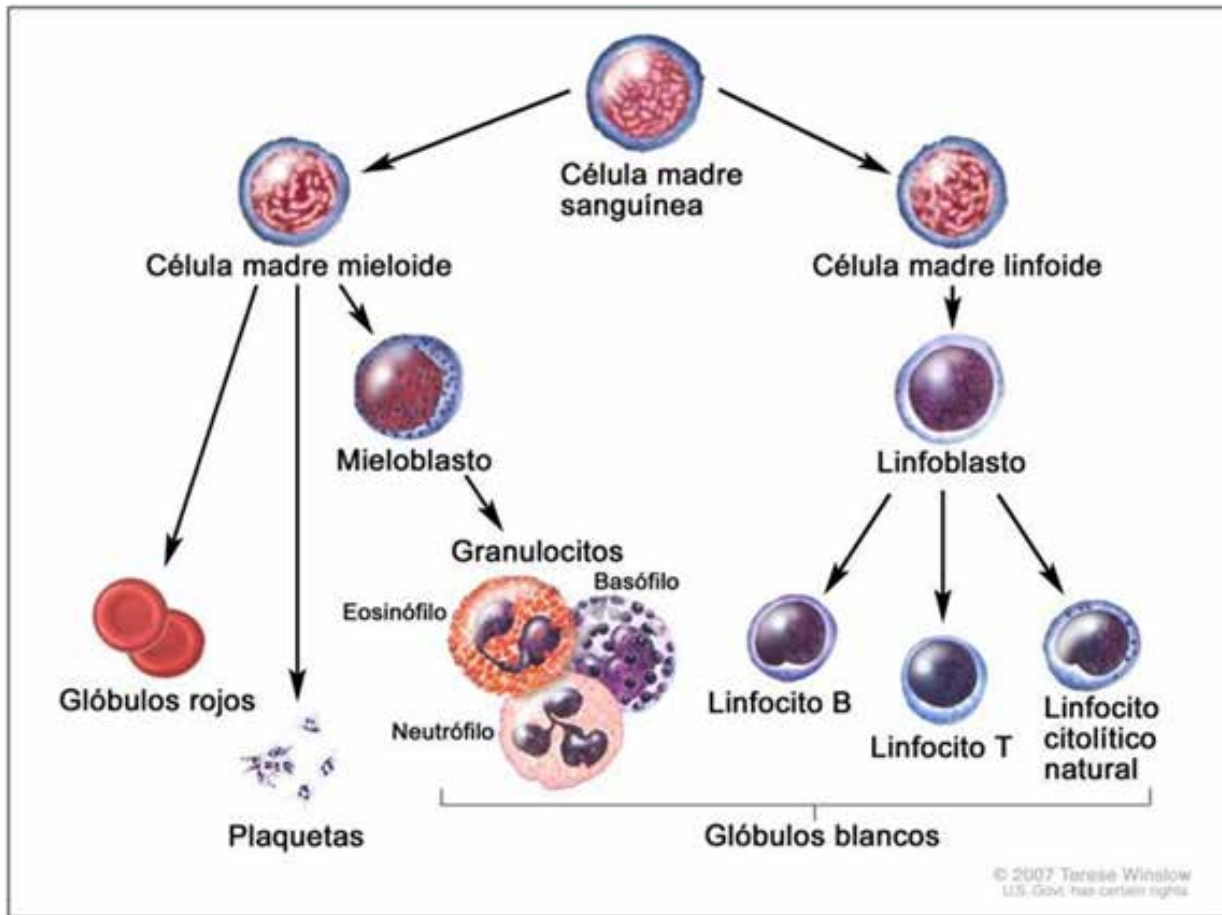


6: Preparación de recuento de reticulocitos. Este nuevo frotis teñido con azul de metileno muestra un gran número de reticulocitos intensamente teñidos (las células que contienen precipitados de RNA se encuentran teñidas de azul oscuro). (Harrison's, 2012)



7: Las etapas de desarrollo morfológico del eritrocito.

El análisis de porcentaje de reticulocitos nos permite medir indirectamente el daño provocado por la ART a las células madres, células pluripotentes en médula ósea. Si se presenta una disminución en la producción de reticulocitos, estudiada en sangre periférica, podemos suponer que tenemos un daño causado a nivel medular.



8: Diferenciación de una célula pluripotente.

## 7 MICRONÚCLEOS:

Durante la división celular, el material genético contenido en el núcleo celular, se replica dando lugar a dos células hijas idénticas; este proceso puede producirse de manera errónea debido a alteraciones durante la replicación y posterior división del ADN, a roturas cromosómicas y al efecto de radiación y de sustancias genotóxicas, produciéndose pérdida cromosómica y haciendo que el reparto del material genético no sea equitativo (Zalacaín, Sierrasesúmaga, & Patiño, 2005). Al ocurrir esto, el material genético que se desprende y, por tanto, queda excluido y no se incorpora correctamente al núcleo de la célula hija, origina un nuevo núcleo de menor tamaño que el primero denominado micronúcleo (MN), visible fácilmente al microscopio óptico, el cual se originan de fragmentos cromosómicos acéntricos o cromosomas enteros que han quedado rezagados en la anafase durante la división nuclear.

En la toxicología genética no se acepta que una sola prueba pueda detectar con exactitud o predecir confiablemente los efectos genotóxicos de una sustancia en el ser humano; por esto es importante tener alternativas para evaluar genotóxicos.

El monitoreo de los contaminantes por análisis directo requiere conocer el agente químico a verificar; además, su evaluación está limitada por la sensibilidad y especificidad del método utilizado. Ante esto, los bioensayos ofrecen considerables ventajas, ya que un organismo puede metabolizar un compuesto cualquiera en otros que pueden ser aún más tóxicos que el original (Griffiths, Suzuki, Millar, Lewontin, & Gelbart, 2002).

Diversos químicos medioambientales e industriales provocan daños en animales que se emplean en la experimentación, y es obvio ese potencial para causar efectos similares en el hombre. Las pruebas para la detección de mutágenos, por lo tanto, son importantes en cuanto que estos compuestos tienen la

capacidad de alterar el material genético en los organismos; además, pueden tener efectos teratogénicos, causar mutaciones en las células germinales y en las células somáticas, inducir enfermedades cardíacas, influir en los procesos de envejecimiento y provocar mutaciones que pueden generar cáncer.

Se dispone actualmente de pruebas con las que se puede determinar un daño genético o detectar compuestos genotóxicos. Estas pruebas pueden ser bioquímicas, in vivo o in vitro, con micro o macroorganismos; pueden asimismo determinar daños microscópicos o moleculares, como cuando se estudian algunos polimorfismos génicos (que, según se sabe, se asocian con el desarrollo de algunos tipos de cáncer), o bien la formación de complejos que se forman cuando un compuesto químico se une a una molécula biológica, como el ADN o ciertas proteínas (Bugarín & Ibarra, 2013).

Conocer estas alternativas es importante, pues cientos de compuestos químicos que no están suficientemente estudiados aparecen en el mercado cada semana, sobre todo en lo que respecta al daño que pueden producir en el material genético de los seres vivos.

La prueba de micronúcleos fue desarrollada por W. Schmid en 1975 (Schmid, 1975), quien originalmente la propuso para practicarse en la médula ósea del ratón; posteriormente, la técnica se ha instrumentado en una gran variedad de tejidos y especies, y en la actualidad se le utiliza ampliamente. Entre las ventajas del ensayo de MN podrían mencionarse que: estas estructuras son fácilmente detectadas mediante observación en microscopio óptico o por fluorescencia en la placa porta objetos con ADN (muestra) teñido.

La presencia de micronúcleos indica pérdida de material genético, ya que son fragmentos de cromosomas o cromosomas completos que quedaron fuera del núcleo durante la mitosis causado por agentes que rompen cromosomas, como las radiaciones (agentes que se denominan clastógenos) o que dañan el huso mitótico, como la Vincristina (aneuploidógeno, agente capaz de producir en la célula que uno o más cromosomas completos de un conjunto normal falten o se presenten más de una vez), y quedan fuera del núcleo durante la mitosis. Los micronúcleos son conocidos en el campo de la hematología como cuerpos de Howell-Jolly y su forma es generalmente redonda o almendrada, con un diámetro que varía desde 0.4 a 1.6 micras. Su formación se basa en que en la etapa de anafase cualquier fragmento cromosómico que no posea centrómero no podrá integrarse a un núcleo por carecer del elemento indispensable para orientarse en el huso acromático. Después de la telofase, los cromosomas normales, así como los fragmentos que posean centrómeros, dan origen a los núcleos de las células hijas; sin embargo, los elementos rezagados –que pueden ser fragmentos o cromosomas completos– quedan incluidos en el citoplasma de las células hijas, y una proporción de ellos se transforma en uno o varios núcleos secundarios. Tales núcleos son mucho más pequeños que el núcleo principal, y de ahí su nombre de “micronúcleos”. Entonces, si el compuesto estudiado es un clastógeno, se formarán micronúcleos pequeños, pero si es un aneuploidógeno, lo que observaremos será la formación de micronúcleos grandes (Rosefort, Fauth, & Zankl, 2004).

La prueba se realiza en diferentes tipos celulares: eritrocitos policromáticos de la médula ósea, cultivos de linfocitos de sangre periférica, eritrocitos jóvenes y maduros de la sangre periférica, queratinocitos, células de la mucosa bucal (Tolbert, Shy, & Allen, 1992), hepatocitos de rata, células germinales y células de descamación de la vagina de la rata, entre otros

Dentro de las ventajas de la técnica de micronúcleos se incluyen la facilidad y rapidez, la posibilidad de probar un sólo químico sin otros compuestos, la abundancia de células analizables en diferentes periodos del ciclo celular y el que los micronúcleos formados durante la división celular persisten al menos durante la siguiente interfase; además, la prueba no deja lugar a dudas sobre el daño producido, pues lo que se observa como micronúcleos es claramente una pérdida de ADN. Por otro lado, la prueba no detecta agentes que no producen pérdidas de material genético o rezagos anafásicos, y tampoco es útil en poblaciones celulares que no se dividan.

El procedimiento para estudiar los micronúcleos en la médula ósea puede realizarse en todos los vertebrados; no obstante, suele ser demasiado traumática, e incluso requiere en ocasiones el sacrificio del organismo bajo estudio ya que es necesario pasar suero fetal o soluciones salinas por los huesos largos obtenidos de rata, ratón, pollo o la especie elegida para tener el material con el que se realizarán los frotis.

Otra manera es emplear cultivos celulares, como es el caso de los linfocitos (Dertinger, Torous, Hanyashi, & MacGregor, 2011), para lo que se requiere trabajar en condiciones estériles y, por lo mismo, es necesario contar con más equipos y reactivos.

Una manera sencilla para realizar la técnica es mediante el estudio de micronúcleos en eritrocitos de sangre periférica, pues una sola gota de sangre es suficiente para realizar los frotis; de esta manera, se pueden contar los micronúcleos hallados en los eritrocitos jóvenes, en los reticulocitos (para el caso de pruebas de 24 a 48 horas) y en normocromáticos en periodos de mayor tiempo o cuando la especie estudiada no muestra eritrocitos policromáticos de manera normal. Es así como los estudios realizados en animales con este ensayo, se basan en un aumento del número de micronúcleos en los eritrocitos policromáticos y normocromáticos de los animales tratados respecto de los animales testigo (Gollapudi & McFadden, 1995).

Los animales en general exhiben una gran variación en las frecuencias de micronúcleos espontáneos en la sangre periférica, que van de sumamente bajas (cercanas a cero) a un buen número; eso depende de la capacidad del sistema reticuloendotelial, principalmente el bazo, que es el encargado de retirar a los micronúcleos de la circulación; por tanto, de la eficiencia de este órgano depende la cantidad de micronúcleos que se puedan observar en la circulación.

De gran importancia se vuelve entonces reconocer especies que presenten micronúcleos espontáneamente, ya que, tal como se mencionó antes, en esas especies el control que ejerce el bazo es menor, y, por consiguiente, cuando estos organismos son expuestos a genotóxicos micronucleogénicos, los micronúcleos se incrementan de manera significativa en sus eritrocitos; es por ello que los organismos con tales características pueden ser bioindicadores naturales.

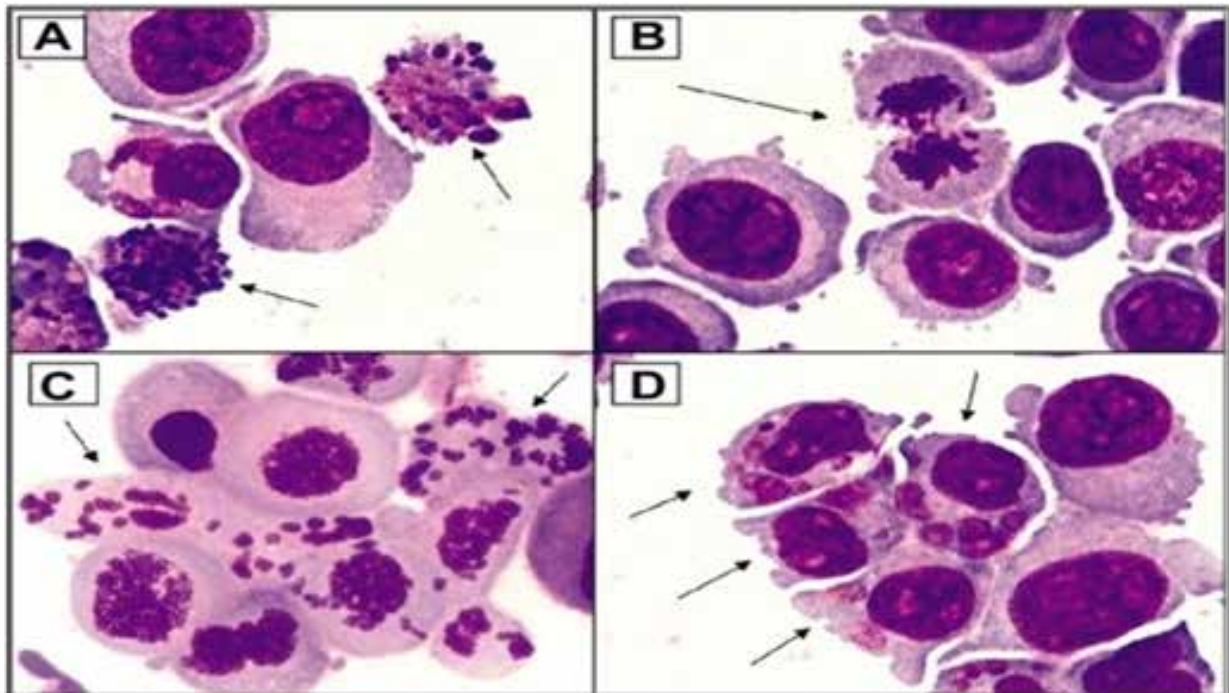
Por otro lado, en el ser humano el número de micronúcleos espontáneos en los eritrocitos de la sangre periférica es cercano a cero en condiciones normales; sin embargo, cuando por alguna indicación del hematólogo a un individuo se le extirpa quirúrgicamente el bazo (esplenectomía), el número de esas estructuras aumenta significativamente (pues el control en nosotros lo ejerce casi totalmente el citado órgano), y el aumento se hace aún mayor si se expone a genotóxicos como las drogas anticancerosas. Por tanto, la esplenectomía puede ser utilizada como una herramienta en especies en las que el bazo es el responsable de eliminar a los micronúcleos de la circulación y se pretende probar genotóxicos con ellos.

El estudio de los micronúcleos de la mucosa bucal también es relativamente simple; tiene la ventaja de que se realiza directamente sin la elaboración de cultivos, y estas células reflejan el efecto genotóxico ocurrido en la capa basal en las últimas tres semanas. Para realizarla, se requiere solamente que la persona se enjuague con agua la cavidad bucal; luego, se realiza un raspado de la parte interna de las mejillas y el material es esparcido sobre un portaobjetos limpio, donde se deja secar para después fijarlo y teñirlo.

