

SUSCEPTIBILIDAD *in vitro* DE MUESTRAS CLÍNICAS COLOMBIANAS DE *Plasmodium falciparum* A TRES ESTEROIDES DE LA PLANTA *Solanum nudum* DUNAL (SOLANACEAE)

In vitro SUSCEPTIBILITY OF COLOMBIAN *Plasmodium falciparum* ISOLATES TO THREE *Solanum nudum* DUNAL (SOLANACEAE) STEROIDS

Eliana M. ARANGO F.¹, Jaime CARMONA F.¹, Silvia BLAIR T.^{1*}

Recibido: Agosto 15 de 2007 Aceptado: Enero 22 de 2008

RESUMEN

Solanum nudum es usada en Tumaco (Nariño, Colombia) para el tratamiento de la fiebre. Varios compuestos esteroideos obtenidos de esta planta han mostrado actividad antiplasmodial y bajo potencial tóxico. En este estudio se evaluó la susceptibilidad de aislamientos (muestras clínicas) de *Plasmodium falciparum* procedentes de distintas regiones colombianas a los esteroideos solanáceos SN-1, SN-2 y SN-4. Los aislamientos se obtuvieron de pacientes con infección única por *P. falciparum* y fueron adaptados a cultivo *in vitro*. Las cepas FCB2 (cloroquina-resistente) y NF54 (cloroquina-sensible) se usaron como controles. Se utilizó la técnica HRP2 y se evaluaron siete diluciones dobles seriadas de cada esteroide. En total se evaluaron 21 aislamientos y las concentraciones inhibitorias 50% (IC₅₀) promedio obtenidas con SN-1, SN-2 y SN-4 fueron 28,3; 175,1 y 41,8 μ M, respectivamente. La sensibilidad de las dos cepas a SN-1 fue similar; la mayoría de los aislamientos presentaron IC₅₀ a SN-1 y SN-2 significativamente menores a las de la cepa cloroquina-resistente y las IC₅₀ de SN-2 y SN-4 no mostraron diferencias significativas entre los aislamientos sensibles a todos los antimaláricos y los resistentes a uno, dos o más antimaláricos. Los datos sugieren que estos esteroideos son activos tanto sobre parásitos sensibles como resistentes a diferentes medicamentos.

Palabras clave: *Plasmodium falciparum*, malaria, productos naturales, esteroide, solanáceos, Colombia

ABSTRACT

Solanum nudum is used by Tumaco (Nariño, Colombia) inhabitants to treat fevers. Compounds isolated from the plant showed antimalarial activity in different models and low toxic potential. Our aim was to measure the *in vitro* susceptibility of *Plasmodium falciparum* isolates, from different Colombian municipalities, to the steroids SN-1, SN-2 and SN-4 of *S. nudum*. The isolates were obtained from patients with single *P. falciparum* infection and were adapted to *in vitro* culture. Seven two-fold doses were evaluated using HRP2 method. Controls included FCB2 (Chloroquine-resistant) and NF54 (Chloroquine-sensitive) strains. A total of 21 clinical isolates were evaluated. The mean IC₅₀ for steroids SN-1, SN-2 and SN-4 were 28.3; 175.1; 41.8 μ M, respectively. Both laboratory strains displayed similar sensitivity to SN-1; the most of isolates showed IC₅₀ for SN-1 and SN-2 significantly lower than the chloroquine-resistant strain;

1 Grupo Malaria. Universidad de Antioquia, Calle 62 # 52-59. Torre 1. Laboratorio 610, Sede de Investigación Universitaria, Telefax: 219 64 87, malaria@quimbaya.udea.edu.co

* Autor a quien se debe dirigir la correspondencia: sblair@quimbaya.udea.edu.co

and the IC_{50} for SN-2 and SN-4 were not different between the isolates sensitive to all antimalarial and those resistant to one, two or more antimalarial drugs. These data suggest that these steroids are active against sensitive and resistant parasites to different antimalarial drugs.

