

La biocristalización del heme como una potencial diana farmacológica en el desarrollo de fármacos para el tratamiento de la malaria

Giovanny Garavito*¹

Lucía Arteaga*

Lucía Acebey**

Resumen

La malaria continúa siendo una de las mayores causas de mortalidad a nivel mundial. Durante los últimos años la literatura especializada ha venido describiendo entre otras dianas farmacológicas, el proceso de biocristalización del heme debido a que representa para el parásito una importante vía de eliminación de este grupo (resultante de la digestión de la hemoglobina dentro de sus vacuolas ácidas). Como resultado de varios estudios conducentes al esclarecimiento de este proceso de biocristalización se ha establecido un modelo rápido de evaluación farmacológica *in vitro* para sustancias con actividad antimalárica. Este trabajo presenta una revisión sobre los aspectos más relevantes de este proceso biológico.

Palabras clave: Malaria – *Plasmodium spp* – Heme – β -hematina – Ferriprotoporfirina IX – Biocristalización del heme – Hemoglobina – Antimaláricos.

Summary

Haem biocrystallization as pharmacological potential target for development of antimalarial drugs

Malaria remains one of the leading causes of mortality in the world. During last years haem biocrystallization has been described in specialized publications because it represents for the parasite an important detoxification pathway of haem group (resulting of

Recibido para evaluación: Agosto de 2002
Aceptado para publicación: Octubre de 2002

* Universidad Nacional de Colombia, Facultad de Ciencias, Departamento de Farmacia, A.A. 14490, Bogotá, D. C., Colombia.

** Universidad Mayor de San Andrés, Facultad de Ciencias Farmacéuticas y Bioquímicas, Instituto de Investigaciones Fármaco Bioquímicas, La Paz, Bolivia.

1 E-mail: ggaravit@ciencias.unal.edu.co

the hemoglobin digestion inside acidic vacuoles). As a result of several studies conducted to understand this biocrystallization process a fast *in vitro* pharmacological model has been established to evaluate antimalarial drug activity. The current paper presents a review about relevant aspects of this biological process.

Key words: Malaria – *Plasmodium spp.* – Haem – β -hematin – Ferriprotoporphyrin IX – Haem biocrystallization – Hemoglobin – Antimalarics.

Introducción

La Malaria es una enfermedad de distribución universal, cuyas zonas de mayor prevalencia son las tropicales, subtropicales y templadas de Asia, África y América. De acuerdo con la O.M.S. se estima que 2.200 millones de personas habitan en más de 100 países donde la malaria es una enfermedad endémica, causando entre 300 y 500 millones de casos sintomáticos en el mundo, los cuales son la causa directa de entre uno y tres millones de muertes al año, especialmente de niños menores de 5 años de edad. Es una patología re-emergente en la actualidad ante el fracaso de las herramientas terapéuticas empleadas para su control y que afecta al 40% de la población mundial (1, 2, 3).

El 90% de los casos de paludismo se dan en países no industrializados como el nuestro, siendo esta enfermedad una de las principales causas de mortalidad infantil junto con la neumonía, la diarrea, el sarampión y la malnutrición. El continente americano cuenta con una población que asciende a 818 millones de habitantes, de los cuales el 36,5% vive en áreas propicias para la transmisión de la malaria; de los 35 países que conforman esta región, 21 reportan actualmente tener zonas con transmisión activa de malaria (1, 3, 4).

Durante los últimos 50 años las estrategias de control de la malaria se han dirigido contra el vector y el parásito con insecticidas y quimioterapia profiláctica y de tratamiento, pero a lo largo del tiempo como consecuencia de la resistencia desarrollada por ambos (vector y

parásito) se han hecho ineficaces estas medidas haciendo prioritario el desarrollo de nuevas alternativas terapéuticas necesarias para el control y erradicación de la malaria, especialmente en los países en desarrollo (1, 2).

La mayor parte del ciclo del parásito se da dentro de los eritrocitos, después de lo cual son liberados a la circulación miles de parásitos responsables de la patogénesis de la enfermedad. Así pues, la circulación es un lugar de elección para el desarrollo de medicamentos que puedan retirar de ella los parásitos y de esta manera controlar la enfermedad (fármacos esquizonticidas); durante esta fase del ciclo de vida del parásito la hemoglobina contenida en los eritrocitos representa su más importante fuente nutricional, los aminoácidos que el parásito deriva de la digestión de la hemoglobina son los bloques que emplea para la construcción de sus proteínas (5, 6, 7). Las funciones metabólicas relacionadas con la digestión de la hemoglobina por parte del parásito y su necesidad de eliminar el grupo heme residual biocristalizándolo son importantes dianas para el desarrollo de fármacos antimaláricos.