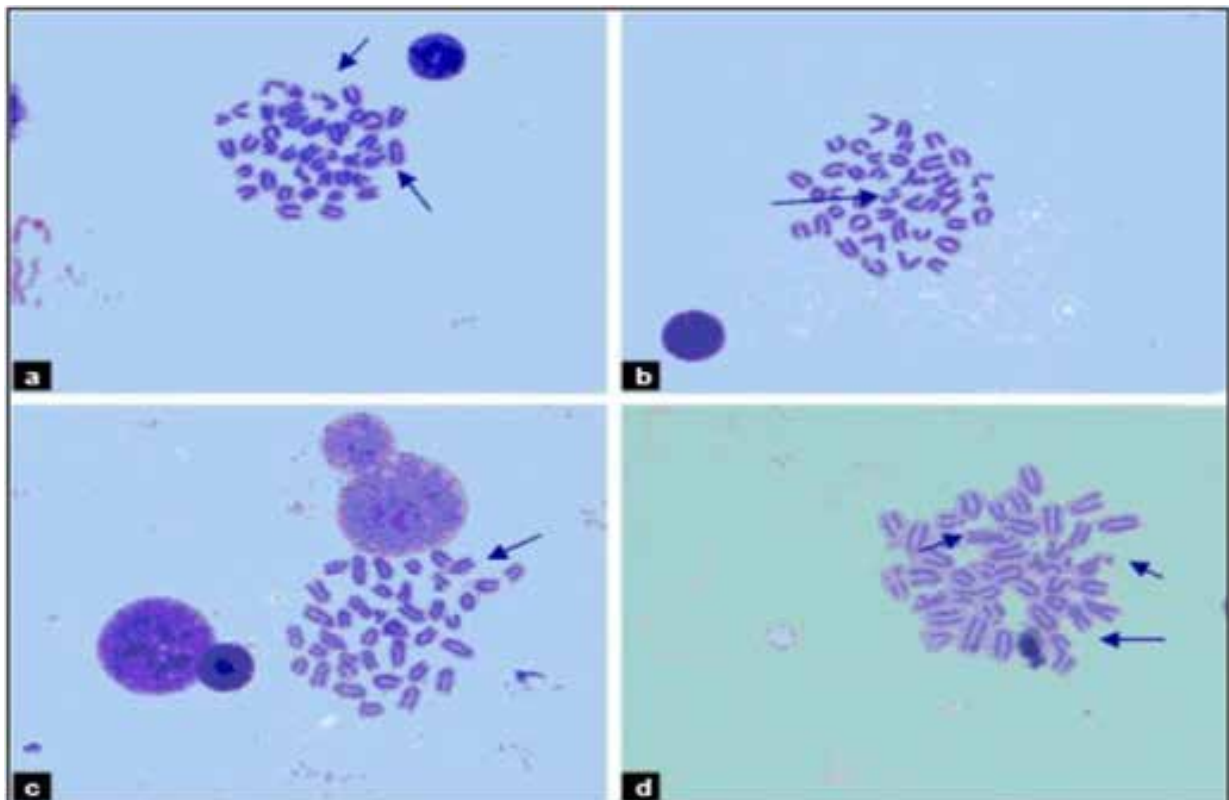
Debido a la ventaja que tiene el emplear bioensayos para detectar genotóxicos, diversos grupos de investigadores se han dado a la tarea de buscar organismos que puedan ser utilizados como indicadores de daño en el ADN (Zúñiga, y otros, 2002). Para el caso particular de los micronúcleos, esos organismos deberán responder formando micronúcleos en número suficiente como para que, al exponerlos al probable agente genotóxico, se observe un aumento significativo. Ello permite detectar genotóxicos micronucleogénicos mediante el estudio comparativo de los eritrocitos micronucleados de la sangre periférica de dichas especies.

De esta manera, además de las especies de laboratorio –rata, ratón, hámster y algunos primates–, se han propuesto otros vertebrados no mamíferos, como ciertos anfibios, aves y peces, e incluso plantas en tejidos como las células formadoras del polen y los meristemas apicales de la raíz o el tallo.

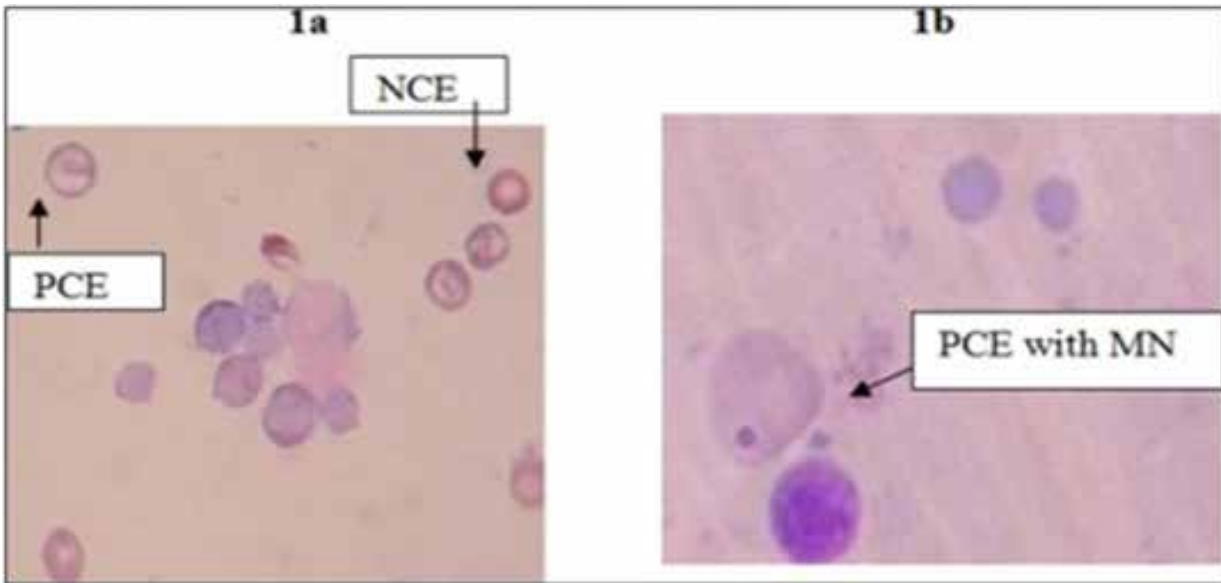
Con el afán de hacer más sensible la prueba de micronúcleos, algunos investigadores han utilizado sustancias mitogénicas como la eritropoyetina, que es un factor de crecimiento, multiplicación y diferenciación de los eritroblastos, la cual se utiliza para inducir eritropoyesis.



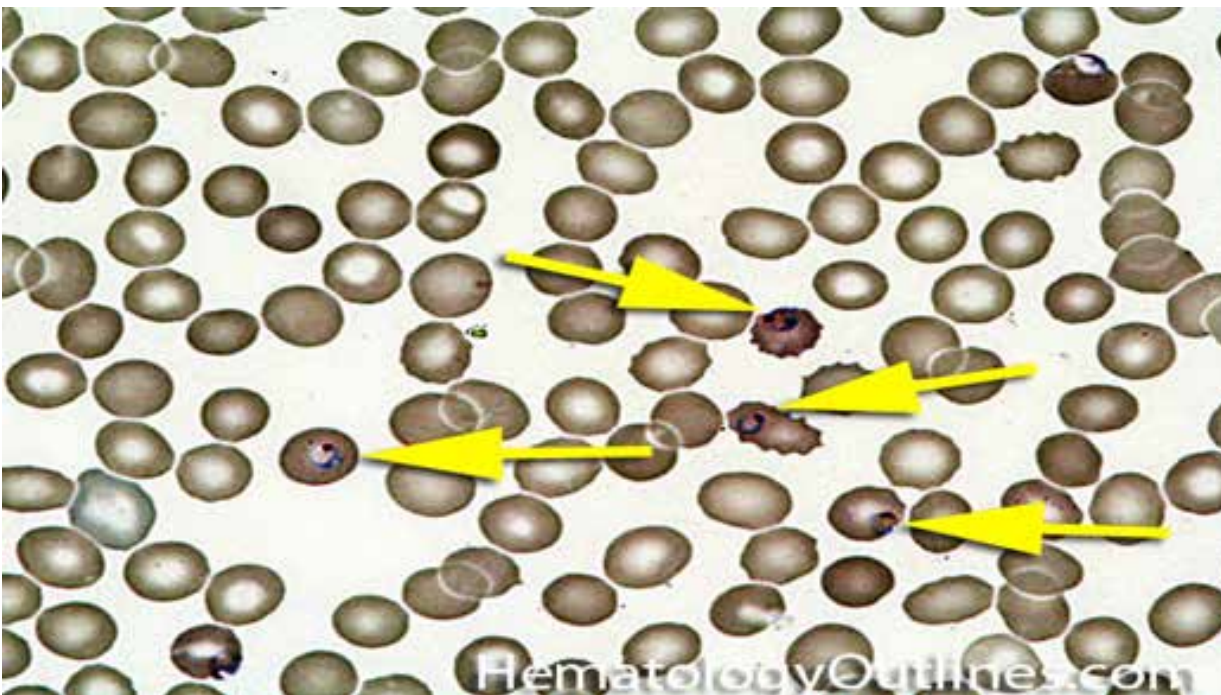
9: Ejemplos de alteraciones celulares que acompañan a la apoptosis (A), la perturbación mitótico durante la anafase (B), la catástrofe mitótica con la interrupción completa del cromosoma / husillo (C), y la formación de micronúcleos asociada con aneuploidia, (Harrison's, 2012).



10: Eritrocitos Policromáticos con micronúcleos inducidos por Ciclofosfamida, las flechas indican eritrocitos policromáticos con micronúcleos (a y b), Eritrocitos normocromáticos con micronúcleos (c) y Eritrocitos normocromáticos (d), (Harrison's, 2012).



11: 1a: PCE (Eritrocito policromatico) y Eritrocito Normocromatico (NCE). 1b: PCE con presencia de micronúcleos



12: Glóbulo rojo infectado con Plasmodium Falciparum, (Rashidi & Nguyen).

## 8 LIPOSOMAS:

Los liposomas fueron descubiertos por el hematólogo británico Alec Bangham en 1964, en el Instituto Babraham, en Cambridge. Fueron descubiertos cuando Bangham estaba probando un nuevo microscopio electrónico del Instituto mediante la adición de tinción negativa de los fosfolípidos en seco (Bangham & Horne, 1964). El parecido con la membrana plasmática era evidente, y los cuadros del microscopio fueron la primera evidencia real de que la membrana celular es una estructura de bicapa lipídica.

El conjunto formado por los fármacos y los vehículos que los transportan es lo que la Fundación Europea de la Ciencia (European Science Fundation, ESF) define como nanomedicinas. El prefijo nano

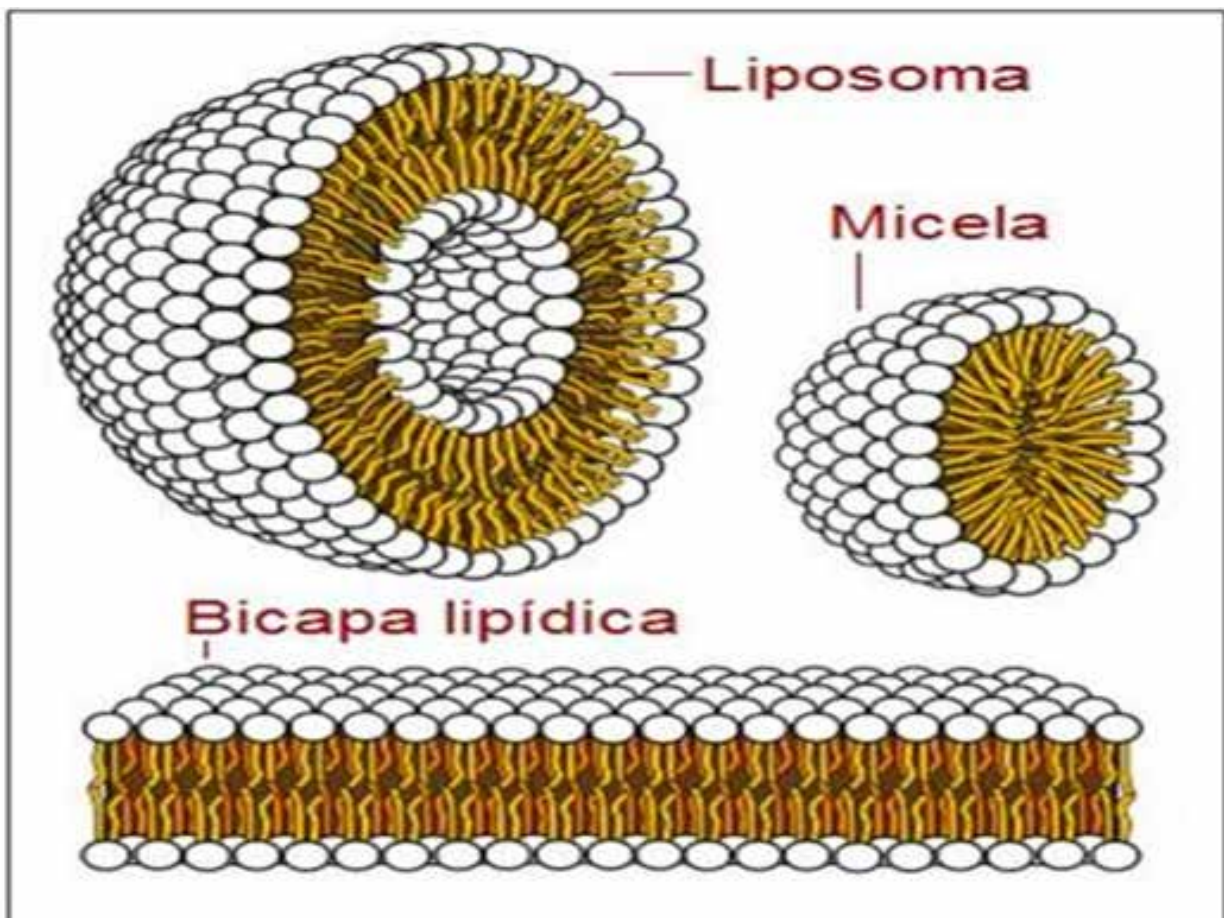
hace referencia a sistemas de tamaño nanométrico que funcionan como vehículos de transporte de los fármacos, que de otra manera tendrían dificultad para atravesar las diferentes barreras biológicas del organismo. Además, estos vehículos pueden ser diseñados incluso para que lleguen específicamente a un solo órgano, a determinadas células dentro del mismo o a una zona concreta de un tipo celular en particular.

Estos nuevos sistemas de administración actúan como reservorios del fármaco, lo que permite prolongar su tiempo de residencia en el lugar de administración, controlar su liberación en el tiempo y, en consecuencia, reducir la toxicidad y el número de administraciones requeridas (Lasic, 1993).

Se utilizan para la administración de varios fármacos debido a sus propiedades únicas y su capacidad de encapsulación (Foldvari, Gesztes, & Mezei, 1990). Un liposoma encapsula una porción de la solución acuosa en el interior de una membrana hidrófoba; solutos hidrofílicos disueltos no pueden pasar fácilmente a través de los lípidos. Pero los Liposomas difunden rápidamente a través de las membranas biológicas, trasportando la droga de interés.

Productos químicos hidrófobos se pueden disolver en la membrana, y de esta forma los liposomas pueden llevar a ambas moléculas, hidrófobas y moléculas hidrófilas. Para llegar a los sitios de acción, la bicapa lipídica puede fusionarse con otras bicapas, tales como la membrana celular, entregando así el contenido del liposoma. Por ejemplo al hacer liposomas en una solución de ADN o drogas (que normalmente sería incapaz de difundirse a través de la membrana) pueden ser entregados más allá de la bicapa lipídica.

Un liposoma es una pequeña vesícula hecha con el mismo material que compone la membrana celular. Las membranas se hacen generalmente de fosfolípidos, que son moléculas que tienen un grupo polar de cabeza y un grupo hidrófóbico de cola. La cabeza se siente atraída por el agua, y la cola, que está formada de una larga cadena hidrocarbonada, es rechazado por el agua.



13: Diagrama de un Liposoma con la orientación de los fosfolípido, (Nelson & Cox, 2005).



En la naturaleza, los fosfolípidos se encuentran en las membranas formando una bicapa. Cuando los fosfolípidos de membrana se rompen, se pueden ensamblar en pequeñas esferas, más pequeñas que una célula normal, ya sea como bicapas o monocapas. Las estructuras de doble capa son los liposomas. Las estructuras monocapa se llaman micelas.

Los lípidos en la membrana plasmática son principalmente fosfolípidos como fosfatidiletanolamina y la fosfatidilcolina. Los fosfolípidos son anfifílicos. Como la membrana plasmática se enfrenta a las soluciones acuosas a ambos lados, sus fosfolípidos forman una bicapa de fosfolípidos con las colas hidrofóbicas hacia adentro, enfrentando las colas.

Los liposomas pueden estar compuestos de fosfolípidos de origen natural con mezcla de cadenas de lípidos (fosfatidiletanolamina) o de componentes surfactantes puros como DOPE (dioleoylphosphatidylethanolamine). Los liposomas, por lo general, pero no por definición, contiene un núcleo de solución acuosa, las esferas de lípidos que no contienen ningún material acuoso se denominan micelas, sin embargo, micelas inversas se pueden hacer para abarcar un entorno acuoso.

Sus propiedades difieren de su composición lipídica, por ejemplo, las especies de fosfatidilcolina insaturada a partir de fuentes naturales (fosfatidilcolina de huevo o soja) dan mucho más permeabilidad y bicapas menos estables, mientras que los fosfolípidos saturados con cadenas de ácidos largos (por ejemplo Dipalmitoilfosfatidilcolina, usado en la industria como surfactante, tensioactivo) forman una estructura de bicapa impermeable y rígida.