Key words: *Plasmodium falciparum*, malaria, biological products, steroid, solanaceous, Colombia

INTRODUCCIÓN

Plasmodium falciparum, la especie responsable del mayor número de complicaciones y de muertes por malaria, ha desarrollado resistencia a gran parte de los antimaláricos utilizados actualmente, lo que hace necesaria la búsqueda de nuevas alternativas de tratamiento (1). Las plantas empleadas por la medicina tradicional han constituido una de las principales fuentes de medicamentos y han servido de cabeza de serie para la síntesis de antimaláricos como las quinolinas y las artemisininas (2). La planta *Solanum*

nudum Dunal (*Solanaceae*) es una de las que, según informes, usan los curanderos de la región de Tumaco (Nariño, en la costa Pacífica colombiana) para el tratamiento de las fiebres, entre ellas las asociadas al paludismo. Los extractos acuoso y metanólico de hojas y tallos de esta planta presentaron actividad sobre estadios eritrocíticos de cepas de *P. falciparum* y con el estudio de los metabolitos secundarios de estos extractos se obtuvieron seis moléculas, cinco esteroides —que se denominaron SN-1, SN-2, SN-3, SN-4 y SN-5— y la sapogenina diosgenona (3, 4) (Véase figura 1).

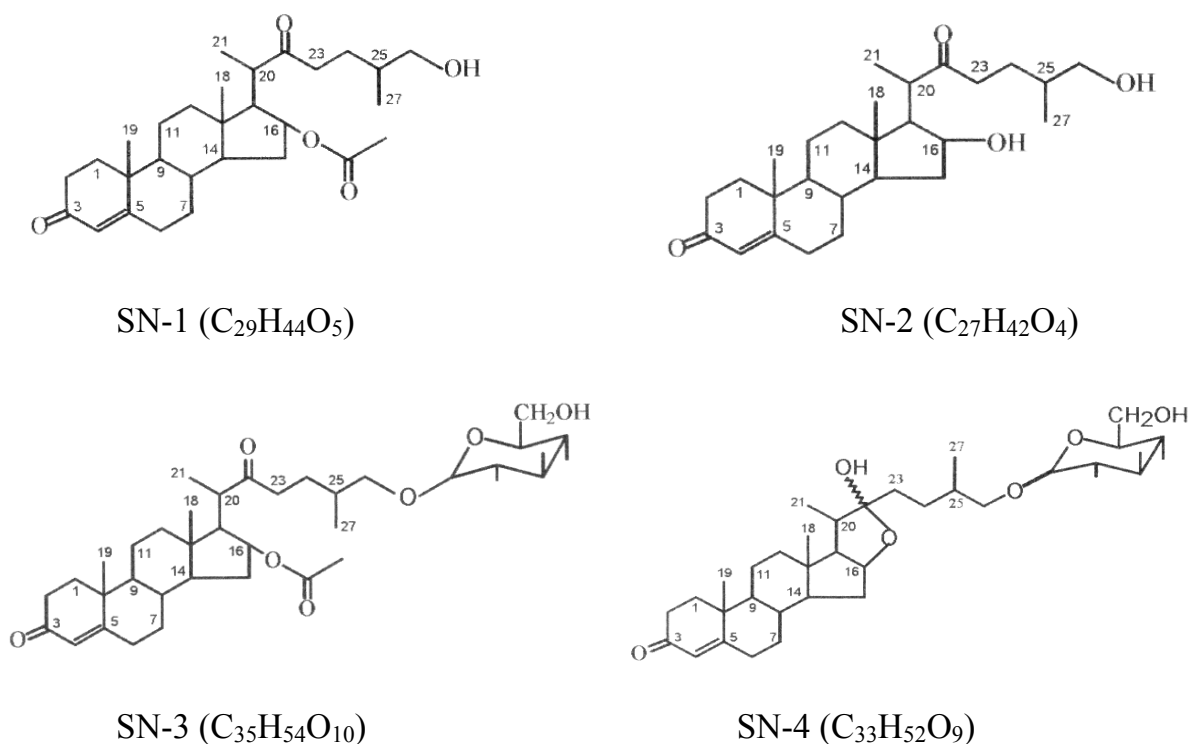


Figura 1. Estructura molecular de los esteroides aislados de la planta *S. nudum*