El parásito ingiere la hemoglobina por pinocitosis vía el citosoma y posteriormente la degrada dentro de sus vacuolas digestivas ácidas (pH 5.0-5.4), dentro de las cuales han sido caracterizadas en *P. falciparum*, dos aspartil proteasas, Plasmepsina I y Plasmepsina II, y una cisteín proteasa, la Falcipaína. La degradación de la hemoglobina es iniciada por la Plasmepsina I que hidroliza el enlace Phe33 α – Leu34 en

una región articular que parece ser vital para la integridad del tetrámero de la hemoglobina; una vez la molécula ha perdido su integridad, las Plasmepsinas (I y II) y la Falcipaina pueden romperla en otros lugares, al parecer la acción de estas proteasas en la vacuola digestiva del parásito da origen a pequeños péptidos más que a aminoácidos libres, finalmente fuera de la vacuola la acción de carboxipeptidasas da origen a aminoácidos individuales (Figura 1) (8 - 13).

Como no ha sido evidenciada actividad de exopeptidasas en la vacuola digestiva del parásito, se ha asumido que los péptidos generados traslocan al citosol, donde exopeptidasas citosólicas completan su digestión dando lugar a aminoácidos individuales que puedan ser empleados posteriormente para el crecimiento y maduración del parásito. Este proceso de digestión genera grandes cantidades de grupo heme (Figura 2a) el cual se autooxida a

hematina (Figura 2b) que debe ser liberada como desecho tóxico para el parásito, pues puede lisar su membrana o inhibir sus proteasas (5 - 8, 14).

El parásito elimina esta hematina, al menos en parte, convirtiéndola en una sustancia altamente insoluble conocida como hemozoína (pigmento malárico). Estudios de difracción de rayos X han demostrado que la hematina es química y estructuralmente idéntica al producto sintético ferriprotoporfirina IX (Fe(III)PPIX). Recientemente se ha demostrado que la β -hematina es un dímero cíclico cristalino de hematina (Figura 2c) (15 - 19).

Muchas propiedades de la hemozoína lo hacen un producto ideal de excreción para la detoxificación del grupo heme: es denso e insoluble en condiciones fisiológicas, y debido a su naturaleza cristalina no contribuye a generar radicales libres de oxígeno ni a la autooxidación

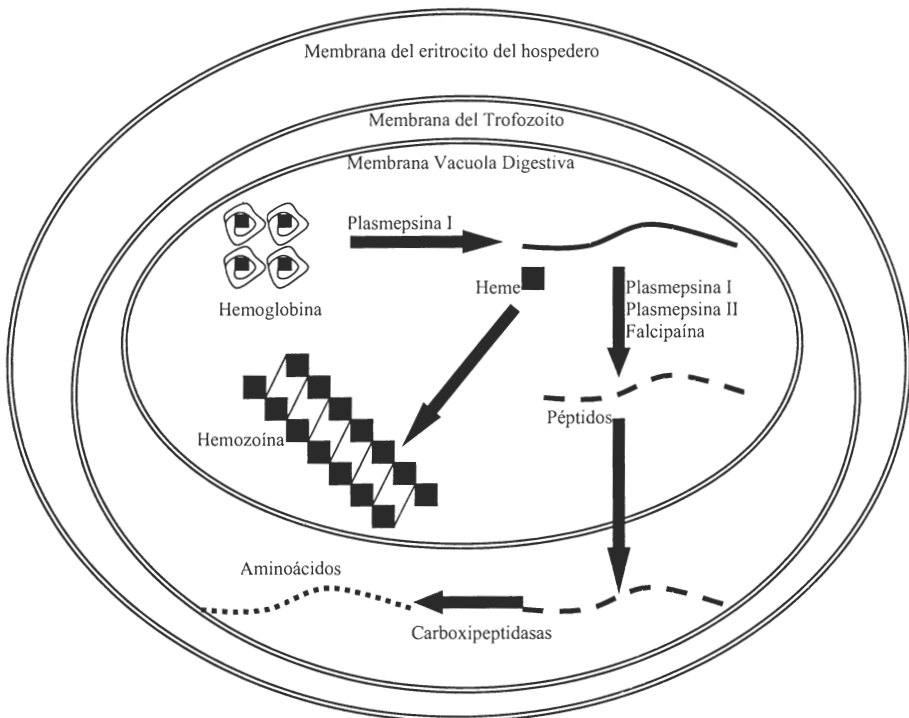
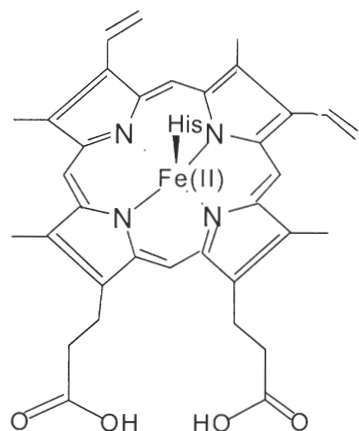
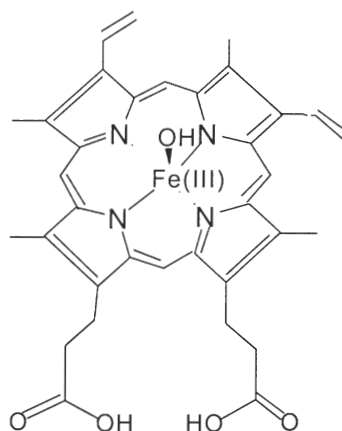