Liposoma, el nombre deriva de dos palabras griegas: lipos = grasa y Soma=cuerpo. Un liposoma se pueden formar en varios tamaños como uni-laminar o construcción multi-laminar. Su nombre se relaciona con sus bloques de construcción estructural, los fosfolípidos, y no en relación a su tamaño. En contraste, el término nanosomas se refiere a tamaño y fue adoptado en la década de los 90 para referirse a liposomas especialmente en el rango nanométrico; liposomas y nanosomas no son sinónimos.

Un liposoma no necesariamente tiene un contenido lipofóbico, como el agua, aunque normalmente lo hace.

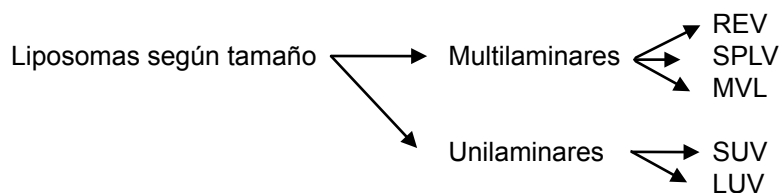
El uso de liposomas para la transformación o transfección de ADN en una célula huésped se conoce como lipofección (Romero, Morilla, & Bakas, 2001). Además de vehículos de genes y de fármacos, los liposomas pueden utilizarse como vehículos para la entrega de colorantes para textiles, pesticidas, enzimas y suplementos nutricionales y cosméticos.

El uso de liposomas en cosmetología también tiene muchos beneficios, incluyendo la mejora de la penetración y difusión de los ingredientes activos, transporte selectivo de ingredientes activos, tiempo de liberación más largo, mayor estabilidad de activo, la reducción de efectos secundarios no deseados, y alta biocompatibilidad. (Foldvari, Gesztes, & Mezei, 1990).

## 8.1 CLASIFICACIÓN:

Los liposomas pueden transportar moléculas de drogas de diferentes formas: Unidas a su membrana, intercaladas en la bicapa, disueltas en su bicapa, encapsuladas en su interior. Las drogas hidrofóbicas son transportadas en la bicapa lipídica á polar y las drogas hidrosolubles son transportadas unidas a la superficie del liposoma o en su interior. Existen cuatro tipos de Liposomas: Convencional, Sigilosos, Dirigido y Catiónico.

Los liposomas se clasifican según su tamaño, número de bicapas y la forma de obtenerlos. De acuerdo a sus características estructurales como número de bicapas y tamaño se pueden clasificar en 2 tipos: Multilaminares (MLV) que tienen tamaños entre 0.1–10  $\mu\text{m}$ , estos a su vez se dividen en: REV (Vesículas obtenidas por Evaporación en Fase Reversa), SPLV (Vesículas Plurilamelares Estables) y MVL (Liposomas Micromultivesiculares). El segundo tipo de liposomas son los Unilamelares, los cuales según su diámetro se dividen en: Vesículas Unilamelares de diámetro pequeño (SUV) y Vesículas Unilamelares de diámetro grande (LUV), (Torelló, Viscasillas, & Del Pozo, 2002).



**Liposomas Multilaminares:** Se caracterizan porque poseen múltiples compartimentos acuosos concéntricos, separados entre sí por un espacio acuoso de aproximadamente 5 nm de grosor.

**Liposomas Unilaminares:** Poseen un compartimento central polar y una sola bicapa lipídica.

**Vesículas Unilaminares de diámetro pequeño (SUV):** Su tamaño es menor que 100 nm. Suelen obtenerse por tratamiento de una suspensión de MLV con ultrasonidos. Una elevada proporción de fosfolípidos se encuentra en la capa externa. Dado que el porcentaje de encapsulación es bajo, no se recomienda para moléculas hidrosolubles puesto que el porcentaje de encapsulación es bajo.

**Vesículas Unilaminares de diámetro grande (LUV):** El tamaño de estos liposomas varía entre 100–500 nm. Presentan una elevada capacidad de encapsulación.

El elevado volumen del compartimento interno permite la encapsulación de moléculas hidrosolubles con eficacia.

La importancia de estos liposomas es que son capaces de transportar una cantidad elevada de agua y por lo tanto, de principio activo hidrofílico, por lo que son el tipo preferido como vehículo de fármacos. (Ball E. , 1995)

La elección correcta del método de preparación de liposomas depende de los siguientes parámetros: las características fisicoquímicas del material a ser atrapados , la naturaleza del medio en el que se dispersan las vesículas lipídicas, la concentración efectiva de la sustancia atrapada y su potencial toxicidad, tamaño óptimo, polidispersidad y la vida útil de las vesículas para la aplicación prevista y reproducibilidad de lote a lote y la posibilidad de producción a gran escala de productos liposomales seguros y eficientes.

Cabe señalar que la formación de liposomas y nanoliposomas no es un proceso espontáneo. Las vesículas lipídicas se forman cuando fosfolípidos tales como lecitina se colocan en agua y se les suministra suficiente energía para formar una bicapa o una serie de bicapas, cada uno separada por moléculas de agua.

Número de bicapas		Diámetro	Propiedades
Unilaminares (liposomas formados por una única bicapa)	SUV (vesículas unilaminares de pequeñas dimensiones)	20-80 nm	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Debido a su elevado radio de curvatura, una elevada proporción de fosfolípidos se halla en la monocapa externa</li> <li>- Presentan una importante relación superficie/lípido</li> <li>- Dado que el porcentaje de encapsulación es bajo, no se recomienda para moléculas hidrosolubles</li> </ul>
	LUV (vesículas unilaminares de grandes dimensiones)	80 nm-1 µm	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Presentan una elevada capacidad de encapsulación</li> <li>- El elevado volumen del compartimento interno permite la encapsulación de moléculas hidrosolubles con eficacia</li> </ul>
Plurilaminares (liposomas formados por varias bicapas)	MLV (vesículas multilaminares)	400 nm- varios µm	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Existen variantes de MLV, tales como:                             <ul style="list-style-type: none"> <li>• REV (Reverse-phase Evaporation Vesicles)</li> <li>• SPLV (Stable Plurilamear Vesicles)</li> <li>• MVL µmultivesicular Liposomes)</li> </ul> </li> </ul>

14: Clasificación de los liposomas según su cantidad de bicapas lipídicas, (Torello, Viscasillas, & Pozo, 2002).

## 8.2 TÉCNICAS DE FABRICACIÓN:

Existen diversas formas de elaborar liposomas. Todos los métodos tienen en común el fundamento que a partir de una suspensión de fosfolípidos en un medio hidrofóbico, se elimina o se sustituye lentamente este disolvente por otro que sea hidrofílico, por lo general una solución acuosa, mediante procesos de dilución, evaporación o diálisis. Este cambio de disolvente provoca que los fosfolípidos se agrupen espontáneamente entre ellos, y de esta manera forman bicapas esféricas y atrapan en el interior gran cantidad del medio acuoso en el que se encuentran. Al trabajar con fármacos o productos cosméticos hidrofílicos, estos quedan atrapados en el interior de la bicapa; y los hidrofóbicos quedan en la capa de fosfolípidos (Ball E. , 1995)

Se deben tomar en cuenta varios aspectos a la hora de seleccionar los componentes y el método de preparación para poder obtener liposomas con las características deseadas:

Cuanto más elevada es la concentración de los lípidos, una mayor proporción de la fase acuosa puede ser atrapada. La vida media de un liposoma se incrementa cuando aumenta la dosis de lípido. El índice de encapsulación aumenta al realizar la hidratación más lentamente.

La adición de fosfolípidos cargados incrementa la distancia entre las membranas lipídicas (Hofland, Bouwstra, Panec, Boddé, & otros, 1991).

El método de fabricación deberá elegirse, teniendo en cuenta sobre todo la composición, el tipo de vesícula y la naturaleza del principio activo que se pretende incluir en el sistema. (Clares, Sistemas de

Transporte y Liberación de Fármacos de Aplicación Tópica: Liposomas multilamlares portadores de Acetonido de Triamcinolona, 2003).

A continuación se explicarán algunas técnicas que son utilizadas para obtener liposomas MLV, SUV y LUV.

La obtención de liposomas del tipo MLV se puede llevar a cabo por el proceso de hidratación, que consiste en la agitación de una capa lipídica, formada previamente por evaporación de una solución de lípidos en un solvente orgánico. Este procedimiento se debe realizar por encima de la temperatura de transición de fase de los lípidos. Este método tiene la desventaja de que se obtienen vesículas heterogéneas en cuanto a tamaño y lamellaridad, pero con la tecnología y procedimientos más complejos se pueden obtener vesículas homogéneas.

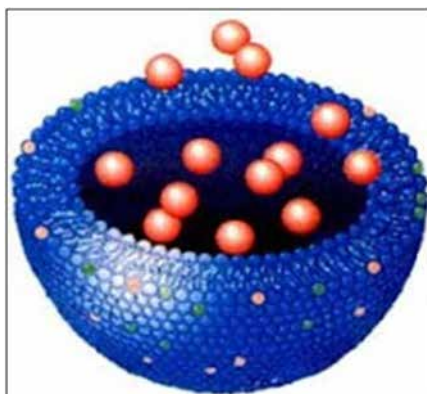
Otro procedimiento muy rápido para la preparación de liposomas consiste en la disolución de una mezcla lipídica en etanol o éter, la cual se inyecta rápidamente en una solución amortiguadora, donde se van a formar espontáneamente las vesículas, principalmente SUV. Posteriormente, se lleva a cabo una ultrafiltración y se eliminan los restos de etanol o éter, según sea el caso.

Una técnica ampliamente utilizada para la obtención de liposomas Unilamlares (SUV) es la eliminación del detergente, consiste en la dispersión de los fosfolípidos en agua por formación de micelas mixtas con la ayuda de agentes tensioactivos. La eliminación del detergente se realiza, posteriormente, por centrifugación, diálisis o filtración. Mediante esta técnica se obtienen poblaciones homogéneas con tamaños comprendidos entre 20 y 100 nm. Sin embargo, presenta la desventaja de la persistencia del tensioactivo en la preparación, y genera problemas en las propiedades físicas de los liposomas.

Para la obtención de liposomas LUV, se utiliza la técnica Infusión en éter, en la cual se debe inyectar una solución etérea de un fosfolípido en otra solución acuosa del agente activo a la temperatura de 55-66°C o, a 30°C a baja presión. Luego se elimina el disolvente por evaporación, y así finalmente, se obtiene una cantidad heterogénea de LUV (0,05 a 0,25  $\mu\text{m}$ ), por ello se recurre generalmente a la filtración para conseguir vesículas uniformes (Clares, Sistemas de Transporte y Liberación de Fármacos de Aplicación Tópica: Liposomas multilamlares portadores de Acetonido de Triamcinolona, 2003).

El método de evaporación inversión de fase (REV), basado en la rápida inyección de una solución acuosa en una fase orgánica que contiene los lípidos, rinde vesículas en la suspensión acuosa con 0.1 a 1.0  $\mu\text{m}$  de diámetro y una capacidad de encapsular hasta un 50%. Los pasos fundamentales de este método son: la sonicación, que resulta en una emulsión "agua-en-aceite", seguida por un secado parcial a un gel semisólido que es finalmente, convertido en una suspensión concentrada de vesículas mediante agitación vigorosa (Lanoia, M.C.Luzardo, Labordea, & otros, 2009) La fase orgánica o la emulsión se vierte sobre una fase acuosa con tensioactivo y tras agitación continua que permite la evaporación del disolvente se obtienen las micropartículas.

Los pasos fundamentales de este método son: la sonicación, que resulta en una emulsión "agua-en-aceite", seguida por un secado parcial a un gel semisólido que es finalmente, convertido en una suspensión concentrada de vesículas mediante agitación vigorosa (Lanoia, M.C.Luzardo, Labordea, & otros, 2009).



15: Encapsulación de drogas en liposomas (Nelson & Cox, 2005).

## 9 POLIETILENGLICOL 400

### 9.1 DESCRIPCIÓN:

Los polietilenglicoles son polímeros de condensación de óxido de etileno y agua.

Cada polietilenglicol va seguido de un número que indica su peso molecular promedio aproximado. En la denominación INCI (International Nomenclature of Cosmetic Ingredients), el número indica el número de unidades de óxido de etileno promedio. (O'Neil & Heckelman, 2013).

### 9.2 DATOS FÍSICO-QUÍMICOS

Sinónimos: Macrogol 400. Polioxietilenglicol 400. PEG 400.

INCI: PEG-8.

Líquido límpido, transparente, viscoso, prácticamente incoloro e inodoro.

Densidad: 1,128 g/ml (25°C).

Índice de refracción: 1,4635 – 1,4665.

Fórmula empírica:  $\text{CH}_2\text{OH}(\text{CH}_2\text{OCH}_2)_n\text{CH}_2\text{OH}$ ,  $n \approx 8$

Peso molecular: Aprox. 400

### 9.3 POLIETILENGLICOL 4000:

Sinónimos: Macrogol 4000. Polioxietilenglicol 4000. PEG 4000.

INCI: PEG-80.

Sólido blanco o casi blanco, de aspecto céreo o parafínico. Muy soluble en agua y en cloruro de metileno, prácticamente insoluble en etanol al 96%, en aceites grasos y en aceites minerales. Punto de fusión: 54 – 58 °C.

Fórmula empírica:  $\text{CH}_2\text{OH}(\text{CH}_2\text{OCH}_2)_n\text{CH}_2\text{OH}$ ,  $n \approx 69-93$

Peso molecular: Aprox. 4000

### 9.4 POLIETILENGLICOL 6000:

Sinónimos: Macrogol 6000. Polioxietilenglicol 6000. PEG 6000.

INCI: PEG-150.

Sólido blanco o casi blanco, de aspecto céreo o parafínico. Muy soluble en agua y en cloruro de metileno, prácticamente insoluble en etanol al 96%, en aceites grasos y aceites esenciales. Punto de fusión: 56 – 63 °C.

Fórmula empírica:  $\text{CH}_2\text{OH}(\text{CH}_2\text{OCH}_2)_n\text{CH}_2\text{OH}$ ,  $n \approx 152$

Peso molecular: Aprox. 6000

### Propiedades y usos:

Los macrogles son ampliamente empleados en una gran variedad de preparaciones farmacéuticas tópicas, orales, rectales, oftálmicas, y parenterales.

Son sustancias estables, hidrofílicas, e inocuas para la piel. Prácticamente no penetran en la piel, pero al ser solubles en agua se eliminan fácilmente por simple lavado, de aquí su uso como excipiente en algunas pomadas.

Los sólidos como el PEG 4000 y el PEG 6000 se usan en preparaciones tópicas, ajustando la consistencia con los líquidos como el PEG 400.

Las mezclas también se usan para supositorios y óvulos, presentando una serie de ventajas frente a las grasas: puntos de fusión altos y liberación del principio activo independiente de éstos, adecuados

en climas cálidos, mayor estabilidad en el almacenaje, y fácilmente miscibles con los fluidos rectales y vaginales. Como desventajas tenemos que son más reactivos, requieren mayor atención durante la elaboración, la liberación de principios activos hidrosolubles disminuye con PEGs de peso molecular elevado, y son más irritantes para las mucosas.

Las soluciones acuosas de PEGs sirven como agentes suspensores aumentando la solubilidad en agua de principios activos poco solubles, o para ajustar la consistencia o viscosidad de otros vehículos suspendidos. Junto con emulsificantes, ayudan a estabilizar las emulsiones.

Los PEGs líquidos se usan como disolventes hidrosolubles para el contenido de las cápsulas de gelatina blanda, aunque pueden endurecer la cápsula por una absorción preferencial de humedad en la gelatina.

Pueden formar parte del recubrimiento de comprimidos, aunque puede verse incrementada su permeabilidad al agua y reducir la protección frente a pH ácidos. También se usan como agentes plastificantes de productos microencapsulados, evitando la ruptura del recubrimiento cuando las microcápsulas se comprimen, y en la preparación de hidrogeles de uretano utilizados como agentes de liberación controlada (Rowe, Sheskey, & Quinn, 2009).

Efectos secundarios: Pueden causar prurito tras la aplicación tópica, especialmente sobre las membranas mucosas, así como reacciones de hipersensibilidad como urticaria y alergias tardías. Las reacciones más graves son hiperosmolaridad, acidosis metabólica, y fallo renal en pacientes quemados. El uso oral en grandes cantidades tiene efecto laxante.

Precauciones: Utilizar con precaución sobre quemaduras extensas, heridas abiertas, o en pacientes con fallo renal.

Interacciones: La actividad de bacitracinas y de bencilpenicilinas se ven disminuidas en una base de propilenglicol.