Cuando se evaluó la actividad de los compuestos SN-1, SN-2, SN-3, SN-4 y diosgenona sobre cultivos eritrocíticos de la cepa FCB2 (cloroquina-resistente) de *P. falciparum*, las concentraciones inhibitorias 50% (IC_{50}) obtenidas fueron 21; 125,5; 63,1; 57,4 y 21,8 μM , respectivamente (5). Además, el tratamiento de ratones infectados con *P. berghei*

con diosgenona (20 mg/kg de peso) o con SN-3 (200 mg/kg de peso) disminuyó la parasitemia en 37% y 84%, en su orden (6). También se encontró que los esteroides SN-2 y SN-4 disminuyeron en 47% y 39%, respectivamente, la invasión de esporozoítos de *P. vivax* a células HepG2 (7), y el esteroide SN-2 disminuyó tanto el porcentaje de

mosquitos *Anopheles albimanus* infectados con *P. vivax* como la cantidad de ooquistes observados en dichos mosquitos (8). Por otro lado, la evaluación de la actividad clastogénica con la prueba de micronúcelos en médula ósea de ratón y de la actividad mutagénica con la prueba de Ames de los extractos acuoso, hexánico, metanólico y diclorometánico y de la diosgenona, mostró resultados negativos (9, 10); también fueron negativas las pruebas de citotoxicidad realizadas mediante la técnica de MTT, con los compuestos SN-1, SN-2, SN-3, SN-4 y SN-5 sobre la línea celular HepG2 (7).

Los métodos tradicionalmente usados para evaluar la susceptibilidad *in vitro* de *P. falciparum* (cepas de laboratorio y aislamientos o muestras clínicas) a medicamentos antimaláricos, así como a compuestos en experimentación, son el de Rieckmann o Mark III (microscópico) y el Radioisotópico (11, 12); sin embargo, el método HRP2, que se basa en la detección de la proteína rica en histidina II de *P. falciparum* (PfHRP-II) mediante un ensayo inmunoenzimático (ELISA), es fácil de ejecutar, no requiere equipos ni material muy especializados, es altamente reproducible y tiene sensibilidad similar al método microscópico (13, 14, 15).

El objetivo de este trabajo fue evaluar, con el método HRP2, la actividad de los compuestos SN-1, SN-2 y SN-4 de la planta *S. nudum* sobre aislamientos de *P. falciparum* procedentes de diferentes regiones colombianas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Obtención y preparación de los esteroides de *S. nudum*: el material pulverizado de hojas y tallos de la planta *S. nudum*, recolectada en Tumaco (Nariño), se sometió al proceso de extracción estandarizado por el Grupo de Química de Plantas Colombianas (5). En resumen, se sometió el material a extracción por percolación hasta agotamiento con éter de petróleo, diclorometano y acetato de etilo. Posteriormente, los extractos obtenidos se fraccionaron por cromatografía de columna con mezclas de menor a mayor polaridad y las fracciones colectadas se evaluaron por cromatografía de capa fina (CCF), con el uso como eluyente de CH_2Cl_2 : MeOH : DEA 21 mL:2 mL:5 gotas y las placas se revelan con H_2SO_4 al 70% y calor. Este procedimiento se repitió hasta obtener fracciones enriquecidas en cada esteroide, los cuales se purificaron con cromatografía en capa preparativa. La verificación

estructural de los esteroides se hizo con resonancia magnética nuclear de protón (RMN- ^1H). Debido a que los esteroides son insolubles en agua y en otros solventes en concentraciones no tóxicas, fueron tratados con polivinilpirrolidona 10000 mw (PVP-10) (Sigma), en una proporción de 4 partes de PVP-10 por cada parte de esteroide, para hacer copolímeros solubles en agua. Estudios previos han demostrado que PVP-10, en esas concentraciones y formas de uso, no presenta efecto antiplasmodial (5, 7).

Obtención, preparación y procesamiento de las muestras de sangre: a pacientes que consultaron en los puestos de diagnóstico de malaria de los municipios de Turbo y Necoclí (Urabá antioqueño) o en el laboratorio del Grupo Malaria (Medellín), y se les diagnosticó infección única por *P. falciparum*, con parasitemia ≥ 1000 anillos/ μL de sangre y que no hubiesen tomado antimaláricos en las últimas dos semanas, se les informó del objetivo del estudio y posterior a la aceptación voluntaria de su participación y a la firma del consentimiento informado (aprobado por el Comité de Ética del Centro de Investigaciones Médicas, Facultad de Medicina, Universidad de Antioquia), se les diligenció una encuesta y se les tomó una muestra de 5 mL de sangre, por venopunción en el antebrazo, en tubo con EDTA.