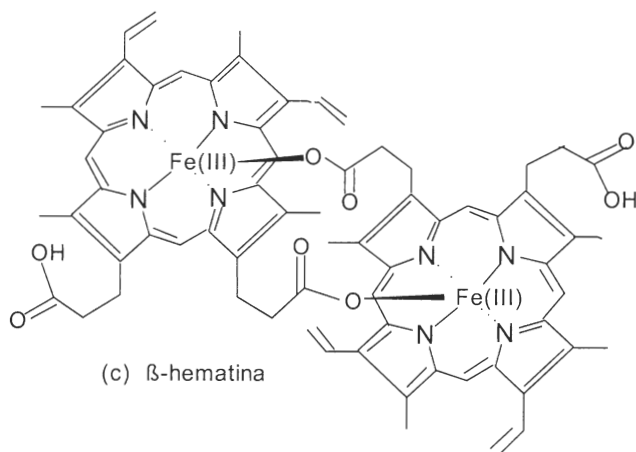
Figura 1. Digestión de la hemoglobina y formación de la Hemozoína (pigmento malárico).



(a) Grupo Heme



(b) Hematina (Hidroxiferriprotoporfirina IX)



(c) β -hematina

Figura 2. Estructuras moleculares de (a) Grupo Heme, (b) Hematina y (c) β -hematina.

perjudiciales para el parásito. Una vez que los esquizontes han madurado se da la ruptura del eritrocito, en ese momento son liberadas también a la sangre importantes cantidades de hemozoína las cuales son ingeridas por los macrófagos, proceso que los lesiona, disminuye su capacidad fagocítica y afecta su capacidad de respuesta ante cualquier infección, de la misma manera se constituye en un elemento de distracción de la respuesta inmune, alterando las vías de secreción de citoquinas (20-22). Se ha sugerido que la

acumulación de este pigmento malárico en las células endoteliales, después de repetidas infecciones de malaria, reduce los mecanismos locales de inflamación pudiendo facilitar el paso a otros tejidos, lo cual se asocia con la aparición de las formas severas de la enfermedad. La hemozoína se acumula en hígado y riñón del hospedero donde su concentración se incrementa con el progreso de la parasitemia (23).

Aún cuando actualmente existe discusión respecto a esta vía metabólica de detoxificación

del grupo heme y se han propuesto incluso hipótesis de degradación a través de intermediarios no tóxicos, la hipótesis presentada de la biocristalización del heme es la más reconocida (5).

Formación y secuestro del grupo heme

Durante su estadio asexual intraeritrocítico el parásito habita en un medio rico en hemoglobina, este en su estadio de trofozoíto consume cerca del 75% de la hemoglobina presente en el eritrocito, con la consecuente liberación de los grupos heme. Se ha demostrado que concentraciones del heme tan bajas como 20 mM lisan la membrana del parásito en 10 minutos, esta cantidad es producida tan solo por la digestión del 1% de la hemoglobina del eritrocito; luego el microorganismo requiere de un proceso altamente eficiente para deshacerse de este residuo (5).

El grupo prostético heme mantiene el hierro en su estado ferroso, pero una vez liberado de su proteína tiende a perder un electrón y asumir su estado férrico el cual promueve el daño de la membrana debido a sus propiedades peroxidativas, de la misma manera interfiere con la vía de degradación de la hemoglobina (la falcipaina ha mostrado ser muy sensible a la presencia del Heme) (5).

Las unidades diméricas de β -hematina interactúan en una estructura cristalina vía fuerzas intermoleculares, que incluyen puentes de hidrógeno entre los grupos ácido propiónico remanentes no ionizados del heme en cada β -hematina, así pues el pigmento malárico no es más polimérico que el hielo o los azúcares en que las moléculas individuales interactúan a través de enlaces de hidrógeno intermoleculares en el estado cristalino (27). Este no es un polímero como se creía hasta hace poco, por lo

tanto el concepto de polimerización no es apropiado para explicar su formación (15, 16). Recientes publicaciones han dado el nombre de biomineralización a este proceso, haciendo referencia a mecanismos de detoxificación encontrados en otros microorganismos, por ejemplo la mineralización de sulfito de cobre que confiere tolerancia al cobre en *Saccharomyces cerevisiae*; sin embargo este proceso se refiere a la formación de sales inorgánicas insolubles. Actualmente se considera que el término biocristalización es más apropiado para describir la formación del pigmento malárico (16).

Teorías sobre el mecanismo de formación de la hemozoína

Son varias las teorías que buscan explicar este fenómeno y van desde la posible formación mediante una reacción química espontánea la cual se da entre los 6 y los 65°C a un pH entre 4.2 y 5, teoría que parte de observaciones realizadas *in vitro* en las cuales se han determinado las condiciones de formación del cristal; sin embargo se discute por el hecho que no puede explicar como el proceso se desarrolla de manera tan rápida en el parásito como él lo requiere (14).