Incompatibilidades: Algunos colorantes, yodo y yoduros, bismuto, mercurio, plata, penicilina, bacitracina, parabenos, compuestos de amonio cuaternario, fenol ácido tánico, ácido salicílico, sulfonamidas, antralina, sorbitol, y algunos plásticos (polietileno, fenolformaldehído, PVC, ésteres de celulosa).

Conservación: En envases bien cerrados y protegidos de la luz.

## 9.5 EJEMPLOS DE FORMULACIONES:

A continuación se detallan algunos ejemplos de formulaciones con PEG400, (Ruiz, Valero, & Vidal, 1995).

Excipiente para crema vaginal  
Polietilenglicol 4000..... 35 %  
Polietilenglicol 400..... 65 %

Modus operandi:

Fundir los PEGs a baño María a 50 °C y dejar enfriar. Humectar los principios activos con un poco de PEG 400 y añadir la crema poco a poco homogeneizando bien.

Solución de prednisona  
Prednisona..... 1 %  
Polietilenglicol 400 c.s.p..... 30 ml

Solución de Clotrimazol  
Clotrimazol..... 2 %  
Polietilenglicol 400 c.s.p..... 30 ml

Solución de Aciclovir	
Aciclovir.....	2 %
Polietilenglicol 400 c.s.p.....	30 ml

Modus operandi:

Pulverizar el sólido, humectarlo con un poco de PEG 400 hasta formar una pasta, y acabar de incorporarlo todo. En algunos casos puede ser necesario calentar un poco a baño María para ayudar a disolverlo (por ejemplo Clotrimazol).

Óvulos de PEG

Polietilenglicol 6000.....	40%
Polietilenglicol 400.....	60%
Polietilenglicol 4000.....	10%
Monoestearato PEG-400.....	90%

Modus operandi:

Fundir a baño María a 50 °C junto con los principios activos, y rellenar los moldes previamente lubricados con glicerina. Dejar enfriar y desmoldar.

Otros:

Alcon lagrimas  
Sertal compuesto IV  
Omeprazol IV  
Ibupirac capsulas blandas

## 10 TÉCNICAS DE OBTENCIÓN DE MUESTRAS E INOCULACIÓN DE DROGAS

Todas las prácticas realizadas en el laboratorio durante esta investigación están basadas en la disposición 6677/2010 de la ANMAT.

Apruébese el Régimen de Buena Práctica Clínica para Estudios de Farmacología Clínica. Derogase Disposiciones A.N.M.A.T.

También se consulto la página oficial de American Association for Laboratory Animal Science, donde tratan el manejo de animales para trabajos de investigación. (Science, American Association for Laboratory Animal, 2014).

### 10.1 EXTRACCIÓN SENO RETRO-ORBITAL

Para la obtención de muestras de sangre periférica se utilizo la técnica de extracción en el seno retro-orbital en ratones (Karl-Heinz, y otros, 2001).

Anestesia: Puede ser utilizada o no. En este trabajo no se utilizó anestesia para la técnica utilizada.

Material: Guantes descartable, Capilares y tubos Eppendorf tratados con anticoagulante como EDTA o heparina, gradilla. En este caso, fueron heparinizados.

Restricciones: Esta técnica debe ser llevada a cabo únicamente cuando no exista método alternativo y siempre por personal calificado debido al elevado riesgo de dañar estructuras adyacentes al globo ocular, lo que puede originar infecciones severas y ceguera.

Volumen de extracción:

- Máximo un 10% de vol. sanguíneo total (55-70 ml/kg).
- Períodos cortos
- Extracción a blanco, si se realiza más del 50 % del volumen total, se realiza eutanasia posterior.

Sujetar al ratón estirando la piel del cuello hacia atrás asegurándose de no dificultar la respiración.

Insertar el capilar en el ángulo externo del ojo (2 mm aproximadamente) y girar suavemente hasta que la sangre fluya por el mismo.

Recoger la muestra y retirar el capilar.

Oprimir ligeramente la zona de punción con una gasa o papel para detener la hemorragia.

Observar al animal días posteriores para detectar severas complicaciones.

## 10.2 TÉCNICA DE ADMINISTRACIÓN DE LAS MUESTRAS:

Inoculación Intraperitoneal: No requiere el uso de anestesia. Se utilizan agujas 27-25G (ratón) 25-23G (rata). Se administra un volumen aproximado de 2-3ml.

Con el ratón correctamente inmovilizado (evitando cualquier movimiento durante el procedimiento) inclinarlo y trazar una línea imaginaria que cruce su abdomen transversalmente justo sobre sus rodillas.

La aguja deberá ser insertada sobre esta línea, en el lado derecho del animal y lo más cercano posible a la línea que divide longitudinalmente el abdomen. De esta manera disminuimos el riesgo de inyectar en ciego o vejiga urinaria.

La aguja debe alcanzar una profundidad de aproximadamente de 0.5cm y debe insertarse con una inclinación de unos 30° con respecto a la superficie del abdomen.

Aspirar para asegurarse de que no se ha alcanzado ningún vaso sanguíneo, ciego o vejiga urinaria. Si ningún fluido es aspirado, proceder a la inyección de la muestra.

Retirar la aguja y presionar ligeramente la zona de inyección (Mortom, y otros, 2001).



16: Introducción del capilar al seno retro-ocular.





17: Técnica de administración intraperitoneal

## 11 MATERIALES Y METODOS:

### 11.1 MATERIALES:

#### Artemisinina:

Se utilizó Artemisinina en frasco ampolla liofilizada, la misma se reconstituyó en solución de PEG400. La pureza de la ART se evaluó por Espectrometría de Masa (Micromass ZQ, Simple Quadropole con ionización por Electrospray en modo positivo) y por RMN en un espectrómetro Bruker Advance III, 500 MHZ. La ART fue cedida gentilmente por la Artemisinin Development Co. Ltd., Abuja, Nigeria.

Los estudios toxicológicos In Silico de ART se realizaron con los software de Lazar – Osiris, (Organic chemistry portal).

Dosis Artemisinina: Se utilizó la dosis equivalente a una dosis inicial en pacientes humanos, 50mg/70kg.

Equivalencias:

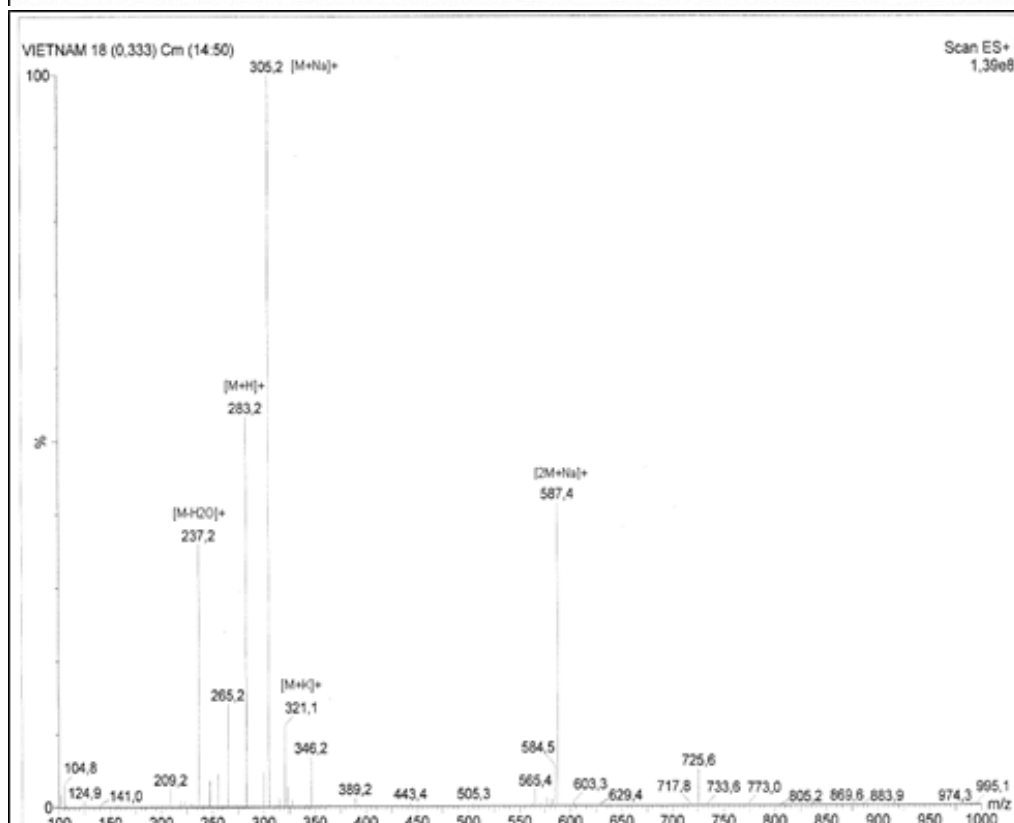
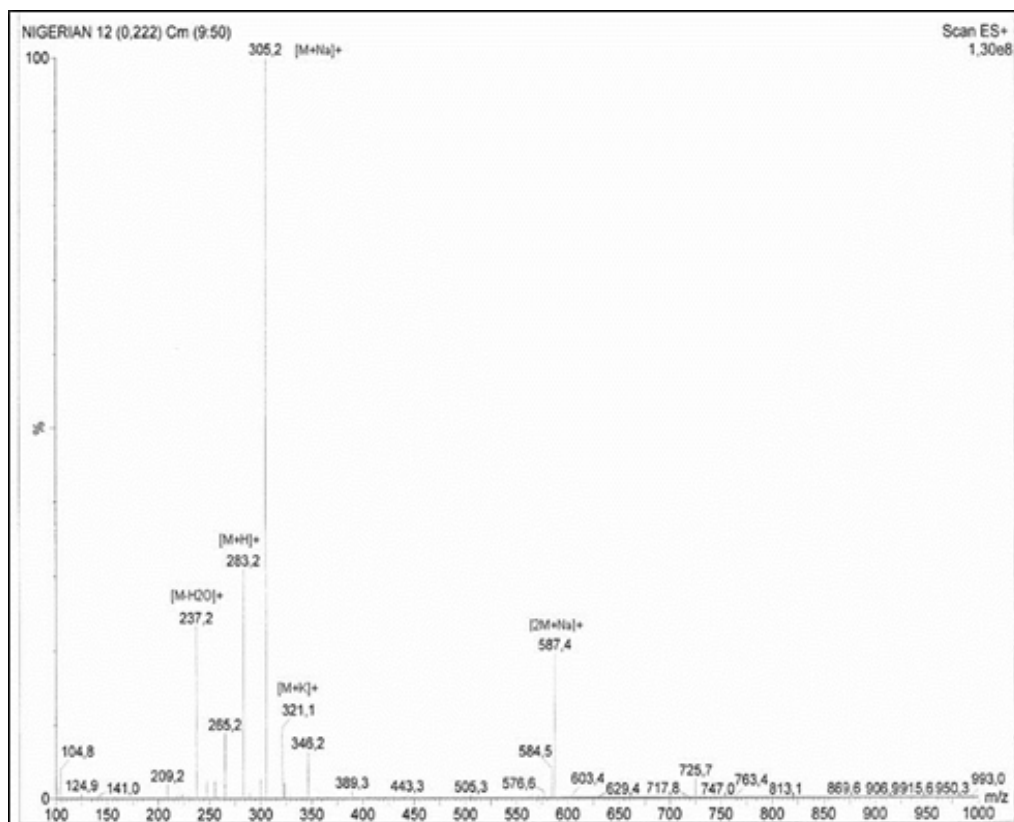
1mg=1000µg

1 µg=0.001mg

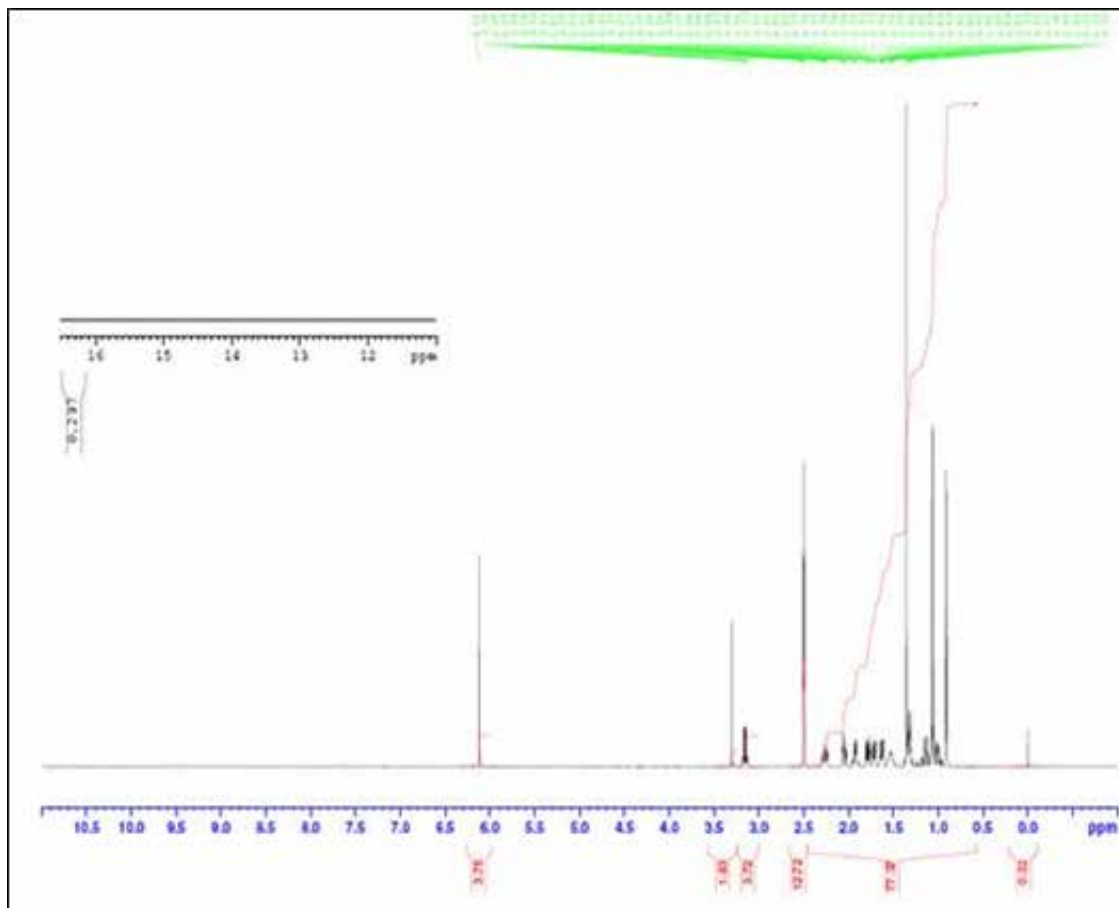
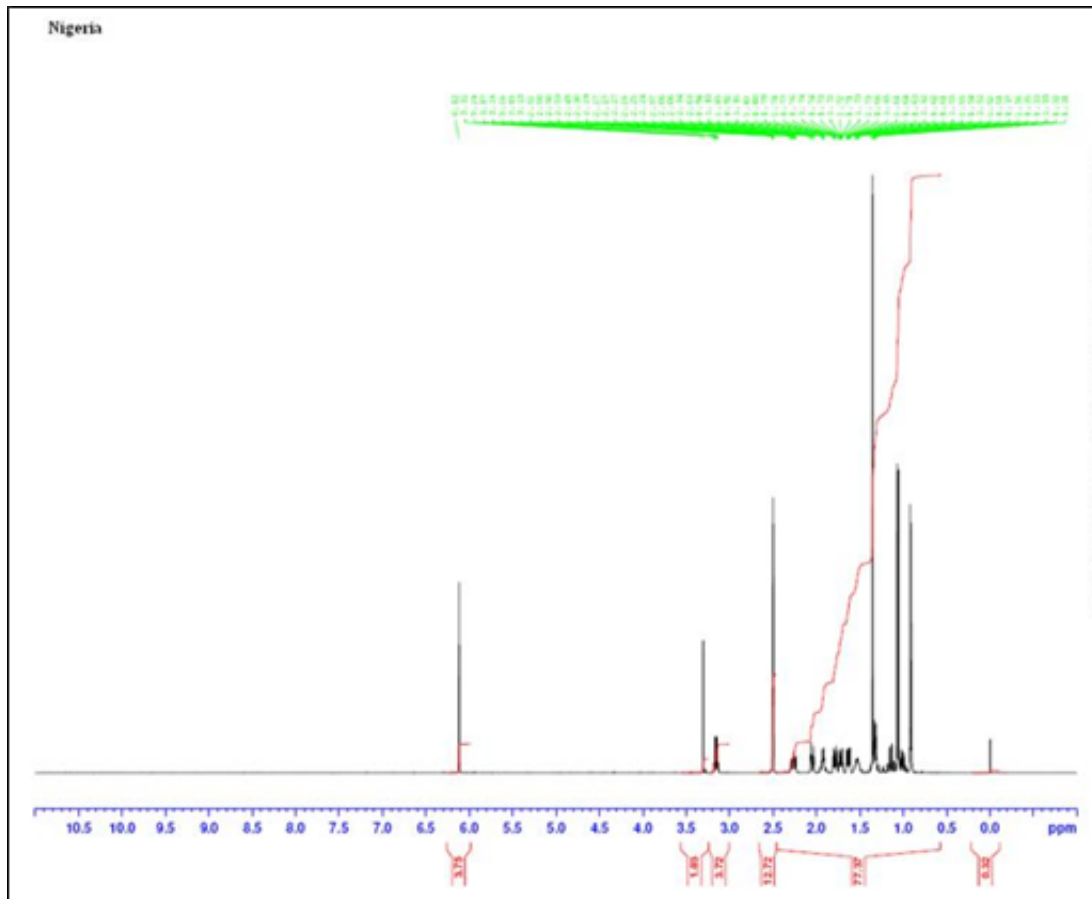
1,43 mg/kg ratón = 0.043mg/ratón = 43µg/ratón