Las muestras se mezclaron con 5 mL de medio incompleto (RPMI 1640 [Sigma] con suplemento de hepes 25 mM [Sigma]; hipoxantina 0,2 mM [Sigma]; dextrosa 11 mM [ICN]; L-glutamina 3,42 mM [Sigma] y gentamicina 16 $\mu\text{g}/\text{mL}$ [ICN]) y se refrigeraron a 4 °C hasta su posterior procesamiento, el cual se realizó durante las 48 horas siguientes a la recolección. Las muestras tomadas fuera de Medellín se transportaron refrigeradas hasta el laboratorio del Grupo Malaria en un tiempo máximo de 48 horas.

La mezcla sangre-medio fue centrifugada a 2000 rpm durante 10 minutos, se descartaron el plasma, el medio y la capa de glóbulos blancos y el paquete de glóbulos rojos parasitados (GRP) se lavó dos veces por centrifugación, con medio incompleto. Del paquete GRP se tomaron 250 μL y se mezclaron con 250 μL de glóbulos rojos sanos (A+) y 9,5 mL de medio completo (medio incompleto con suplemento de NaHCO_3 21,6 mM [J.T. Baker]; glutatión reducido 0,86 $\mu\text{g}/\text{mL}$ [ICN] y suero humano inactivado A+ 10%), luego se incubó a 37 °C con atmósfera de 5% de CO_2 , 5% O_2 y 90% N_2 .

Cultivo de cepas y aislamientos: se usaron las cepas FCB2 (cloroquina-resistente) y NF54 (cloroquina-sensible) como controles para comparar con el comportamiento de los aislamientos. Tanto las cepas como los aislamientos se mantuvieron con hematocrito de 5% con glóbulos rojos A+ y medio completo y con incubación a 37 °C con atmósfera de 5% de CO₂, 5% O₂ y 90% N₂. Se realizó cambio de medio diariamente y se adicionaron glóbulos rojos frescos dos veces por semana (16, 17). Se consideró que los aislamientos estaban adaptados a las condiciones de cultivo *in vitro* cuando se logró una parasitemia $\geq 2\%$. Para realizar las pruebas de susceptibilidad, los cultivos (cepas y aislamientos) se sincronizaron en anillos con la técnica de sorbitol al 5% (16) y luego se diluyeron a una parasitemia de 0,05% y un hematocrito de 1,5% con glóbulos rojos sanos (A+) y medio completo (18, 19).

Predosificación de platos: se usaron microplatos de 96 pozos de fondo plano marca Falcon (Becton Dickinson Labware). Se evaluaron siete dosis dobles seriadas, por duplicado, de cada esteroide y las dosis se definieron según las IC₅₀ reportadas previamente con el método radioisotópico (5), así; SN-1: 1,3 a 84,0 μM ; SN-2: 7,8 a 502,0 μM ; SN-4: 1,8 a 114,8 μM . Se preparó una solución madre de 2 mg/mL con agua desionizada estéril de cada compuesto y posteriormente se prepararon las diluciones seriadas y se distribuyeron 25 μL de cada dilución por duplicado en los microplatos. En los pozos que correspondían a los controles sin tratamiento se distribuyeron 25 μL de agua desionizada estéril. Finalmente, los microplatos se dejaron en la cámara de flujo laminar durante toda la noche con el fin de evaporar el solvente y se almacenaron protegidos de la luz y refrigerados máximo por 5 días (19).

Prueba HRP2: los microplatos de ELISA (microplatos de 96 pozos con fondo en U y de alta fijación [Greiner Bio-One]) se sensibilizaron según los protocolos publicados por Noedl y colaboradores (19) y se almacenaron a -20 °C.