Se ha observado que lisados del trofozoíto del parásito promueven la biocristalización *in vitro*. De la misma manera, se ha buscado mediante solubilización aislar los componentes de esta mezcla que eventualmente tendrían un efecto catalítico en la biocristalización; sugiriéndose la presencia de una heme polimerasa, la cual podría ser inhibida por varios de los anti-maláricos existentes. Adicional a la necesidad de una polimerasa que dé inicio y guíe el proceso de biocristalización se ha propuesto una actividad autocatalítica por parte de la β -hematina, lo cual explicaría la fase de rápida formación del cristal, aun cuando deja dudas respecto al inicio del proceso (14).

En busca de los factores que inician el proceso de biocristalización se han encontrado en *P. falciparum* ciertas proteínas con un alto contenido de histidina denominadas Proteínas Ricas en Histidina (HRP), de las cuales han sido evidenciadas cuatro: HRP I, II, III y IV; la HRP I ha sido asociada como un factor de citoadherencia; la HRP II ha sido relacionada *in vitro* como un factor inicial de formación de la hemozoína en condiciones similares a las de la vacuola digestiva del parásito.

Las HRP II y III consisten en secuencias repetidas de hexapéptidos con gran cantidad de residuos de alanina e histidina; el más abundante de ellos presenta la siguiente secuencia "Ala-His-His-Ala-Ala-Asp", y aparece 30 veces en la HRP II. Este hexapéptido ha sido identificado mediante métodos inmunoquímicos como el sitio de unión para el grupo heme y la HRP II ha sido localizada en el interior de la vacuola digestiva del parásito; la mayor parte de esta proteína es secretada por el parásito, haciendo su detección en plasma un posible medio de diagnóstico de los pacientes. Se ha asumido que la HRP II es internalizada a la vacuola digestiva del parásito junto con la hemoglobina, allí se une al grupo heme liberado después de la degradación de la hemoglobina dando así inicio al proceso de biocristalización de la β -hematina (14, 28).

Ensayos realizados por algunos grupos han debatido la existencia de una enzima que inicie el proceso de biocristalización, entre ellos, un grupo separó mediante CLAE los componentes del lisado de *P. falciparum*, logrando fracciones con actividad biocristalizante del heme, ellos identificaron estos factores como metil ésteres de ácidos oleico, palmítico y esteárico; de la misma manera encontraron esta actividad en la fracción de acetonitrilo de un extracto de eritrocitos normales aún cuando el extracto completo de estos no mostró la actividad (26).

La habilidad de varios fosfolípidos como la esfingomielina para dar inicio a la biocristalización del heme sugiere una naturaleza no específica de este proceso catalítico. Todos los lípidos ensayados (fosfatidilinositol, fosfatidilserina, esfingomielina y fosfatidilcolina) mostraron actividad para iniciar el proceso de biocristalización, dicho proceso fue inhibido por cloroquina. Se ha encontrado también actividad cristalizante en varios ácidos grasos insaturados, disponibles comercialmente; finalmente se sugiere que los ácidos grasos insaturados tienden a oxidarse en presencia de pequeñas cantidades de heme y oxígeno; proceso que podría de alguna forma estar involucrado en el inicio de la biocristalización del heme (26).

Aun cuando el mecanismo de formación de este cristal aun no es claro, existen trabajos recientes en los que se evalúa el efecto de variables como el tiempo de reacción, la temperatura, el pH, la concentración de acetato y la cantidad de (Fe(III)PPIX) adicionada, en la generación *in vitro* de estos cristales, mediante mediciones de espectroscopía infrarroja, difracción de rayos X y microscopía electrónica; métodos que permiten monitorear las cinéticas de reacción y la forma y características externas de los cristales formados. En cuanto al tiempo de reacción se encontró una relación de tipo sigmoideal al graficar el porcentaje de formación de β -hematina respecto al tiempo, con una fase de inducción que se prolonga aproximadamente hasta los 15 minutos, para posteriormente dar inicio a una fase de rápida formación, entre los 15 – 45 minutos y finalmente una fase de estabilización en la cinética de formación del cristal (Figura 3). La temperatura, evaluada a 30, 37, 50 y 60°C mostró una disminución en la fase de inducción a las más altas temperaturas, fase que aumenta al ir disminuyendo la temperatura; en general se considera la temperatura

En busca de los factores que inician el proceso de biocristalización se han encontrado en *P. falciparum* ciertas proteínas con un alto contenido de histidina denominadas Proteínas Ricas en Histidina (HRP), de las cuales han sido evidenciadas cuatro: HRP I, II, III y IV; la HRP I ha sido asociada como un factor de citoadherencia; la HRP II ha sido relacionada *in vitro* como un factor inicial de formación de la hemozoína en condiciones similares a las de la vacuola digestiva del parásito.