Eritropoyetina:

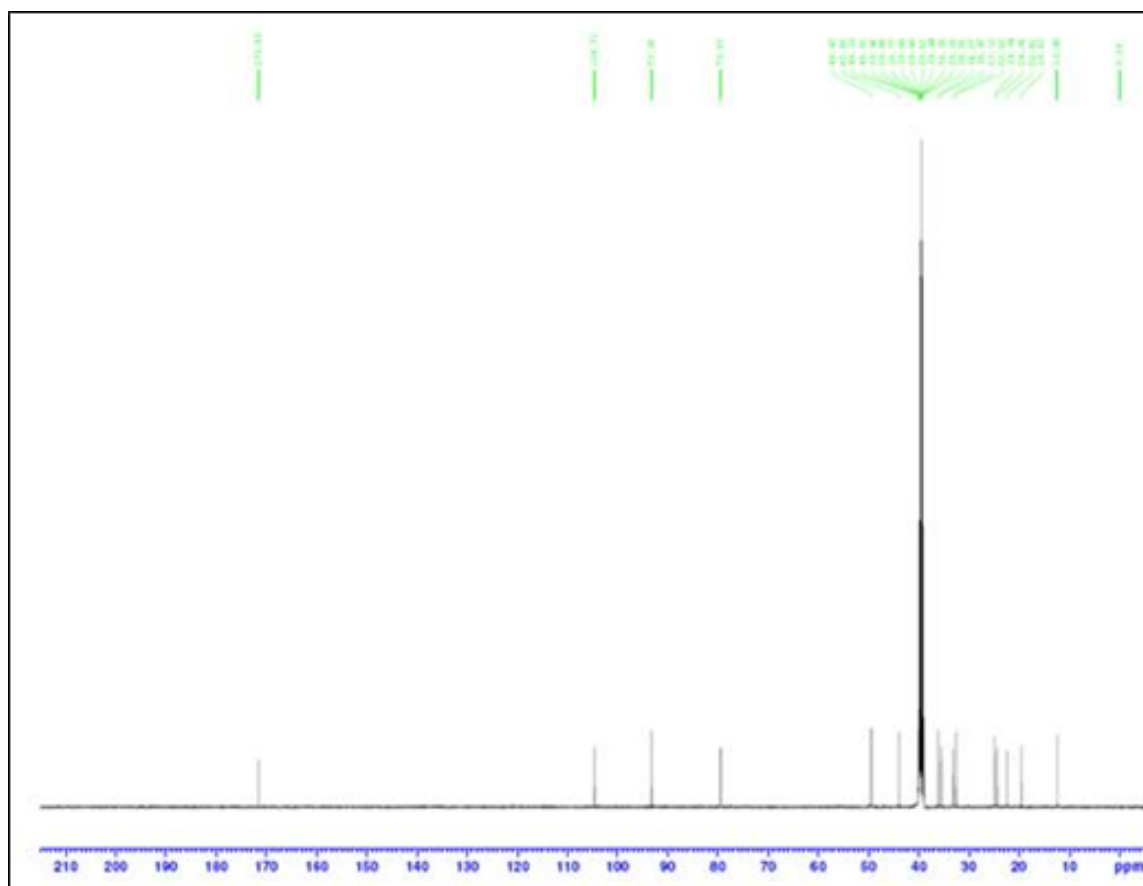
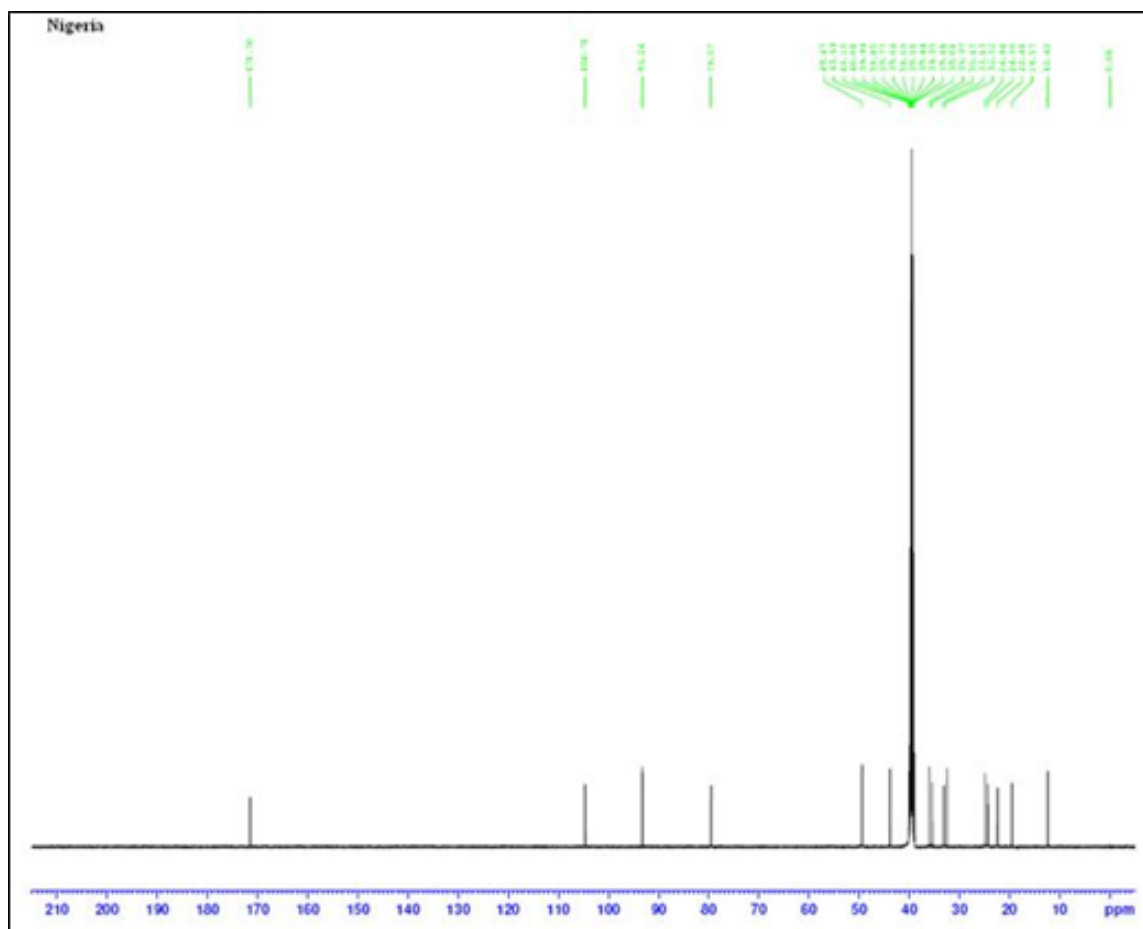
Se utilizo eritropoyetina recombinante humana, rH-EPO 100UI. Se administró 1ml a cada ratón.  
1ml = 100UI



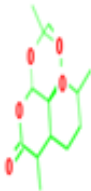
18: Análisis comparativo Espectrometría de masas de ART nigeriana y ART de Vietnam.




19: Análisis comparativo RMN H1 de ART nigeriana y ART de Vietnam.



20: Análisis comparativo RMN C13 de ART nigeriana y ART de Vietnam.

Mutagenicity - Salmonella typhimurium (CPDB) [Validation and endpoint definition]				
Predicted Activity (Confidence)	Structure	Measured Activity	Additional Information	SMILES InChI
inactive (-0.0604703) <b>unreliable:</b> unknown/infrequent features		not available	<a href="#">Relevant Fragments</a> <a href="#">DSSTox database</a> <a href="#">PubChem database</a>	CC1CCC3C(C)C(=O)OC2OC4(C)CCC1C23004 InChI=1/C15H22O5/c1-8-4-5-11-9(2)12(16)17-13-15(11)10(8)6-7-14(3,18-13)19-20-15/h8-11,13H,4-7H2,1-3H3

Carcinogenicity - Rat carcinogenicity (both sexes) [Validation and endpoint definition]				
Predicted Activity (Confidence)	Structure	Measured Activity	Additional Information	SMILES InChI
inactive (-0.014564) <b>unreliable:</b> unknown/infrequent features low confidence (<0.025)		not available	<a href="#">Relevant Fragments</a> <a href="#">DSSTox database</a> <a href="#">PubChem database</a>	CC1CCC3C(C)C(=O)OC2OC4(C)CCC1C23004 InChI=1/C15H22O5/c1-8-4-5-11-9(2)12(16)17-13-15(11)10(8)6-7-14(3,18-13)19-20-15/h8-11,13H,4-7H2,1-3H3

21: Estudios toxicológicos In Silico de ART en el software de Lazar – Osiris.

### Ratones:

Se utilizaron ratones swiss machos y hembras para estudiar la toxicidad de la ART, adquiridos en el bioterio de la facultad de farmacia y bioquímica de la ciudad de Buenos Aires, UBA. Con un peso promedio de 25-30gr y 12 semanas de edad. Los mismos fueron separados en grupos experimentales de 6, machos por un lado y hembras por otro, guardados en jaulas en un cuarto con temperatura controlada a 25°C. Los animales utilizados fueron sacrificados por dislocación cervical. La dosis de ART administrada i.p. era equivalente a una dosis de tratamiento farmacológico en humanos de 50 mg/70 kg y disuelta en Polietilenglicol 400 (PEG 400).

Las técnicas utilizadas en la investigación fueron realizadas bajo la disposición 6677/2010 de la ANMAT, "Apruébese el Régimen de Buena Práctica Clínica para Estudios de Farmacología Clínica".

Ratones control: Solo recibieron solución de PEG400  
Peso: 25 – 30 gr  
6 machos y 6 hembras

Ratones tratados: Recibieron ART/PEG400, EPO + ART/PEG400 y ART/LPS  
Peso: 25-30gr  
6 machos y 6 hembras  
PEG400 + dosis ART

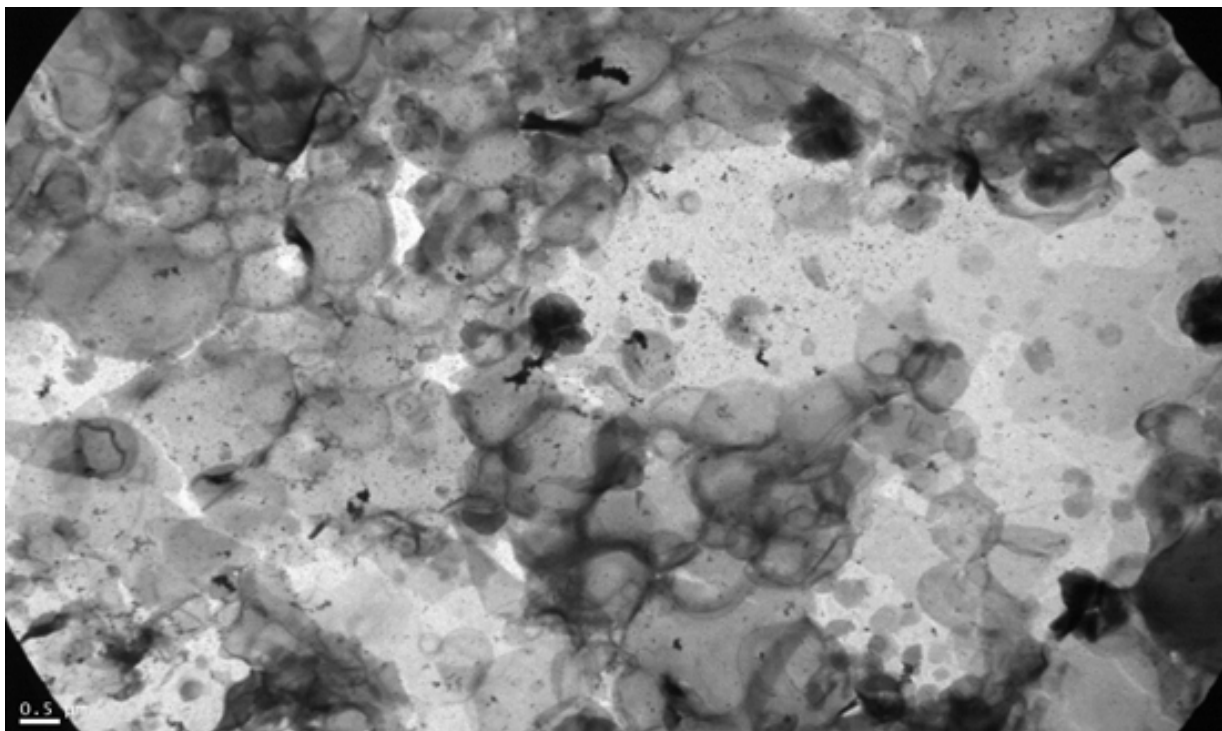
### Liposomas:

Basados en el libro Liposomes (Torchilin & V.Weissig, 2003), los liposomas fueron preparados en una mezcla de Fosfolípidos más Colesterol en una relación 6:1 a partir de una película seca de lípidos. Se disuelven los lípidos junto a la droga en una solución de Diclorometano y Metanol en una relación 3:2. Se llevo a sequedad la mezcla en un Rotavap durante 15 minutos. Luego se sónico para resuspender, formando una emulsión, en una solución tampón de suero fetal bovino 10% PBS con NaCl 154mM para isotonzar (Folch, Lee, & Stanley, 1957). La sonicación se realiza para poder encapsular ART en los liposomas. A mayor tiempo de sonicación se obtiene una mayor homogeneidad en el tamaño de los liposomas.

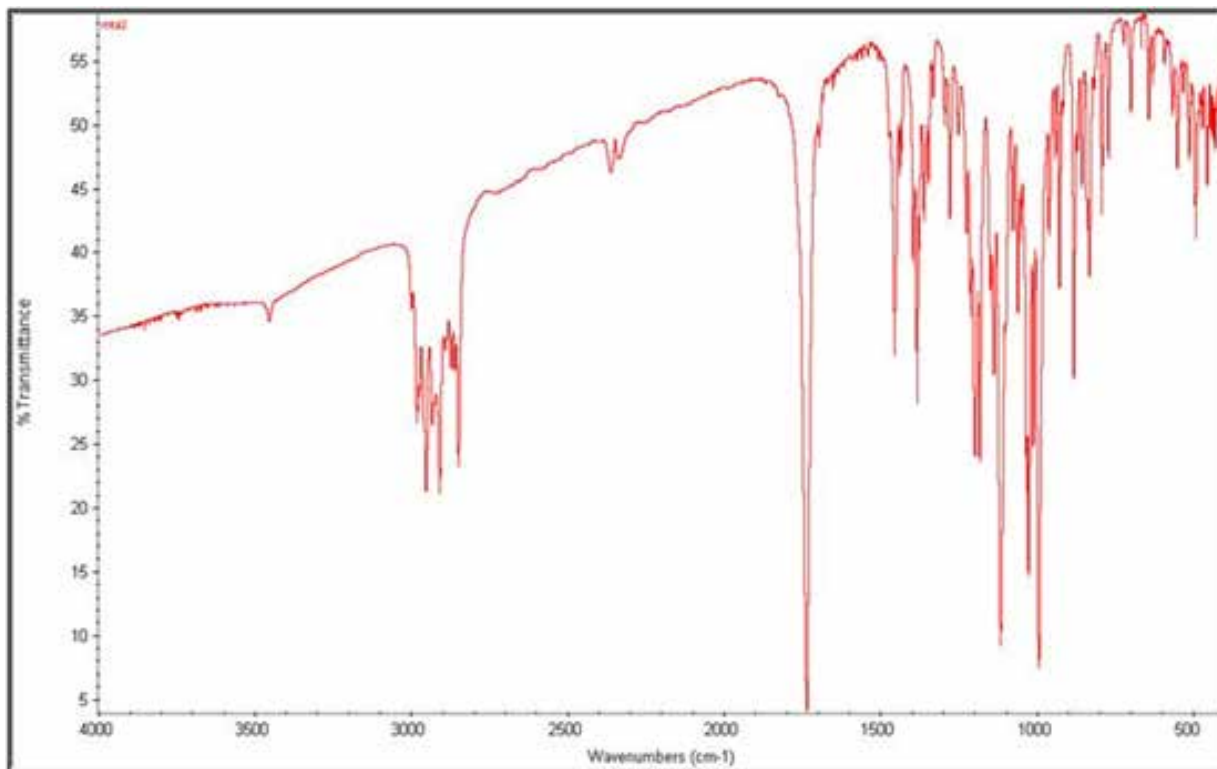
Terminada la preparación, se analizo la solución en un Microscopio electrónico para poder evaluar la formación de liposomas.