De la suspensión de GRP (cultivo de cepas o aislamientos sincronizado en anillos con parasitemia de 0,05% y hematocrito de 1,5%) se distribuyeron 200 μL por pozo en un microplato predosificado con los esteroides y se incubó durante 72 horas a 37 °C en atmósfera de 5% CO₂, 5% O₂ y 90% N₂. Después de las primeras 24 horas de incubación se preparó un extendido de uno de los pozos control, para determinar si había un adecuado crecimiento

de los parásitos. Después de las 72 horas de incubación se determinó la parasitemia de uno de los pozos control, se sometieron los platos a congelación y descongelación por calor a 37 °C dos veces, para obtener una hemólisis completa y luego se almacenaron a -20 °C. Teniendo en cuenta la parasitemia obtenida en los pozos control después de las 72 horas de incubación, se diluyeron, con agua destilada, todos los pozos hemolizados de tal manera que quedara una parasitemia de 0,02% en el control. De estas diluciones se distribuyeron 100 μL /pozo en los platos de ELISA sensibilizados con el anticuerpo primario, se incubó por una hora en temperatura ambiente en cámara húmeda y luego se lavó tres veces. Posteriormente se diluyó el anticuerpo secundario (MPFG-55P, ICL) a 0,05 $\mu\text{g}/\text{mL}$ en una solución de PBS al 2% de BSA y 1% de Tween-20, se transfirieron 100 μL a cada pozo, se incubó durante 1 hora en temperatura ambiente en cámara húmeda y de nuevo se lavó. Luego se adicionaron 100 μL /pozo de 3,3',5,5'-Tetrametilbenzidina (TMB Single Solution Chromogen/Substrate; Zymed Laboratorios, Inc), se incubó durante 10 minutos en temperatura ambiente y en oscuridad, se adicionaron 50 μL de solución de parada (ácido sulfúrico 1 M) y se determinó la densidad óptica (DO) con filtro de 450 nm en lector de microplatos Bio-Rad 680 (Bio-Rad Laboratories, Inc, USA).

Análisis estadístico: se construyó una base de datos en Excel® y en EpiInfo 6,0. El programa HN-NonLin se usó para calcular la IC₅₀; ese programa fue diseñado en una hoja de cálculo de Excel® y hace análisis de regresión no lineal con un modelo de regresión polinomial (19). Se usó la prueba no paramétrica de Kruskal & Wallis para evaluar las diferencias entre las IC₅₀ obtenidas con cada tratamiento en función de la edad, la parasitemia, la etnia, el tiempo de residencia en zona malárica y los antecedentes de malaria por *P. falciparum*. Una probabilidad menor de 0,05 se consideró estadísticamente significativa.

RESULTADOS

En total se evaluaron 21 aislamientos, de estos, 76% provinieron del departamento de Antioquia (67% de Urabá [14/21] y 9% del Bajo Cauca [2/21]) y 24% de la región del Pacífico en los departamentos de Chocó (4/21) y Nariño (1/21). Las características generales de los pacientes se muestran en la tabla 1.

Tabla 1. Datos generales de los pacientes

Edad (promedio \pm desviación estándar)	31 \pm 19 años
Sexo masculino	86%
Etnia (mestizos – negros – indígenas)	69% – 25% – 6%
Parasitemia (promedio [mínimo – máximo])	19040 anillos/ μ L (1800 – 195520)
Años de residencia en zona malárica (<1; 1-5; >5)	25% – 25% – 50%

Adaptación de aislamientos a cultivo *in vitro*: el tiempo requerido para que el cultivo de los aislamientos alcanzara una parasitemia $\geq 2\%$ fue de $13 \pm 8,6$ días (promedio \pm desviación estándar) y varió entre 3 y 30 días. Se encontró asociación estadísticamente significativa ($p=0,018$) entre la parasitemia inicial y el tiempo requerido para alcanzar $\geq 2\%$ de parasitemia: los aislamientos que tardaron ≤ 10 días para alcanzar en cultivo dicha parasitemia ($n=10$) tuvieron 31272 ± 58273 anillos/ μ L (promedio \pm desviación estándar) al comienzo, mientras que aquellos que tardaron >10 días para alcanzar ese valor ($n=11$) presentaron parasitemia inicial menor (7405 ± 7241 anillos/ μ L).

Susceptibilidad de las cepas de laboratorio a los esteroides de *S. nudum*: con la misma metodología usada para evaluar los aislamientos, se evaluaron las cepas NF54 (cloroquina-sensible) y FCB2 (cloroquina-resistente). En la tabla 2 se presentan las IC_{50} obtenidas con cada esteroide en cada cepa. Aunque la IC_{50} de SN-1 fue más baja para la cepa NF54, los intervalos de confianza (IC95%) muestran que la sensibilidad de ambas cepas frente a este esteroide fue similar. En el caso de SN-2 se encontró que la cepa NF54 fue más sensible y con SN-4 sucedió lo contrario: la cepa FCB2 fue más sensible que la NF54 (Véase tabla 2).