Las HRP II y III consisten en secuencias repetidas de hexapéptidos con gran cantidad de residuos de alanina e histidina; el más abundante de ellos presenta la siguiente secuencia "Ala-His-His-Ala-Ala-Asp", y aparece 30 veces en la HRP II. Este hexapéptido ha sido identificado mediante métodos inmunoquímicos como el sitio de unión para el grupo heme y la HRP II ha sido localizada en el interior de la vacuola digestiva del parásito; la mayor parte de esta proteína es secretada por el parásito, haciendo su detección en plasma un posible medio de diagnóstico de los pacientes. Se ha asumido que la HRP II es internalizada a la vacuola digestiva del parásito junto con la hemoglobina, allí se une al grupo heme liberado después de la degradación de la hemoglobina dando así inicio al proceso de biocristalización de la β -hematina (14, 28).

Ensayos realizados por algunos grupos han debatido la existencia de una enzima que inicie el proceso de biocristalización, entre ellos, un grupo separó mediante CLAE los componentes del lisado de *P. falciparum*, logrando fracciones con actividad biocristalizante del heme, ellos identificaron estos factores como metil ésteres de ácidos oleico, palmítico y esteárico; de la misma manera encontraron esta actividad en la fracción de acetónitrilo de un extracto de eritrocitos normales aún cuando el extracto completo de estos no mostró la actividad (26).

La habilidad de varios fosfolípidos como la esfingomielina para dar inicio a la biocristalización del heme sugiere una naturaleza no específica de este proceso catalítico. Todos los lípidos ensayados (fosfatidilinositol, fosfatidilserina, esfingomielina y fosfatidilcolina) mostraron actividad para iniciar el proceso de biocristalización, dicho proceso fue inhibido por cloroquina. Se ha encontrado también actividad cristalizante en varios ácidos grasos insaturados, disponibles comercialmente; finalmente se sugiere que los ácidos grasos insaturados tienden a oxidarse en presencia de pequeñas cantidades de heme y oxígeno; proceso que podría de alguna forma estar involucrado en el inicio de la biocristalización del heme (26).

Aun cuando el mecanismo de formación de este cristal aun no es claro, existen trabajos recientes en los que se evalúa el efecto de variables como el tiempo de reacción, la temperatura, el pH, la concentración de acetato y la cantidad de (Fe(III)PPIX) adicionada, en la generación *in vitro* de estos cristales, mediante mediciones de espectroscopía infrarroja, difracción de rayos X y microscopía electrónica; métodos que permiten monitorear las cinéticas de reacción y la forma y características externas de los cristales formados. En cuanto al tiempo de reacción se encontró una relación de tipo sigmoideal al graficar el porcentaje de formación de β -hematina respecto al tiempo, con una fase de inducción que se prolonga aproximadamente hasta los 15 minutos, para posteriormente dar inicio a una fase de rápida formación, entre los 15 – 45 minutos y finalmente una fase de estabilización en la cinética de formación del cristal (Figura 3). La temperatura, evaluada a 30, 37, 50 y 60°C mostró una disminución en la fase de inducción a las más altas temperaturas, fase que aumenta al ir disminuyendo la temperatura; en general se considera la temperatura

de 37°C óptima para ensayos farmacológicos que busquen evaluar la actividad inhibitoria de la biocristalización por ser esta la temperatura en que el parásito se encuentra en condiciones reales (15, 17, 18, 29).

El pH en estos ensayos *in vitro*, es fijado mediante una solución tampón de acetato; se encontró que el pH de 3.5 da lugar a las máximas velocidades de formación de β -hematina; nuevamente se considera para el desarrollo de pruebas de evaluación de actividad antimalárica el pH de 4.5 como adecuado por ser cercano al reportado en las vacuolas digestivas del parásito. Nuestro grupo ha evaluado preliminarmente estas variables, encontrando que el pH es crítico para la reproducibilidad de los ensayos al punto que junto con otros investigadores hemos determinado un pH de 4.45 como el más adecuado para los ensayos. La concentración de acetato es un parámetro que influye de manera

importante en las velocidades de reacción, específicamente en la fase de formación cuya pendiente aumenta al aumentar la concentración de acetato y disminuye al disminuir esta. La cantidad de (Fe(III)PPIX) adicionada al parecer no tiene influencia en la cinética de formación de los cristales cuando es evaluada suplementando la solución con (Fe(III)PPIX) al 10% y al 50% (15, 29).

Sitio de acción de antimaláricos existentes

Se ha mostrado que antimaláricos con estructuras de endoperóxidos y quinolínicos (quinidina, halofrantina, desbutilhalofrantina, mefloquina, quinacrina, amodiaquina, pironaridina, quinina, primaquina y cloroquina) inhiben el proceso de cristalización dejando cantidades de hematina libre que son tóxicas para el parásito (5, 15, 17, 24, 28). La cloroquina y los antimaláricos quinolínicos, inhiben el proceso al bloquear las fases de formación del cristal; estudios de microcalorimetría titulación isotérmica, sugieren una correlación entre la constante de unión a la hematina o β -hematina de estos antimaláricos y su habilidad para inhibir la biocristalización, dejando ver que estos compuestos median su actividad por su unión a la β -hematina (forma dimérica), más que a la hematina, con lo cual se postula que esta unión interfiere el equilibrio en la reacción de formación del dímero y de esa forma inhibe la biocristalización (7, 9, 21, 25).