La concentración de ART encapsulada se calculó a través de quimioluminiscencia con luminol.

La eficiencia de fármaco atrapado fue seguida por espectroscopia de infrarrojos (FTIR). La interacción entre lípidos y ART fue seguido por la unión del resto de endoperóxido y los anillos aromáticos debido a la presencia de la O-O, el C-O, el O-O-C, así como el C = O modos en el FTIR espectro.



22: Liposomas al microscopio electrónico. Se referencia tamaño para 5um.



23: Espectroscopia infrarroja del complejo Liposoma - ART.

## 11.2 CONTEO DE RETICULOCITOS:

Se realizó el conteo de reticulocitos en ratones control, a los cuales se les administro solamente una solución de PEG400 y se compararon con el resultado del grupo de ratones tratados con ART en solución. A los ratones tratados se les administro una dosis de 43µg/30g vía oral. Se realizó el mismo conteo para ratones tratados con ART/LPS y luego se compararon con los resultados obtenidos con ART en solución de PEG400. Las mediciones fueron realizadas a las 24hs y 48hs post-administración de la droga.

También se realizó el mismo conteo para un tercer grupo de ratones tratados con rH-EPO y ART.

Para la obtención de muestras de sangre periférica se utilizó la técnica de extracción por seno retro-orbital en ratones. Utilizando un capilar, presionamos suavemente hasta obtener aproximadamente 1 o 2 ml. La muestra es colectada en tubos Eppendorf. Los capilares y tubos Eppendorf fueron heparinizados previamente para evitar coagulación de la muestra. Se agregaron dos gotas de colorante, Azul de Cresilo, a la muestra y se mezcló para homogeneizar.

Se incubaron durante 10-15 minutos a baño maría a una temperatura de 37°C.

Luego de la incubación, se toma una gota de la muestra con una pipeta Pasteur y se realiza el extendido en el portaobjetos, dejándolos secar a temperatura ambiente.

Los portaobjetos fueron codificados, y el análisis se realizó por dos observadores independientes y las observaciones fueron realizadas "a ciegas". Los extendidos fueron colocados en un microscopio óptico bajo un objetivo de 100X, cuidadosamente se les agregó una gota de aceite de inmersión para mejorar la resolución.

Se contabilizó reticulocitos cada 1000 hematíes. Se contaron 4000 glóbulos rojos en aproximadamente 10 campos. Los resultados fueron expresados en porcentaje.

### 11.3 CONTEO DE MICRONÚCLEOS:

Se realizó el ensayo de micronúcleos basándonos en la técnica descrita por Schmid (Schmid, 1975).

Se realizó el conteo de eritrocitos policromáticos micronucleados (EPM) cada mil eritrocitos policromáticos (EP) en ratones control, a los cuales se les administro solamente una solución de PEG400 y se compararon con el resultado del grupo de ratones tratados con ART en solución. A los ratones tratados se les administro una dosis de 43µg/30g vía intraperitoneal. Se realizó el mismo conteo para ratones tratados con ART/LPS y luego se compararon con los resultados obtenidos con ART en solución de PEG400. Las mediciones fueron realizadas a las 24hs y 48hs post-administración de la droga.

También se realizó el mismo conteo para un tercer grupo de ratones tratados con rH-EPO 100UI y ART en solución.

Se extrajeron los dos fémures de cada animal y la cavidad medular se lavó por flujo con 1 ml de suero fetal bovino. La médula obtenida se centrifugó a 1000 r.p.m. durante 10 minutos y tras eliminar el sobrenadante se realizó un extendido del botón celular en un portaobjetos. Se realizaron dos extendidos por cada animal y luego se mantuvieron 24 horas a temperatura ambiente para su secado y posteriormente se realizó la coloración con May Grunwald – Giemsa. Los portaobjetos fueron codificados, y el análisis se realizó por dos observadores independientes y las observaciones fueron realizadas "a ciegas". Se contabilizó la presencia de eritrocitos policromáticos (EP) y dentro de esos EP, se contabilizaron los eritrocitos policromáticos micronucleados (EPM). Se contabilizaron un total de 1000 EP. Los resultados fueron expresados EPM/1000EP.

Vale aclarar que para el conteo de micronúcleos se realizaron grupos de seis ratones para el control, para las 24hs y otros seis ratones a las 48hs. Esto se debe a que para cada conteo de EMP se debe sacrificar al animal.



## 12 RESULTADOS:

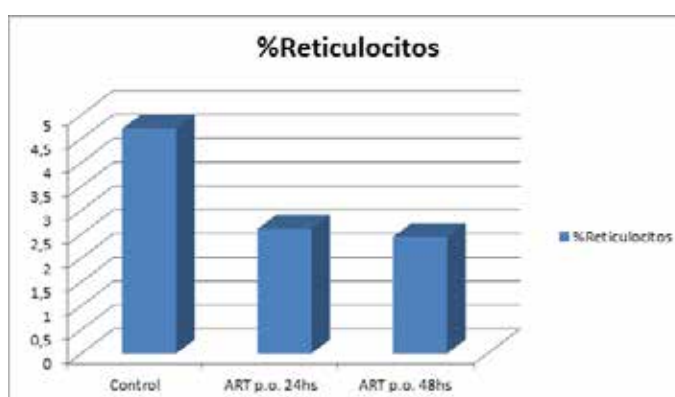
### 12.1 % RETICULOCITOS EN RATONES TRATADOS CON ART p.o. 43 µg

%RETICULOCITOS			
Ratones	Control PEG400 p.o. 24hs	ART p.o. 43 µg /Raton 48hs	ART p.o. 43 µg /Raton
M1	5,4	2,22	2,1
M2	4,7	2,7	2,5
M3	4,9	3,2	3,1
M4	3,8	3,6	3,3
M5	4,1	2,2	2,1
M6	4,3	2,8	2,8
H1	5,2	1,6	1,6
H2	3,7	1,8	1,5
H3	4,8	2,9	2,7
H4	4,9	2,8	2,7
H5	5,4	3,1	2,8
H6	5,3	2,4	2,3
Promedio	4,71	2,61	2,46
Desvió Est.	0,60	0,59	0,56
Media +/-DS	4,69+/-0,62	2,61+/-0,64	2,44+/-0,57
Test T	0,00000002	0,000000003	

Tabla 1: Porcentaje de reticulocitos en ratones control y tratados con ART p.o. a las 24hs y 48hs

Podemos observar una disminución notoria de casi un 50% en la producción de reticulocitos a las 24hs. A las 48hs no se ve un aumento en la producción de reticulocitos, se mantiene el promedio. Esto nos permite presuponer que la ART pudo haber causado un daño en la médula ósea que, a las 48hs de tratamiento, no presenta una mejoría.

Los resultados muestran un  $p < 0,0001$  entre ratones control y ratones tratados. Tenemos una diferencia significativa que nos indica que los resultados y probabilidades no son al azar. Esto nos permite confirmar nuestra hipótesis, la ART afecta a la producción de reticulocitos en medula ósea.



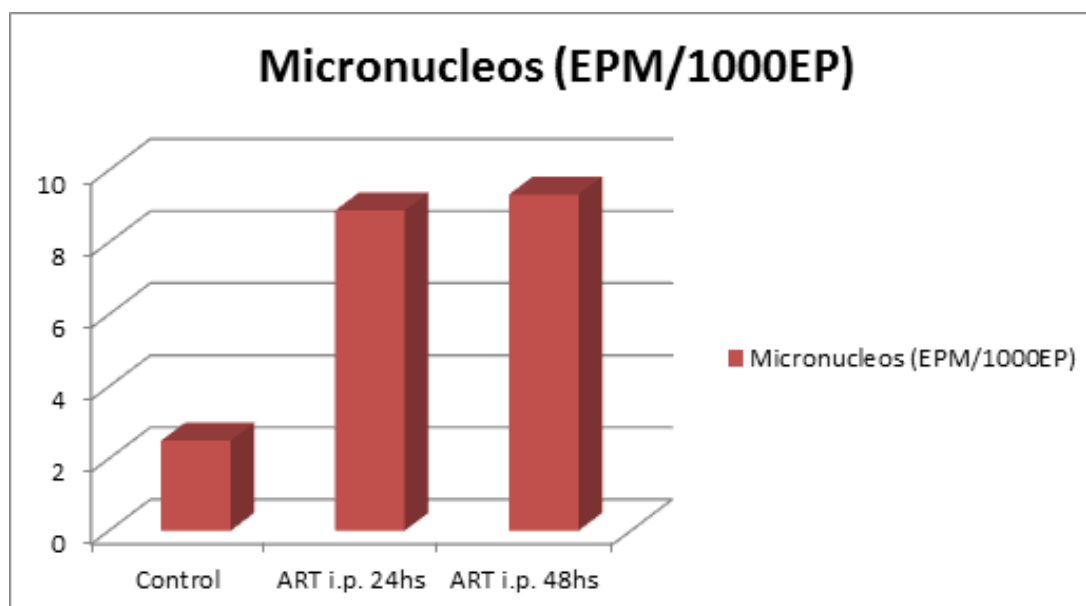
24: Grafico de barras de porcentaje de reticulocitos en ratones control y tratados con ART p.o. a las 24hs y 48hs.

### 12.2 MICRONÚCLEOS EN RATONES TRATADOS CON ART i.p. 43 µg A LAS 24 Y 48HS

EPM/1000EP			
Ratones	Control	ART i.p. 43 ug/ratón 24 hs	ART i.p. 43 ug/ ratón 48 hs
M1	2.9	9	-
M2	4	8	-
M3	2	11	-
M4	-	-	10
M5	-	-	7
M6	-	-	7
H1	2.5	8	-
H2	2	10	-
H3	1.5	7	-
H4	-	-	12
H5	-	-	9
H6	-	-	11
<b>Promedio</b>	<b>2,5</b>	<b>8,83</b>	<b>9,33</b>
<b>Desvió Est.</b>	<b>0,88</b>	<b>1,47</b>	<b>2,07</b>
<b>Media +/-DS</b>	<b>2.5+/-0.88</b>	<b>9+/-1,47</b>	<b>8.9+/-2,07</b>
<b>Test T</b>	<b>0,000000004</b>	<b>0,000000003</b>	

Tabla 2: Micronúcleos en ratones control y ratones tratados con ART i.p.

Se observó un aumento del número de eritrocitos micronucleados (EPM) a las 24 y 48 hs después del tratamiento. Los resultados muestran un  $p < 0,0001$  entre ratones control y ratones tratados. Esto nos permite confirmar nuestra hipótesis, la ART podría ser responsable de una actividad clastogénica debido a formación de radicales libre por la presencia de un puente endoperóxido.



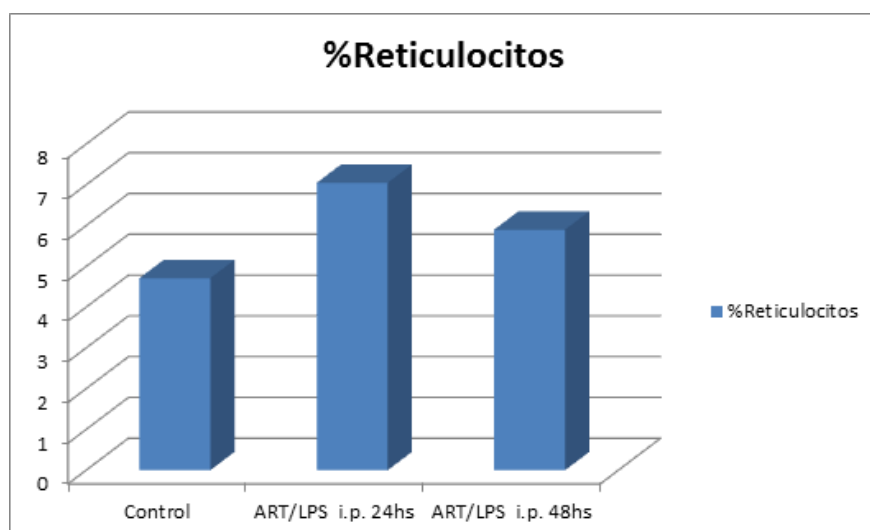
25: Grafico de barras Micronúcleos en ratones control y ratones tratados con ART i.p.

### 12.3 % RETICULOCITOS EN RATONES TRATADOS CON ART/LPS i.p. 43 µg

%RETICULOCITOS			
Ratones	Control PEG400/LPS. p.o	ART/LPS p.o. 43 µg /Raton 24hs	ART/LPS p.o. 43 µg /Raton 48hs
M1	5,4	7,4	5,5
M2	4,7	6,2	5,7
M3	4,9	6,1	6,1
M4	3,8	7,4	5,8
M5	4,1	6,9	6
M6	4,3	7,4	5,9
H1	5,2	7,1	5,6
H2	3,7	7,2	6,3
H3	4,8	7,5	5,7
H4	4,9	6,9	6,3
H5	5,4	7,2	5,9
H6	5,3	7,3	5,7
<b>Promedio</b>	<b>4,71</b>	<b>7,05</b>	<b>5,88</b>
<b>Desvió Est.</b>	<b>0,60</b>	<b>0,46</b>	<b>0,26</b>
<b>Media +/-DS</b>	<b>4,69+/-0,62</b>	<b>2,61+/-0,64</b>	<b>2,44+/-0,57</b>
<b>Test T</b>		<b>0,000000001</b>	<b>0,00002</b>

Tabla 3: Porcentaje de reticulocitos en ratones tratados con ART/LPS a las 24hs y 48hs.

La administración de ART/LPS mostró un aumento en la producción de reticulocitos a las 24hs. Este aumento se ve reducido a las 48hs, donde los valores de reticulocitos se establecen a valores normales. Podemos suponer que la ART en liposomas no provocó daño en medula ósea al no evidenciar una disminución en la producción de reticulocitos. Nuestra hipótesis para el leve aumento de reticulocitos a las 24hs, se correlaciona con micronúcleos bajos, lo cual ese pequeño deterioro estimula la progenie de MO.



26: Grafico de barras de porcentaje de reticulocitos en ratones tratados con ART/LPS a las 24hs y 48hs.

### 12.4 MICRONÚCLEOS EN RATONES TRATADOS CON ART/LPS i.p. 43 µg A LAS 24 Y 48HS

EPM/1000EP			
Ratones	Control PEG400	ART-LPS i.p. 43 ug/ratón 24 hs	ART-LPS i.p. 43 ug/ratón 48 hs
M1	2.9	4,2	-
M2	4	4,9	-
M3	2	5,1	-
M4	-	-	5,2
M5	-	-	5,4
M6	-	-	4,9
H1	2.5	4,7	-
H2	2	4,3	-
H3	1.5	4,1	-
H4	-	-	5,1
H5	-	-	5,3
H6	-	-	5,5
<b>Promedio</b>	<b>2.5</b>	<b>4,55</b>	<b>5.23</b>
<b>Desvió Est.</b>	<b>0.88</b>	<b>0,41</b>	<b>0.22</b>
<b>Media +/-DS</b>	<b>2.5+/-0.88</b>	<b>9+/-0.41</b>	<b>8.9+/-0.22</b>
<b>Test T</b>		<b>0,0012</b>	<b>0.0012</b>

Tabla 4: Micronúcleos en ratones tratados con ART/LPS a las 24hs y 48hs.

Los resultados mostraron una disminución notable en la formación de EPM entre ratones tratados con ART en solución y ART/LPS. Esto nos demuestra que la actividad clastogénica de la ART se ve disminuida cuando es administrada en liposomas. Esto puede deberse a una liberación sostenida en el tiempo de la ART, causando un menor daño a nivel medular.