Tabla 2. Susceptibilidad de las cepas a los esteroides

Tratamiento	IC_{50} (μ M [IC95%*])	
	Cepa NF54	Cepa FCB2
SN-1	24,23 (10,66 - 43,04)	32,34 (29,84 - 35,82)
SN-2	92,41 (72,48 -120,05)	227,97 (207,91 - 255,77)
SN-4	29,90 (28,30 - 32,11)	22,29 (19,45 - 26,24)
Cloroquina	0,06 (0,05 - 0,07)	0,22 (0,22 - 0,23)

* Intervalo de confianza de 95%

Susceptibilidad de los aislamientos a los esteroides de *S. nudum*: el crecimiento de los 21 aislamientos durante las 72 horas de incubación de la prueba de susceptibilidad fue adecuado. La parasitemia a las 24 horas fue $0,09\% \pm 0,05$ (promedio \pm desviación estándar) y la parasitemia a las 72 horas fue $0,2\% \pm 0,09$.

En la tabla 3 se muestra la IC_{50} promedio obtenida para cada esteroide en los 21 aislamientos.

Al comparar la acción de los esteroides sobre los aislamientos y sobre las cepas de laboratorio, se observó que más de la mitad de los aislamientos (11/21, 52%) presentaron IC_{50} a SN-1 significativamente más baja que la hallada con la cepa resistente a cloroquina FCB2; 14 (67%) aislamientos mostraron IC_{50} a SN-2 significativamente inferior a la obtenida con dicha cepa y para SN-4 esta característica se observó en 7 (10%) aislamientos.

Tabla 3. Susceptibilidad de los aislamientos a los esteroides

Tratamiento	IC_{50} (μ M)			
	Media	IC95%*	Mínimo	Máximo
SN-1	28,26	22,82 - 33,69	5,30	48,96
SN-2	175,11	136,77 - 213,46	61,30	344,72
SN-4	41,75	28,82 - 54,68	12,48	135,99
Cloroquina	0,42	0,26 - 0,58	0,030	1,25

*Intervalo de confianza de 95%

Cuando se compararon las IC_{50} obtenidas con cada tratamiento, con relación a la edad, la parasitemia inicial, la etnia, la procedencia, el tiempo de residencia en zona malárica y los antecedentes de malaria por *P. falciparum*, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas.

DISCUSIÓN

La técnica HRP2 ha sido usada principalmente para evaluar la susceptibilidad de *P. falciparum* a los medicamentos antimaláricos estándares; sin embargo, con este trabajo se muestra que también es útil para evaluar compuestos de origen natural o sintético. Aunque las IC_{50} encontradas en este estudio para los tres esteroides sobre la cepa FCB2 no son iguales a las reportadas en 2002 con el método radioisotópico (5), lo cual es de esperarse por las condiciones experimentales de cada estudio, se observó la misma tendencia en la actividad de los compuestos, es decir, los compuestos SN-1 y SN-4 fueron más activos (IC_{50} más baja) que el compuesto SN-2 y esto se cumplió tanto con las dos cepas de laboratorio como con los aislamientos.

Otros autores también han encontrado diferencias entre las IC_{50} obtenidas con diferentes técnicas para los mismo tratamientos. Noedl y colaboradores obtuvieron para cloroquina con el método radioisotópico una IC_{50} promedio de 117,98 nM (IC95%: 97,32-143,04) y con el método de Rieckmann de 221,28 nM (IC95%: 160,68-304,74) y en el caso del artesunato las IC_{50} fueron 2,82 nM (IC95%:

2,16-3,67) y 0,96 nM (IC95%: 0,82-1,13), con los dos métodos respectivamente (13). En otro estudio, se encontró una IC_{50} promedio para quinina de 541,73 nM (IC95%: 452,55-648,47) con el método radioisotópico, mientras que con el método HRP2 fue 295,19 nM (IC95%: 244,17-356,88) (20). Estas diferencias se explican porque cada técnica presenta condiciones experimentales distintas y usa métodos diferentes para medir el crecimiento de los parásitos y la inhibición causada por los tratamientos (13, 21).