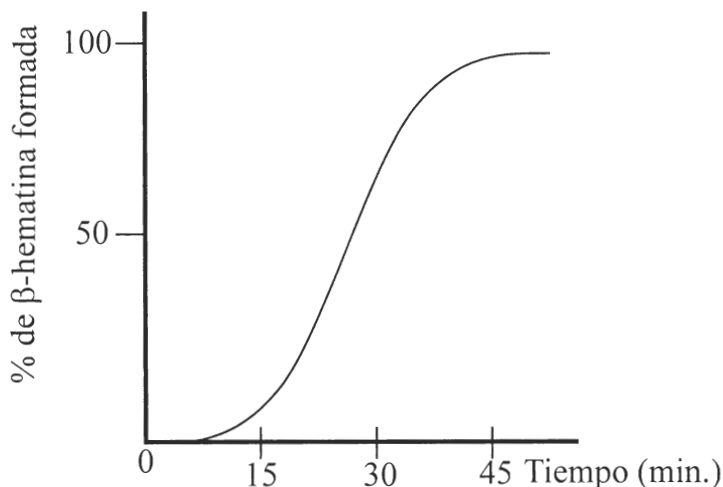


Figura 3. Formación de la B-hematina.

Prueba de inhibición de la biocristalización de la ferriprotoporfina IX como método de tamizaje en la búsqueda de compuestos con actividad antimalárica

El proceso de biocristalización anteriormente comentado es la base para el desarrollo de un método de tamizaje farmacológico rápido en cuanto a la actividad antimalárica de compuestos candidatos a ser empleados como herramienta terapéutica para combatir la malaria.

El proceso presenta las limitantes de mostrar actividad solo en aquellos compuestos cuyo mecanismo de acción sea la inhibición de la biocristalización del heme, quedando por fuera de la evaluación cualquier otro mecanismo de actividad antimalárica que pueda darse a lo largo del ciclo de vida del parásito en el hombre, por lo tanto su valor como prueba de descarte de actividad antimalárica es limitado. Por otro lado, se trata de un proceso *in vitro* que simula las condiciones de biocristalización a un nivel íntimo de interacción entre los componentes involucrados sin tener en cuenta que una sustancia que eventualmente presente actividad, deberá atravesar al menos tres tipos de membranas antes de llegar a su sitio de acción (membrana del eritrocito, membrana del parásito y membrana de la vacuola digestiva). Por lo anterior esta prueba generalmente debe ser complementada con otros ensayos de actividad antimalárica.

El cristal formado es insoluble en soluciones básicas y en solventes apróticos como dimetil-sulfóxido y piridina, contrario al grupo heme el cual es soluble en estos medios; estas características son aprovechadas en el procedimiento para medir el porcentaje de inhibición de la biocristalización del heme como

herramienta para evaluar la actividad antimalárica de sustancias o extractos de origen vegetal; este método espectrofotométrico para la cuantificación de la hemozoína en placas de 96 pozos puede ser empleado para ensayos de cuantificación *in vitro*. Adicionalmente el espectro IR de la hemozoína es significativamente diferente del obtenido con la hematina conteniendo picos adicionales característicos del enlace hierro carboxilato, situación similar se presenta con los patrones de difracción de rayos X de las dos sustancias (5, 15, 28).

El principio básico del ensayo consiste en generar un ambiente similar al de la vacuola digestiva del parásito en una placa de 96 pozos, condiciones en las cuales se ha demostrado que el Cloruro de Hemina ($C_{34}H_{32}ClFeN_4O_4$) o la Hematina ($C_{34}H_{33}FeN_4O_5$), disponibles comercialmente, dan origen a cristales. Estas condiciones ácidas son logradas mediante un tampón de acetato de sodio (pH 4.45), y la incubación de la placa a 37°C durante 18 – 24 horas; finalmente la placa es leída a 405 nm en un espectrofotómetro (6, 17, 29).

El método en estas condiciones permite el análisis rápido de las muestras por triplicado o cuadruplicado con una importante economía en reactivos; se adapta al empleo de micropipetas multicanal, agitadores de placas y centrifugas para placas de 96 pozos, existentes en muchos laboratorios para otras técnicas y permite la cuantificación espectrofotométrica en lectores de placas de 96 pozos (6).

Actualmente nuestro grupo de investigación cuenta con este modelo farmacológico que hace parte de la batería de pruebas de actividad antimalárica, la cual incluye adicionalmente ensayos *in vitro* con cultivo de *Plasmodium falciparum* e *in vivo* en modelo murino con *Plasmodium berghei*.

