

Nuevo método de evaluación del efecto antiparasitario en modelos *in vitro* e *in vivo*, a través de la visualización de *Trypanosoma cruzi*-GFP.

Salus

Rev. Salus.UC. 20(3):35-40.2016

New method of evaluation of the antiparasitic effect models in in vitro and in vivo, through the viewing of Trypanosoma cruzi-GFP

Samuel Alfonso¹, Jorge Núñez-Durán¹, Melisa Gualdron López², Juan Luis Concepción², Yael García-Marchan¹, Xenón Serrano-Martín¹

RESUMEN

Los tratamientos de primera línea para la enfermedad de Chagas generan importantes efectos adversos que acentúan el deterioro de la salud en los pacientes. La necesidad de generar fármacos alternativos ha permitido desarrollar estudios donde se emplean parásitos capaces de expresar una proteína fluorescente, a fin de correlacionar fluorescencia con población de protozoarios. En este sentido, ideamos una metodología para el seguimiento de la proliferación de *Trypanosoma cruzi*-GFP (Green Fluorescent Protein) en modelos *in vitro* e *in vivo*, empleando el equipo iBox-UVP. Los ensayos *in vitro* se iniciaron con una curva de calibración usando concentraciones entre 5x10⁵ y 5x10⁷ parásitos/mL. Seguidamente, con una curva de proliferación evidenciamos a través de la fluorescencia la susceptibilidad de los parásitos frente a la droga comercial Benznidazol (IC₅₀= 5,3±1,3 μM). En el ensayo *in vivo* se corroboró cualitativamente el efecto quimioterapéutico del Benznidazol (100 mg/kg/día) en ratones C57BL/6, partiendo de un inóculo de 2,5x10⁵ parásitos, haciendo captura de imágenes de fluorescencia cada dos días a partir del día 1, e inicio del tratamiento por vía oral el sexto día. El coeficiente de correlación cercano a 1 obtenido en la curva de calibración habla de un método de cuantificación parasitario sencillo y robusto; también los ensayos en modelos *in vitro* e *in vivo* permitieron monitorear el efecto dosis-dependiente de Benznidazol sobre *T. cruzi*-GFP. En síntesis, elaboramos una metodología novedosa, rápida, no invasiva y que sigue en tiempo real la respuesta quimioterapéutica de drogas anti-*T. cruzi*.

Palabras Clave: Enfermedad de Chagas, proteína fluorescente, *Trypanosoma cruzi*-GFP, benznidazol.

ABSTRACT

The first-line treatments for Chagas disease generate significant adverse effects that accentuate the health deterioration in patients. The need to generate alternative drugs has led to the development of studies in which parasites will express a fluorescent protein, and correlate this expression with protozoan population. We devised a methodology for monitoring the proliferation of *Trypanosoma cruzi*-GFP (Green Fluorescent Protein) in models *in vitro* and *in vivo*, using the equipment iBox-UVP. *In vitro* assays were initiated with a calibration curve using concentrations between 5x10⁵ and 5x10⁷ parasites/mL. Subsequently, with a proliferation curve, through fluorescence we determined the susceptibility of the parasites against the commercial drug Benznidazol (IC₅₀= 5,3±1,3 μM). *In vivo* assays corroborated qualitatively the chemotherapeutic effect of Benznidazol (100 mg/kg/day) in C57BL/6 mice, starting from an inoculum of 2.5x10⁵ parasites, making capture of fluorescence imaging every two days from day 1, and starting oral treatment on the sixth day. The correlation coefficient close to 1 obtained in the calibration curve showed that this quantification method of parasites is simple and robust; assays *in vitro* and *in vivo* allowed monitoring dose-dependent effects of Benznidazol against *T. cruzi*-GFP. We have produced an innovative, rapid, non-invasive method that monitors in real time the chemotherapeutic response of anti-*T. cruzi* drugs.

Key words: Chagas disease, fluorescent protein, *Trypanosoma cruzi*-GFP, benznidazol.

INTRODUCCIÓN

La enfermedad de Chagas es causada por el protozoario *Trypanosoma cruzi* y se transmite a los humanos principalmente por el contacto directo con orina y heces infectadas provenientes de insectos triatomíneos cuando éstos se alimentan de sangre. Se estima que 7 millones de personas están infectadas (la mayoría en América Latina), siendo 1 de las 6 enfermedades tropicales con las tasas de mortalidad y morbilidad más altas del planeta (1). Es considerada una enfermedad desatendida que afecta principalmente zonas en situación de pobreza, cuyas condiciones de salubridad y programas de prevención son precarios (2). En Venezuela se tiene un repunte en el número de casos reportados en zonas como la región capital, los estados Vargas, Cojedes y Lara, y en la región sur-oriente del país (3).