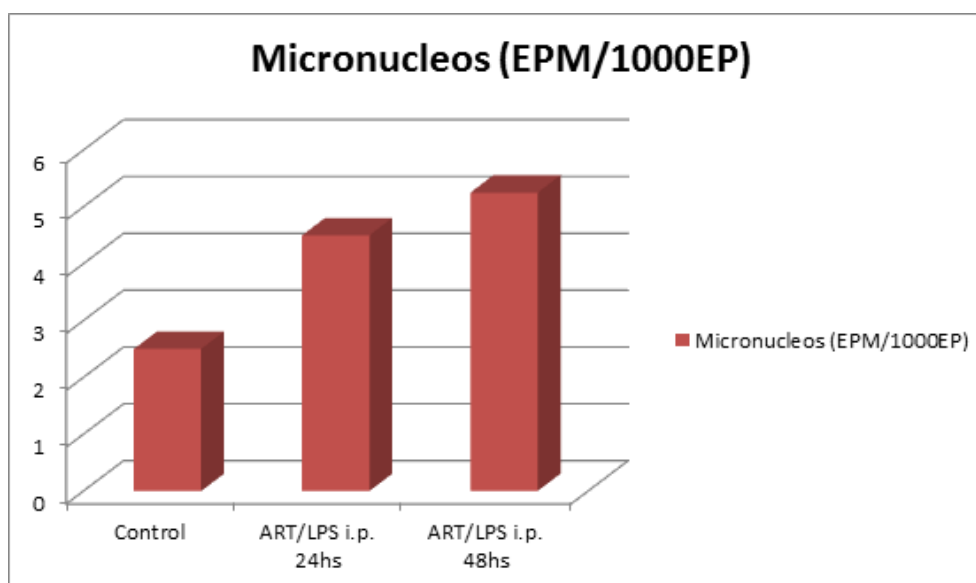
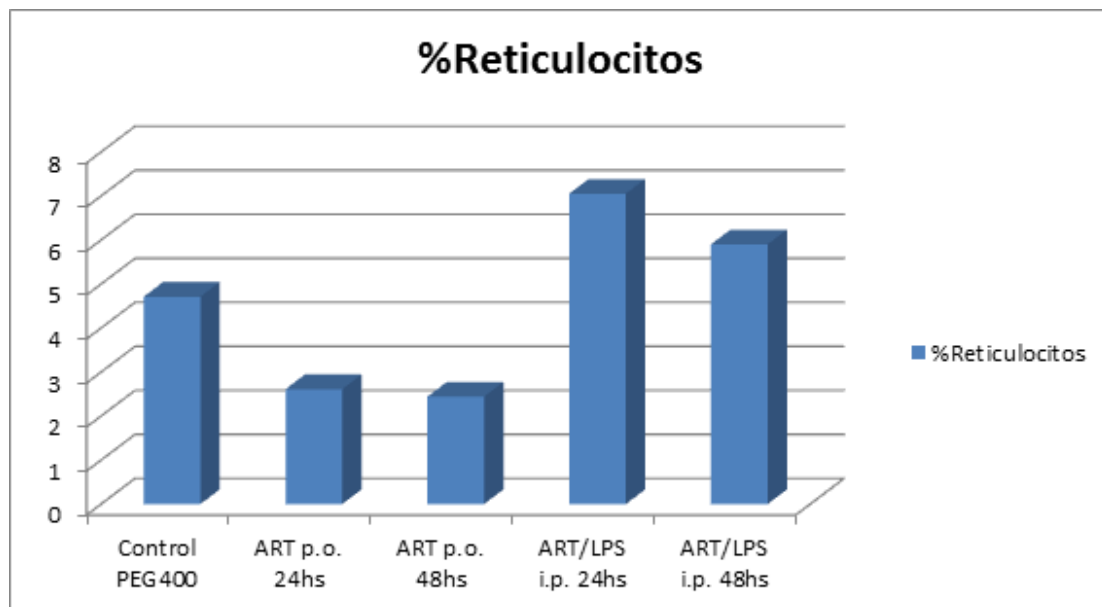
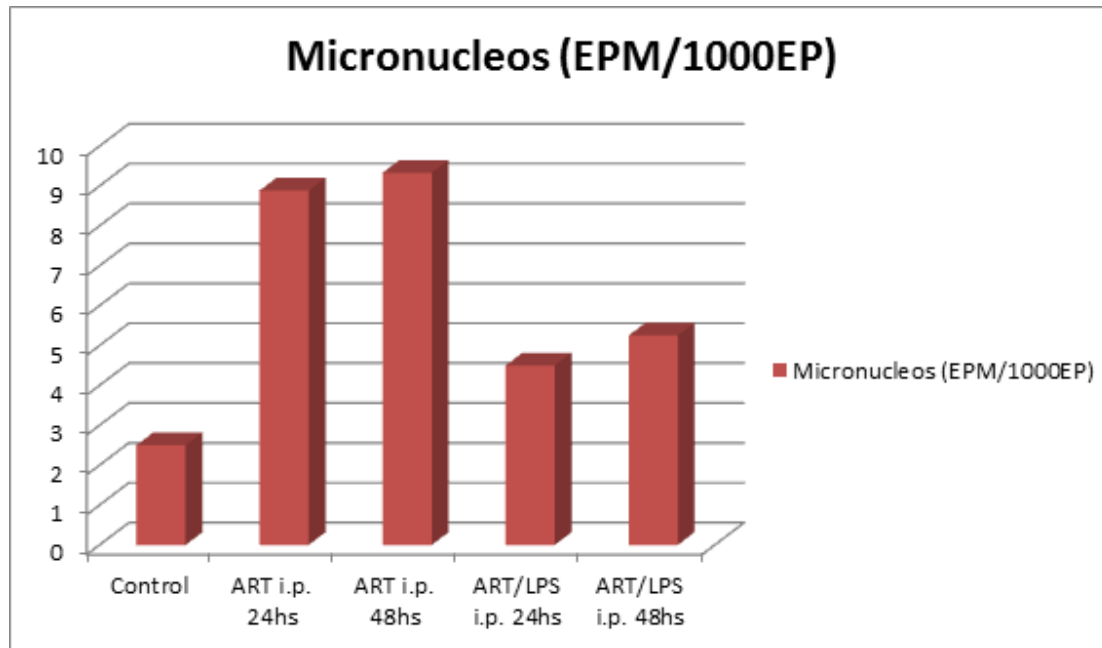


Tabla 5: Grafico de barras de Micronúcleos en ratones tratados con ART/LPS a las 24hs y 48hs.



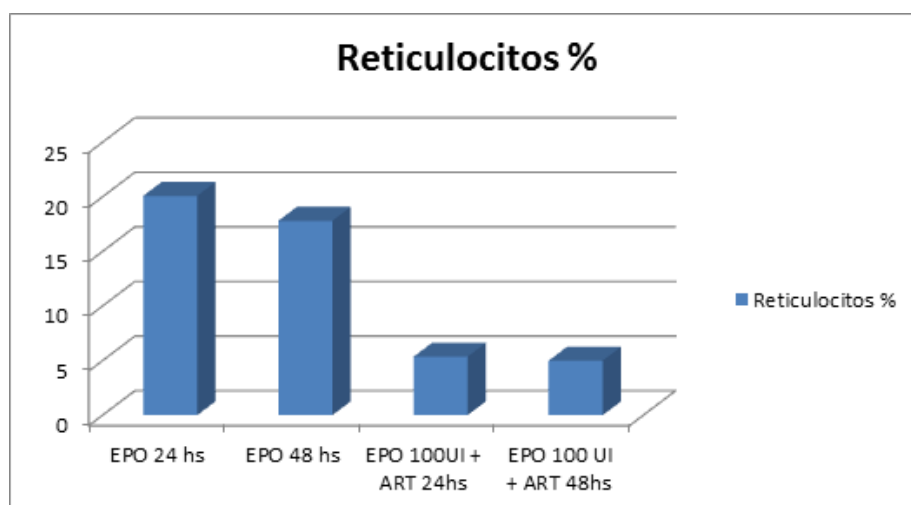
27: Gráficos de barras comparativos entre ratones tratados con ART en solución y ART/LPS.

### 12.5 RETICULOCITOS A LAS 24 Y 48HS EN RATONES TRATADOS CON UNA DOSIS PREVIA DE EPO MÁS ART i.p.

Reticulocitos %				
Ratones	EPO i.p. 100 UI/ratón		EPO 100 UI + ART 24hs	EPO 100 UI + ART
	EPO 24 hs	EPO 48 hs	24HS	48hs
M1	28	17	3,7	3,2
M2	15	17	3,7	3,5
M3	20	18	5,4	5,1
M4	15	13	8	7,9
M5	18	18	5,6	5,2
M6	21	19	4,9	4,1
H1	30	20	6	5,4
H2	19	18	6,2	6
H3	17	20	4,1	3,8
H4	18	21	7,2	7,1
H5	21	18	3,9	3,5
H6	19	15	5,5	5,1
<b>Promedio</b>	<b>20,08</b>	<b>17,8</b>	<b>5,35</b>	<b>4,99</b>
<b>Desv. Est.</b>	<b>4,62</b>	<b>2,21</b>	<b>1,38</b>	<b>1,48</b>
<b>Media +/- DS</b>	<b>20+/-4,84</b>	<b>17,1+/-2,28</b>	<b>5,39+/-1,44</b>	<b>4,99+/-1,48</b>
<b>Test de T</b>			<b>0,0000001</b>	<b>0,000000000001</b>

Tabla 6: Porcentaje de reticulocitos en ratones tratados con una dosis previa de EPO mas una dosis de ART i.p. 24hs y 48hs después.

Los resultados mostraron que la ART ejerce un poderoso efecto inhibitorio de la proliferación eritroide inducida por EPO. Se ve una disminución muy pronunciada asociada a un efecto toxico sobre la progenie eritroide en medula ósea.



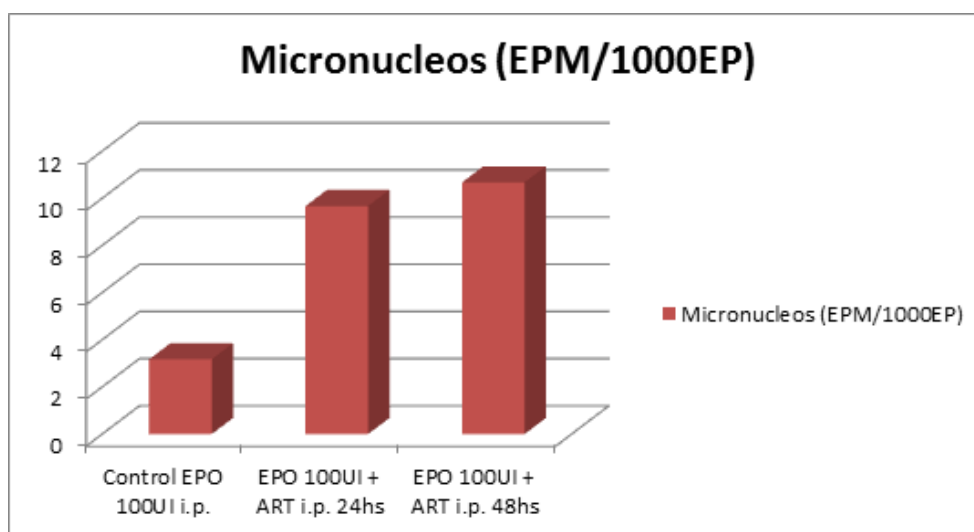
28: Grafico de barras de porcentaje de reticulocitos en ratones tratados con una dosis previa de EPO mas una dosis de ART i.p. 24hs y 48hs después.

**12.6 MICRONUCLEOS A LAS 24 Y 48HS EN RATONES TRATADOS CON UNA DOSIS PREVIA DE EPO MÁS DOSIS DE ART i.p.**

EPM/1000EP			
Ratones	Control EPO 100UI i.p.	EPO 100UI + ART i.p. 24hs	EPO 100UI + ART i.p. 48 hs
M1	3	11	-
M2	5	8	-
M3	4	12	-
M4	-	-	10
M5	-	-	9
M6	-	-	11
H1	-	8	-
H2	-	10	-
H3	-	9	-
H4	3	-	11
H5	2	-	12
H6	2	-	11
<b>Promedio</b>	<b>3,17</b>	<b>9,67</b>	<b>10,67</b>
<b>Desvió Est.</b>	<b>1,17</b>	<b>1,63</b>	<b>1,03</b>
<b>DS</b>	<b>3,17+/-1,17</b>	<b>9,67+/-1,63</b>	<b>10,67+/-1.03</b>
<b>Test T</b>		<b>0,00002</b>	<b>0,0000004</b>

Tabla 7: Conteo de micronúcleos en ratones tratados con una dosis previa de EPO. Mas una dosis de ART i.p. 24hs después.

La eritropoyetina no influye en la producción de reticulocitos, podemos observarlo en el grupo de ratones control tratados con EPO, donde se mantiene el promedio normal de EPM/EP. Inmediatamente al administrar una dosis de ART se ve el incremento de EPM.



29: Grafico de barras de micronúcleos en ratones tratados con una dosis previa de EPO. Mas una dosis de ART i.p. 24hs después.

## 13 DISCUSIÓN Y CONCLUSIÓN:

Nuestros resultados mostraron que la ART, siendo una de las drogas más usadas en el tratamiento de la malaria, produce marcados efectos toxicológicos. Consideramos que la utilización de pruebas in vivo en médula ósea, como el Test de Schmidt, es un sistema adecuado para poder medir indirectamente la toxicidad causada por ART a nivel medular. En la actualidad, no podemos explicar los mecanismos bioquímicos, farmacológicos o fisiológicos causados por ART, sólo suponemos que el efecto clastógeno que provoca la ART sería consecuencia de la generación de radicales libres e intermediarios reactivos.

Se observó un aumento del número de eritrocitos micronucleados a las 24 y 48 hs después del tratamiento, probablemente debido a la hipótesis planteada inicialmente. La presencia de un puente endoperóxido en la molécula de ART, que al romperse genera radicales libres. Estos compuestos poseen electrones desapareados que se pueden unir a cualquier macromolécula como proteínas, ácidos nucleicos, etc. presentando efectos tóxicos de mutagenicidad, carcinogenicidad, irritante y teratogénesis en animales de experimentación.

La prueba realizada con rh-EPO nos mostró que la ART ejerce un poderoso efecto inhibitorio de la proliferación eritroide, causado por una acción tóxica sobre la médula ósea o por una acción inespecífica sobre la Eritropoyetina.

El complejo Liposoma - ART mostró una reducción de la toxicidad del fármaco, se vio disminuida la producción de EPM y no se observó una disminución en la producción de reticulocitos. Por otro lado, nos sentimos alentados a desarrollar nuevas estrategias en la composición lipídica de liposomas, con el fin de reducir la toxicidad de ART, pero al mismo tiempo aumentar la capacidad de unión del liposoma al GR, con el objeto de que la mayor concentración de ART sea absorbida por el GR y por ende afecte al parásito y no a la médula ósea.

En conclusión, consideramos que el complejo Liposoma - ART es una buena alternativa para el tratamiento de enfermedades parasitarias, por consecuencia, sería importante realizar pruebas en el futuro para evaluar su eficacia como antiparasitario.