Una variante de este ensayo ha buscado automatizar el método para obtener un tamizaje

de alta eficiencia que permita la rápida evaluación de más de 100.000 compuestos, empleando placas de 96 pozos, evaluando la hematina radiomarcada que es incorporada en la hemozoína; sin embargo este método resulta costoso y requiere lisado de trofozoítos y hemina radiomarcada, que no están al alcance de muchos laboratorios (6, 30).

De la misma manera, este modelo ha sido empleado en la evaluación de compuestos como las metaloporfirinas (porfirinas sustituidas con un metal Cr, Co, Mn, Cu, Mg, Zn y Sn) algunas de las cuales han presentado actividad 4 veces mayor que la cloroquina, se cree que esta actividad puede estar relacionada con evitar la oxidación del hierro, lo que se ha confirmado al observar que agentes reductores han sido capaces de inhibir la biocristalización, convirtiéndose esta etapa en una excelente diana farmacológica para el desarrollo de compuestos antimaláricos (18, 31, 32).

El objetivo final de este ensayo es encontrar compuestos que puedan efectivamente acumularse en las vacuolas digestivas del parásito y generar cambios en el ambiente fisicoquímico necesario para la biocristalización o interactuar con el heme para impedir su biocristalización, los cuales presentarían grandes potenciales como agentes antimaláricos, ya que se trata de un proceso crítico para el desarrollo del parásito (9, 18, 33, 34).

Bibliografía

1. Fondo de las Naciones Unidas para la Infancia UNICEF y Organización Mundial de la Salud OMS, La Prescripción, Prevención y Tratamiento del Paludismo. Nueva York, 2000.
2. Díaz, L. y Garavito, G. "Evaluación de la Factibilidad de un Sistema de Preservación para su Empleo en la Formulación de la Vacuna Antimalárica (SPf-66)", Tesis, Universidad Nacional, Departamento de Farmacia, 1994.
3. J. Sachs and P. Malaney, The economic and social burden of malaria, *Nature*, **415**, 680 (2002).
4. Organización Panamericana de la Salud, División de Prevención y Control de Enfermedades, Programa de Enfermedades Transmisibles (HCP/HCT), "Situación de los Programas de Malaria en las Américas", Boletín Epidemiológico. Vol. 22, No. 1, marzo 2001.
5. A. K. Tripathi, B. L. Tekwani, Mechanism of formation of β -hematin in malaria parasite: Lipids edge over proteins as possible mediators, *J. Parasit. Dis.*, **23**, 61, (1999).
6. N. Basilio, E. Pagani, D. Monti, D. Taramelli, A microtitre-based method for measuring the haem polymerization inhibitory activity (HPIA) of antimalarial drugs, *J. Antimicrob. Chemother.*, **42**, 55 (1998)
7. P.J. Rosenthal, S.R. Meshnick, Hemoglobin catabolism and iron utilization by malaria parasites, *Mol. Biochem. Parasitol.*, **83**, 131 (1996).
8. S.E. Francis, R. Banerjee, D.E. Goldberg, Biosynthesis and maturation of the malaria aspartic hemoglobins plasmepsins I and II, *J. Biol Chem.*, **272**, 14961 (1997).
9. R.G. Ridley, Haemoglobin degradation and haem polymerization as antimalarial drug targets, *J. Pharm. Pharmacol.*, **49**, 43 (1997).
10. S.E. Francis, I.Y. Gluzman, A. Oksman, D. Banerjee, D.E. Goldberg, Characterization of native falcipain, an enzyme involved in *Plasmodium falciparum* hemoglobin degradation, *Mol. Biochem. Parasitol.*, **83**, 189 (1996).