A estos 21 aislamientos también se les evaluó la susceptibilidad a cloroquina, amodiaquina, mefloquina, quinina y artesunato (Arango *et al.*, en impresión) y para comparar la acción de los esteroides con los medicamentos, se subdividieron en tres grupos de acuerdo con la sensibilidad que presentaron a los antimaláricos. El grupo 1 se conformó con dos aislamientos (10%) que fueron sensibles a todos los medicamentos, el grupo 2 con once aislamientos (52%) que fueron resistentes a un solo medicamento y el grupo 3 con ocho aislamientos (38%) resistentes a dos o más medicamentos. Las IC_{50} de los esteroides SN-2 y SN-4 fueron similares en los tres grupos de aislamientos, mientras que con SN-1 se encontró una IC_{50} significativamente mayor en el grupo 3; sin embargo, es importante resaltar que las IC_{50} de este último compuesto presentan las desviaciones estándar más pequeñas, lo que sugiere que su acción es homogénea en todos los aislamientos y es independiente del tipo de aislamiento (Véase tabla 4).

Tabla 4. Susceptibilidad a esteroides de *S. nudum* vs. susceptibilidad a medicamentos antimaláricos

Grupo	n	IC_{50} (μ M[media \pm DE*])		
		SN-1	SN-2	SN-4
1: aislamientos sensibles a todos los antimaláricos	2	34,05 \pm 1,51	209,95 \pm 112,35	35,08 \pm 9,14
2: aislamientos resistentes a un antimalárico	11	20,12 \pm 9,50	145,51 \pm 67,71	44,01 \pm 35,87
3: aislamientos resistentes a 2 o más antimaláricos	8	38,00 \pm 10,52	207,11 \pm 108,24	40,32 \pm 27,19
p (Kruskall-Wallis)		0,007	0,371	0,797

* promedio \pm desviación estándar

A pesar de que las dos cepas de laboratorio evaluadas presentan diferente sensibilidad a la cloroquina (FCB2: cloroquina-resistente; NF54: cloroquina-sensible), su sensibilidad frente al compuesto SN-1 fue similar; además, más de la mitad de los aislamientos evaluados presentaron

IC_{50} a SN-1 y SN-2 significativamente menores a las obtenidas con la cepa cloroquina-resistente y las IC_{50} de los esteroides SN-2 y SN-4 no mostraron diferencias significativas entre los aislamientos que se clasificaron como sensibles a todos los antimaláricos y los que fueron resistentes a uno, dos o

más antimaláricos. Estos datos sugieren que estos compuestos solanáceos son activos tanto sobre parásitos sensibles como resistentes a diferentes medicamentos. Estudios previos de nuestro Grupo, que han tratado de establecer el mecanismo de acción de estos compuestos, han demostrado que los esteroides de *S. nudum* pueden modificar tanto la concentración total de glutatión en los glóbulos rojos parasitados con *P. falciparum* (Pabón *et al.*, manuscrito en preparación) como las vías de transporte inducidas en estas células (23).