## 14 INDICE DE IMÁGENES:

1: Ciclo de vida del parásito dentro del mosquito y dentro del ser humano. (CDC, 2012).....	9
2: Countries with ongoing transmission of malaria, 2013. (WHO, 2013).....	12
3: Molécula de Artemisinina y su puente endoperóxido. (Brunton, Lazo, & Parker, 2013) .....	12
4: Posibles radicales de la Artemisinina. (Abraham, 2003) .....	13
5: Reticulocitos al microscopio óptico.....	17
6: Preparación de recuento de reticulocitos. Este nuevo frotis teñido con azul de metileno muestra un gran número de reticulocitos intensamente teñidos (las células que contienen precipitados de RNA se encuentran teñidas de azul oscuro). (Harrison's, 2012).....	18
7: Las etapas de desarrollo morfológico del eritrocito.....	18
8: Diferenciación de una célula pluripotente.....	19
9: Ejemplos de alteraciones celulares que acompañan a la apoptosis (A), la perturbación mitótica durante la anafase (B), la catástrofe mitótica con la interrupción completa del cromosoma / husillo (C), y la formación de micronúcleos asociada con aneuploidia. (Harrison's, 2012) .....	22
10: Eritrocitos Policromáticos con micronúcleos inducidos por Ciclofosfamida, las flechas indican eritrocitos policromáticos con micronúcleos (a y b), Eritrocitos normocromáticos con micronúcleos (c) y Eritrocitos normocromáticos (d). (Harrison's, 2012) .....	22
11: 1a: PCE (Eritrocito policromático) y Eritrocito Normocromático. 1b: PCE con presencia de micronúcl .....	23
12: Glóbulo rojo infectado con Plasmodium Falciparum (Rashidi & Nguyen).....	23
13: Diagrama de un Liposoma con la orientación de los fosfolípidos. (Nelson & Cox, 2005).....	24
14: Clasificación de los liposomas según su cantidad de bicapas lipídicas (Torello, Viscasillas, & Pozo, 2002). .....	27
15: Encapsulación de drogas en liposomas (Nelson & Cox, 2005) .....	28
16: Introducción del capilar al seno retro-ocular.....	32
17: Técnica de administración intraperitoneal .....	33
18: Análisis comparativo Espectrometría de masas de ART nigeriana y ART de Vietnam. ....	34
19: Análisis comparativo RMN H1 de ART nigeriana y ART de Vietnam .....	35
20: Análisis comparativo RMN C13 de ART nigeriana y ART de Vietnam .....	36
21: Estudios toxicológicos In Silico de ART en el software de Lazar – Osiris.....	37
22: Liposomas al microscopio electrónico. Se referencia tamaño para 5µm .....	38
23: Espectroscopia infrarroja del complejo Liposoma - ART .....	39
24: Grafico de barras de porcentaje de reticulocitos en ratones control y tratados con ART p.o. a las 24hs y 48hs .....	41
25: Grafico de barras Micronúcleos en ratones control y ratones trat. con ART i.p. ....	42
26: Grafico de barras de porcentaje de reticulocitos en ratones tratados con ART/LPS a las 24hs y 48hs. ....	43
27: Gráficos de barras comparativos entre ratones tratados con ART en solución y ART/LPS.....	45
28: Grafico de barras de porcentaje de reticulocitos en ratones tratados con una dosis previa de EPO mas una dosis de ART i.p. 24hs y 48hs después.....	46
29: Grafico de barras de micronúcleos en ratones tratados con una dosis previa de EPO. Mas una dosis de ART i.p. 24hs después.....	47

## 15 ÍNDICE DE TABLAS:

Tabla 1: Porcentaje de reticulocitos en ratones control y tratados con ART p.o. a las 24hs y 48hs	41
Tabla 2: Micronúcleos en ratones control y ratones tratados con ART i.p.....	42
Tabla 3: Porcentaje de reticulocitos en ratones tratados con ART/LPS a las 24hs y 48hs. ....	43
Tabla 4: Micronúcleos en ratones tratados con ART/LPS a las 24hs y 48hs. ....	44
Tabla 5: Grafico de barras de Micronúcleos en ratones tratados con ART/LPS a las 24hs y 48hs.	44
Tabla 6: Porcentaje de reticulocitos en ratones tratados con una dosis previa de EPO mas una dosis de ART i.p. 24hs y 48hs después. ....	46
Tabla 7: Conteo de micronúcleos en ratones tratados con una dosis previa de EPO. Mas una dosis de ART i.p. 24hs después.....	47

## 16 BIBLIOGRAFÍA

- Adjuik, M., Babiker, A., Garner, P., & otros. (2004). combinations for treatment of malaria: Meta-analysis. *Lancet*, 363:9–17.
- Agnandji ST, L. B. (2011). First results of phase 3 trial of RTS,S/AS01 malaria vaccine in African children. *N Engl J Med*, 365(20):1863-75.
- Artemisinin combination treatment, M. c. (2013). <http://www.malariaconsortium.org/>. Recuperado el 2013, de <http://www.malariaconsortium.org/pages/112.htm>
- Ball, E. (1995). Liposomas en Dermatología. *Dermatologia Venezolana*, 33(1): 15-23.
- Ball, E. (1995). Liposomas en dermatologia. *Dermatologia Venezolana*, 33, 15-23.
- Bangham, A., & Horne, R. W. (1964). Negative staining of phospholipids and their structural modification by surface active agents as observed in the electron microscope. *The Journal of Molecular Biology*, 8660-668.
- Barillas-Mury, C., & Kumar, S. (2005). a tale of dangerous liaisons. *ellular Microbiology*, 7(11):1539–1545.
- Brunton, L., Lazo, J., & Parker, K. (2013). *Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics*. MCGRAW-HILL.
- Bugarín, O. T., & Ibarra, M. R. (2013). Utilidad de la Prueba de Micronúcleos y Anormalidades Nucleares en Células Exfoliadas de Mucosa Oral en la Evaluación de Daño Genotóxico y Citotóxico. *Int. J. Morphol.*, 31(2):650-657.
- Caicedo, J., Rincon, K., & Garcia, I. R. (2009). Respuesta inmune a la Malaria. *Revista Universidad del Rosario*.
- Chao, S., Yang, C., & Lee, J. (2005). Hypersensitivity syndrome and pure red cell aplasia following allo-purinol therapy in a patient with chronic kidney disease. *Annals of Pharmacotherapy*, 39(9):1552-6.
- Chavette, J., Chiron, F., Chabaud, A., & Landau, I. (2007). Probable speciations by “host-vector ‘fidelisation’” 14 species of Plasmodium from Magpies. *Parasite*, 14(1), 21-37.
- Clares, B. (2003). Sistemas de Transporte y Liberación de Fármacos de Aplicación Tópica: Liposomas multilamlares portadores de Acetonido de Triamcinolona. *Tesis doctoral*. Granada, España.
- Clares, B. (2003). Sistemas de Transporte y Liberación de Fármacos de Aplicación Tópica: Liposomas multilamlares portadores de Acetonido de Triamcinolona. Tesis doctoral, *Universidad de Granada*.
- Cogswell, F. B. (1992). The Hypnozoite and Relapse in Primate Malaria. *Clinical Microbiology Reviews*, 5(1):26-35.
- Collins, W. E. (2007). Further Understanding the Nature of Relapse of Plasmodium vivax Infection. *The Journal of Infectious Diseases*, 195:919–920.
- Cowman, A. F., & Crabb, B. S. (2006). Invasion of Red Blood Cells by Malaria Parasites. *Elsevier*, 124:755–766.
- Cox, F. (2002). History of human parasitology. *Clin Microbiol rev*, 595-612.
- Dertinger, S., Torous, D., Hayashi, M., & MacGregor, J. (2011). Flow cytometric scoring of micronucleated erythrocytes: an efficient platform for assessing in vivo cytogenetic damage. *Mutagenesis*, 26(1):139-45.
- Eckstein-Ludwig, U., Webb, R., Goethem, I. D., & otros. (2003). Artemisinins target the SERCA of Plasmodium falciparum. *Nature*, 424:957–961.

Ferguson, H. M., & Read, A. F. (2004). Mosquito appetite for blood is stimulated by Plasmodium chabaudi infections in themselves and their vertebrate hosts. *Malaria Journal*, 3:12.

Floren, L., Washburn, M. P., Raine, J. D., & otros. (2002). A proteomic view of the Plasmodium falciparum life cycle. *Nature*, 419:520-526.

Folch, J., Lee, M., & Stanley, G. S. (1957). A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J. Biol. Chem.*

Foldvari, M., Gesztes, A., & Mezei, M. (1990). Dermal drug delivery by liposome encapsulation: clinical and electron microscopic studies. *J. Microencapsulation*, 7(4):479-89.

Gabizon, A., Tzemach, D., Mack, L., Bronstein, M., & Horowitz, A. (1988). Dose dependency of pharmacokinetics and therapeutic efficacy of pegylated liposomal Doxorubicin (DOXIL) in murine models. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 85(18) 6949-6953.

Giao, P., & Vries, P. (2001). Pharmacokinetic interactions of antimalarial agents. *Clin. Pharmacokinet.*, 40:343-373.

Gollapudi, B., & McFadden, L. (1995). Sample size for the estimation of polychromatic to normachromaticerythrocyteratio in the bone marrow micronucleus test. *Mut. Res.*, 347, 97-99.

Gonzales, G., Piorno, M. C., Huerta, J., & Alvarez, F. (2008). Diagnóstico del déficit de hierro en pacientes ambulatorios debido al mal uso y a las limitaciones de los marcadores bioquímicos: utilidad del contenido de hemoglobina del reticulocito. *An. Med. Interna*, 98-99.

Good, M. F., & Doolan, D. L. (2007). Malaria's journey through the lymph node. *Nature Medicine*, 13:1023-1024.

Greenwood, B. M., Fidock, D. A., Kyle, D. E., Kappe, S. H., Alonso, P. L., Collins, F. H., y otros. (2008). Malaria: progress, perils, and prospects for eradication. *J. Clin. Invest.*, 118:1266-1276.

Griffiths, A., Suzuki, D., Millar, J., Lewontin, R., & Gelbart, W. (2002). *Genética (7ª ed.)*. Barcelona: Interamericana/McGraw-Hill.

Hofland, H., Bouwstra, J., Panec, M., Boddé, H., & otros. (1991). Interactions of non-ionic surfactant vesicles with cultured keratinocytes and human skin in vitro: a survey of toxicological aspects and ultrastructural changes in stratum corneum. *J Controlled Release*, 16:155-68.

Joan Lluís Vives Corrons, J. L. (2006). *Manual de técnicas de laboratorio en Hematología (3ª ed)*. España: Elsevier.

Joy, D., Feng, X., & Mu, J. (2003). Early origin and recent expansion of Plasmodium falciparum. *Science*, 318-321.

Karl-Heinz, Hull, R., Morton, D., Pfister, R., Rabemampianina, Y., Smith, D., y otros. (2001). A good practice guide to the administration of substances and removal of blood, including routes and volumes. *Appl Toxicol*, 21: 15-23.

Kebaier, Voza, & Vanderberg. (2009). Kinetics of Mosquito-Injected Plasmodium Sporozoites in Mice: Fewer Sporozoites Are Injected into Sporozoite-Immunized Mice. *PLoS Pathog.*

Klayman. (1985). Quinchaosu: an antimalarial drug from China. *Science*, 228, 1049-1055.

Lanoia, M., M.C.Luzardo, Labordea, R., & otros. (2009). Las vesículas liposomales: obtención, propiedades y aplicaciones potenciales en la biomedicina. *Revista Cubana de Física*, 26(1): 23-30.

Lasic. (1993). Liposomes from physics to applications. Elsevier, Elsevier.

Lew, V. L., Tiffert, T., & Ginsburg, H. (2003). Excess hemoglobin digestion and the osmotic stability of Plasmodium falciparum-infected red blood. *Cells.Blood*, 101(10):4189-4194.

Lothar, T. (1998). *Clinical Laboratory Diagnostics: Use and assessment of clinical laboratory results*. TH-Books.

Maistro, E., Aquino, I., & Perazzo, F. F. (2011). Genotoxicity assessment of the antimalarial compound artesunate in somatic cells of mice. *Elsevier*, 49(6):1335-9.

Mayera, G., Cofiea, J., Jiangb, L., Hartlc, D. L., Tracya, E., Kabatd, J., y otros. (2009). Glycophorin B is the erythrocyte receptor of Plasmodium falciparum erythrocyte-binding ligand, EBL-1. *PNAS*, 106(13):5348–5352.

McGready, R., Cho, T., Cho, J., & otros. (1998). Artemisinin derivatives in the treatment of falciparum malaria in pregnancy. *Trans. R. Soc. Trop. Med.*, 92:430–433.

Meshnick, S. (2001). Artemisinin and its derivatives. In, *Antimalarial Chemotherapy: Mechanisms of Action, Resistance, and New Directions in Drug Discovery*. NJ, 191-201.

Mortom, Jennings, Beckwell, Ewbank, Godfrey, Holgayte, y otros. (2001). Refining procedures for the administration of substances. Report of the BVAAWF/ FRAME/ RSPCA/ UFAW joint working group on refinement. *Laboratory Animals*, 1-41.

Münter, S., Sabass, B., Selhuber-Unke, C., & otros. (2009). Plasmodium Sporozoite Motility Is Modulated by the Turnover of Discrete Adhesion SitesCell. *Host & Microbe*, 6(17):551-562.

Naitza, S., Spano, F., Robson, K., & Cristanti, U. (1998). The thrombospondin-related protein family of apicomplexan parasites: The Gears of the cell invasion machinery. *ELSEVIER*, 14(12): 479-484.

Newton, P., Dondorp, A., Green, M., & otros. (2003b). Counterfeit artesunate antimalarials. *Lancet*, 362:369.

O'Neill, P., & Posner, G. (2004). A medicinal chemistry perspective on artemisinin and related endoperoxides. *J. Med. Chem.*, 47:2945-2964.

O'Neil, M. J., & Heckelman, P. E. (2013). *The Merck Index: An Encyclopedia of Chemicals, Drugs, and Biologicals, 15th edition*. Cambridge: Medicine & Health Science Books.

*Organic chemistry portal*. (s.f.). Recuperado el 2011, de <http://www.organic-chemistry.org/>

Ornatsky, O., Bandura, D., Baranov, V., Nitz, M., Winnik, M. A., & Tanner, S. (2010). Highly multiparametric analysis by máss cytometry. *Journal of Immunological Methods*, 361 (1–2): pp. 1–20.

Rieckman, K., Sax, L., Campbell, G., & Mrema, J. (1978). Drug sensivity of plasmodium falciparum an in vitro microtechnique. *Lancet*, 22-23.

Rodak, & Bernadette, F. (2005). *Hematología: fundamentos y aplicaciones clínicas*. Madrid: Panamericana.

Rosefort, C., Fauth, E., & Zankl, H. (2004). Micronuclei induced by aneugens and clastogens in mononucleate and binucleate cells using cytokinesis block assay. *Mutagenesis*, 19, pp. 277-284.

Rowe, R. C., Sheskey, P. J., & Quinn, M. E. (2009). *Handbook of Pharmaceutical Excipients*. EEUU: Pharmaceutical Press.

Ruiz, L., Valero, R., & Vidal, J. (1995). *Excipientes básicos en formulación magistral*. ALicante: Colegio Oficial de Farmacéuticos.

S. Yalaoui, T. H. (2008). Receptor BI boosts hepatocyte permissiveness to plamodium infection. *Cell. Press*, 4 (11): 283-292.

- Schmid, W. (1975). The micronucleus test . *Mut. Res.* 31, 9-15.
- Schwartz, L., Graham, V., Genton, B., & Moorthy, V. (2012). A review of malarie vaccine clinical projects based on the WHO rainbow table. *Malaria journal*, 11 (11), 1-22.
- Science, American Association for Laboratory Animal. (2014). <http://www.aalas.org>. Recuperado el 2011, de AALAS: <http://www.aalas.org>
- Sicardi, S., Martiarena, J., & Iglesias, M. (1991). Mutagenic and analgesic activities of Aniline derivatives. *J. Pharm. Sci.*, 80, 761-764.
- Silvie, O., Mota, M. M., Matuschewski, K., & Prudêncio, M. (2008). Interactions of the malaria parasite and its mammalian host. *Current Opinion in Microbiology*, 11:352–359.
- Taylor, W., & White, N. (2004). Antimalarial drug toxicity. *A review. Drug*, 27:25-61.
- Tolbert, P., Shy, C., & Allen, J. (1992). Micronuclei and other nuclear anomalies in buccal smears: methods development. *Mutat. Res.*, 271(1):69-77.
- Torchilin, V., & V.Weissig. (2003). *Liposomes 2nd ed.*, Oxford University Press.
- Torelló, M., Viscasillas, A., & Del Pozo, A. (2002). Liposomas. Conceptos Generales y Relación con las Estructuras Cutáneas. Unidad de Tecnología Farmacéutica. *Facultad de Farmacia. Universidad de Barcelona*, 21(9): 188-190.
- Trager, & Jensen. (1976). In vitro cultivation of Plasmodium falciparum.
- Utzinger, J., Keiser, J., Shuhua, X., & otros. (2003). Combination chemotherapy of schistosomiasis in laboratory studies and clinical trials. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 47:1487–1495.
- Vaidya, A., & Mather, M. (2009). Mitochondrial evolution and functions in malaria parasites. *Annu Rev Microbiol.*, 63:249-67.
- Vaughan, A. M., Aly, A. S., & Kappe, S. H. (2008). Malaria parasite pre-erythrocytic stage infection: Gliding and Hiding. *Cell Host Microbe*, 4(3):209–218.
- Vaughan, A. M., Aly, A. S., & Kappe, S. H. (2008). Malaria parasite pre-erythrocytic stage infection: Gliding and Hiding. *Cell Host Microbe*, 4(3):209–218.
- Wagle, S. (2011). *Medscape*. Recuperado el 2013, de <http://emedicine.medscape.com/article/974349-overview>
- Walters, M., & Abelson, H. (1996). Interpretation of the complete blood count. *Pediatr Clin North Am*, 43:599.
- White. (1997). Assessment of the pharmacodynamic properties of antimalarial drugs in vivo. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 41 (7): 1413–1422.
- White, N. (1997). Assessment of the pharmacodynamic properties of antimalarial. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 41:1413–1422.
- WHO. (2013). *Informe mundial sobre el paludismo*. Ginebra: WHO Library Cataloguing-in-Publication Data.
- Wiley, J., & Sons. (2009). <http://www.thecochranelibrary.com/>. Recuperado el 2014
- Woodrow, C., Haynes, R., & Krishna, S. (2005). Artemisinins. *Postgrad. Med.*, J.81, 71-78.
- Zalacaín, M., Sierrasesúмага, L., & Patiño, A. (2005). El ensayo de micronúcleos como medida de inestabilidad genética inducida por agentes genotóxicos. (2),28.

Zúñiga, G., Gomez, M., Zamora, P., Ramos, I., Batista, G., González, R., y otros. (2002). Especies exóticas con micronúcleos espontáneos: alternativa para estudios de genotoxicidad. *Nowet*, 1, 5-9.