11. A.M. Silva, A.Y. Lee, S.V. Gulnik, P. Majer, J. Collins, T.N. Bhat, P.J. Collins, R.E. Cachau, K.E. Luker, I.Y. Gluzman, S.E. Francis, A. Oksman, D.E. Goldberg, J.W. Erickson, Structure and inhibition of plasmepsin II, a hemoglobin-degrading enzyme from *Plasmodium falciparum*, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **93**, 10034 (1996).
12. P.L. Olliaro, D.E. Goldberg, The *Plasmodium* digestive vacuole: metabolic headquarters and choice drug target, *Parasitol. Today*, **11**, 294 (1995).
13. P.J. Rosenthal, Proteases of malaria parasites: new targets for chemotherapy, *Emerg. Infect. Dis.*, **4**, 49 (1998).
14. R. Baelmans, A. Deharo, G. Bourdy, V. Muñoz, C. Quenevo, M. Sauvain, H. Ginsburg, A search for natural bioactive compounds in Bolivia through a multidisciplinary approach Part IV. Is a new haem polymerization inhibition test pertinent for the detection of antimalarial natural products?, *J. Ethnopharmacol.*, **73**, 271 (2000).
15. T.J. Egan, W.W. Mavuso, K.K. Ncokazi, The mechanism of β -hematin formation in acetate solution. Parallels between hemozoin formation and biomineralization processes, *Biochemistry*, **40**, 204 (2001).
16. E. Hempelmann, T.J. Egan, Pigment biocrystallization in *Plasmodium falciparum*, *TRENDS in Parasitology*, **18**, 11 (2002).
17. T.J. Egan, E. Hempelmann, W.W. Mavuso, Characterization of synthetic β -hematin and effects of the antimalarial drugs quinidine, halofantrine, desbutyl halofantrine and mefloquine on its formation, *J. Inorg. Biochem.*, **73**, 101 (1999).
18. Taramelli D., Monti D., Omodeo-Sale F., Basilico N., Parapini E., Lombardi I., Olliaro O., Ultrastructural characteristics, biological activity and pharmacological relevance of synthetic malaria pigment (beta-hematin), *Parassitologia*, **Supl 1**, 45 (2001).
19. Bohle D.S., Kosar A.D., Madsen S.K., Propionic acid side chain hydrogen bonding in the malaria pigment beta-hematin, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **294(1)**, 132 (2002).
20. P. Arese, E. Schwarzzer, Malarial pigment (haemozoin): a very active "inert" substance, *Ann. of Trop. Med. Parasitol.*, **91**, 501 (1997).
21. S. R. Meshnick, Is haemozoin a target for antimalarial drugs?, *Ann. Trop. Med. Parasitol.*, **90**, 367 (1996).
22. D. Taramelli, N. Basilico, E. Pagani, R. Grande, D. Monti, M. Ghione, P. Olliaro, The heme moiety of malaria pigment (β -Hematin) mediates the inhibition of nitric oxide and tumor necrosis factor- α production by lipopolysaccharide-stimulated macrophages, *Exper. Parasitol.*, **81**, 501 (1995).
23. D. Taramelli, N. Basilico, A.M. De Palma, M. Sarasella, P. Ferrante, L. Mussoni, P. Olliaro, The effects of synthetic malaria pigment (β -haematin) on adhesion and interleukin 6 production by human endothelial cells, *Trans. Royal Soc. Trop. Med. Hyg.*, **92**, 1 (1998).
24. T.J. Egan, D.C. Ross, P.A. Adams, Quinoline anti-malarial drugs inhibit spontaneous formation of β -Haematin (malaria pigment), *FEBS.*, **352**, 24 (1994).
25. A. Dorn, S.R. Vippagunta, H. Matile, C. Jaquet, J.L. Vennerstrom, R.G. Ridley, An assessment of drug-haematin binding as a mechanism for inhibition of haematin polymerization by quinoline antimalarials, *Biochem. Pharmacol.*, **55**, 727 (1998).

26. S. Parapini, N. Basilico, E. Pasini, T.J. Egan, P. Olliaro, D. Taramelli, D. Monti, Standardization of the physicochemical parameters to assess *in vitro* the β -haematin inhibitory activity of antimalarial drugs, *Exper. Parasitol.*, **96**, 249 (2000).
27. S. Pagola, P.W. Stephens, D.S. Bohle, A.D. Kosar, S.K. Madsen, The structure of malaria pigment (β -haematin), *Nature*, **404**, 307 (1999).
28. A.V. Pandey, H. Bisth, V.K. Babbarwal, J. Srivastava, K.C. Pandey, V.S. Chauhan, Mechanism of malarial haem detoxification inhibition by chloroquine, *Biochemistry*, **355**, 333 (2001).
29. A. Dorn, S.R. Vippagunta, H. Matile, A. Bubendorf, J.L. Vennerstrom, R.G. Ridley, A comparison and analysis of several ways to promote haematin (haem) polymerization and an assessment of its initiation *in vitro*, *Biochem. Pharmacol.*, **55**, 737 (1998).
30. Y. Kurosawa, A. Dorn, M. Kitsuji-Shirane, *et al.*, Haematin polymerization assay as a high-throughput screen for identification of new antimalarial pharmacophores, *Antimicrob. Agents Chem.*, **44**, 2638 (2000).
31. K.A. Cole, J. Ziegler, C. Evans, D.W. Wright, Metalloporphyrins inhibit β -haematin (hemozoin) formation, *J. Inorg. Biochem.*, **78**, 109 (2000).
32. N. Basilico, D. Monti, P. Olliaro, D. Taramelli, Non-iron porphyrins inhibit β -haematin (malaria pigment) polymerization, *FEBS.*, **409**, 297 (1997).
33. R. Baelmans, E. Deharo, V. Muñoz, M. Sauvain, H. Ginsburg, Experimental conditions for testing the inhibitory activity of chloroquine on the formation of β -haematin, *Exper. Parasitol.*, **96**, 243 (2000).
34. C.D. Fitch, A.C. Chou, Regulation of heme polymerizing activity and the antimalarial action of chloroquine, *Antimicrob. Agents Chem.*, **41**, 2461 (1997).