FINANCIACIÓN

Este trabajo fue financiado por el Grupo Malaria de la Universidad de Antioquia.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a los doctores César Segura y Amanda Maestre la revisión del manuscrito.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. WHO (2004) Roll Back Malaria Partnership. www.rollbackmalaria.org: Última consulta en junio de 2005.
2. Bray PG, Ward SA, O'Neill PM. Quinolines and artemisinin: chemistry, biology and history. En: Sullivan DJ, Krishna S, editores. *Malaria: Drugs, Disease and Post-genomic Biology*. Alemania: Springer; 2005: 3-38.
3. Cardona W. Actividad antimalárica de componentes de la *Solanum nudum*. Medellín: Departamento de Química, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Antioquia; 1997.
4. Saez J, Cardona W, Espinal D, Blair S, Mesa J, Bocar M, et al. Five new steroids from *Solanum nudum*. *Tetrahedron* 1998; 54: 10771-8.
5. Pabón A, Carmona J, Maestre A, Camargo M, Blair S. Inhibition of *P. falciparum* by steroids isolated from *Solanum nudum*. *Phytother Res* 2002; 16: 59-62.
6. Echeverri M. Evaluación del efecto terapéutico de derivados de la planta *Solanum nudum* en ratones infectados con *Plasmodium berghei*. Medellín: Corporación Académica Ciencias Básicas Biomédicas, Universidad de Antioquia; 1999.
7. Londoño B, Arango E, Zapata C, Herrera S, Saez J, Blair S, et al. Effect of *Solanum nudum* Dunal (Solanaceae) steroids on hepatic trophozoites of *Plasmodium vivax*. *Phytother Res* 2006; 20: 267-73.
8. Arango E, Londoño B, Segura C, Solarte Y, Herrera S, Saez J, et al. Prevention of sporogony of *Plasmodium vivax* in *Anopheles albimanus* by steroids of *Solanum nudum* Dunal (Solanaceae). *Phytother Res* 2006; 20: 444-7.
9. Álvarez G, Pabón A, Carmona J, Blair S. Evaluation of clastogenic potential of the antimalarial plant *Solanum nudum*. *Phytother Res* 2004; 18: 845-8.
10. Pabón A, Blair S, Carmona J, Zuleta M, Saez J. Evaluation of the mutagenicity of antimalarial products isolated from *Solanum nudum* (Solanaceae). *Pharmazie* 2003; 58: 263-7.
11. Fidock DA, Rosenthal PJ, Croft SL, Brun R, Nwaka S. Antimalarial drug discovery: efficacy models for compound screening. *Nat Rev Drug Discov* 2004; 3: 509-20.
12. Noedl H, Wongsrichanalai C, Wernsdorfer WH. Malaria drug-sensitivity testing: new assays, new perspectives. *Trends Parasitol* 2003; 19: 175-81.
13. Noedl H, Wernsdorfer WH, Miller RS, Wongsrichanalai C. Histidine-rich protein II: a novel approach to malaria drug sensitivity testing. *Antimicrob Agents Chemother* 2002; 46: 1658-64.
14. Noedl H, Wernsdorfer WH, Kollaritsch H, Looareesuwan S, Miller RS, Wongsrichanalai C. Malaria drug-susceptibility testing. HRP2-based assays: current data, future perspectives. *Wien Klin Wochenschr* 2003; 115 Suppl 3: 23-7.
15. Noedl H, Attlmayr B, Wernsdorfer WH, Kollaritsch H, Miller RS. A histidine-rich protein 2-based malaria drug sensitivity assay for field use. *Am J Trop Med Hyg* 2004; 71: 711-4.
16. Ljungström I, Perlmann H, Schlichtherle M, Scherf A, Wahlgren M. *Methods in malaria research*. Manassas, Virginia: Malaria Research and Reference Reagent Resource Center; 2004.
17. Moreno C. Actividad antiplasmodial in vitro de plantas del género *Piper*. Medellín: Instituto de Biología, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Antioquia; 2005.
18. Noedl H, Bronnert J, Yingyuen K, Attlmayr B, Kollaritsch H, Fukuda M. Simple histidine-rich protein 2 double-site sandwich enzyme-linked immunosorbent assay for use in malaria drug sensitivity testing. *Antimicrob Agents Chemother* 2005; 49: 3575-7.
19. Noedl H. Malaria drug sensitivity testing. 2002. <http://malaria.farch.net>: Última consulta en marzo de 2006.
20. Attlmayr B, Kollaritsch H, Wernsdorfer WH, Miller RS, Sirichaisinthop J, Noedl H. Drug sensitivity of *Plasmodium falciparum* along the Thai-Myanmar border using the new field-deployable HRP2 in vitro assay. *Wien Klin Wochenschr* 2005; 117 Suppl 4: 35-8.
21. Noedl H, Wongsrichanalai C, Wernsdorfer WH. Malaria drug-sensitivity testing: new assays, new perspectives. *Trends Parasitol* 2003; 19: 175-81.
22. Ringwald P. Susceptibility of *Plasmodium falciparum* to antimalarial drugs. Report on global monitoring 1996-2004. Suiza: World Health Organization, 2005.
23. López, M. Estudio del efecto de los esteroides aislamientos de la planta *S. nudum* sobre la membrana del glóbulo rojo humano. Medellín: Corporación Académica Ciencias Básicas Biomédicas, Universidad de Antioquia; 2005.