Dado que esta patología no cuenta con una vacuna y el tratamiento quimioterapéutico que se utiliza es poco eficiente en la fase crónica, tóxico y tiene un elevado costo económico para los pacientes, se dirigen esfuerzos en desarrollar alternativas farmacológicas efectivas a bajas dosis y sin

¹ Laboratorio de Biología y Quimioterapia de Parasitosis Tropicales, Área de Salud, Fundación Instituto de Estudios Avanzados (IDEA), Caracas, República Bolivariana de Venezuela.

² Laboratorio de Enzimología de Parásitos, Centro de Ingeniería Genética, Departamento de Biología, Facultad de Ciencias, Universidad de Los Andes, Mérida, República Bolivariana de Venezuela.

Autor de Correspondencia: Xenón Serrano

E-mail: xenonserrano@gmail.com

Recibido: 28-06-2016 **Aprobado:** 21-11-2016

resultados desfavorables sobre la salud de las personas infectadas (4). Entre las investigaciones que se adelantan resalta el uso de parásitos capaces de generar fluorescencia, fenómeno que ocurre cuando son expuestos a una fuente de radiación electromagnética con una longitud de onda específica (5). Esta propiedad la adquieren a través de un proceso de transfección, en donde se introduce un plásmido de ADN compuesto por varios genes que codifican para proteínas específicas, entre ellas la proteína fluorescente (gen reportero). Así, parásitos con una transfección estable pueden ser monitoreados, seleccionados y posteriormente evaluados biológicamente (6).

La razón por la que se utilizan parásitos de *T. cruzi* transfectados, es porque la energía emitida en forma de fluorescencia desde estos microorganismos puede ser captada para realizar estudios de proliferación parasitaria, donde la intensidad de fluorescencia que se registre se correlaciona directamente con el número de protozoarios vivos (7). Adicionalmente, la capacidad de cuantificar con una proteína fluorescente sin la adición de sustratos y cofactores hace que sea un marcador conveniente para ensayos cuantitativos (7).

Existen una amplia gama de proteínas fluorescentes que emiten en gran parte del rango de luz visible del espectro electromagnético; todas ellas con diferentes usos y aplicaciones (8). Para los ensayos con parásitos de *T. cruzi* las más utilizadas son la proteína verde fluorescente o GFP (del inglés Green Fluorescent Protein) y la proteína roja fluorescente también conocida como RFP (del inglés Red Fluorescent Protein) (6).

De acuerdo a lo anterior, nos planteamos desarrollar una metodología para la visualización de parásitos *T. cruzi*-GFP en modelos *in vitro* e *in vivo*, utilizando el equipo de imagenología avanzada iBox Explorer2 UVP. Este equipo cuenta con una novedosa tecnología capaz de capturar imágenes de células fluorescentes en alta resolución a escala macroscópica (cm) y microscópica (μm). Lo anterior permite hacer un monitoreo y seguimiento en tiempo real de la respuesta protozoaria a la acción de compuestos químicos alternativos de origen sintético, a fin de establecer potenciales candidatos que surjan como tratamiento quimioterapéutico a la enfermedad de Chagas.

Resulta importante mencionar que este tipo de aplicaciones son pioneras en el campo de la evaluación de quimioterapias antiparasitarias en Venezuela, y se espera que esta herramienta brinde respuestas oportunas a esta grave parasitosis que afecta la calidad de vida de millones de personas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Parásitos y animales. Epimastigotes de *Trypanosoma cruzi* de la cepa YBM marcados con la proteína verde fluorescente pTREX_GFPskl constitutiva del plásmido de ADN ubicado en el glicosoma del parásito, que llamaremos YBM-GFP, fueron mantenidos a 29 °C en medio de cultivo LIT (triptosa

15 g/L, extracto de levadura 5 g/L, extracto de hígado 2 g/L, glucosa 4 g/L, cloruro de sodio 9 g/L, cloruro de potasio 0,4 g/L y fosfato ácido de sodio 7,5 g/L) suplementado con 20 g/L de Hemina y 10 % de suero fetal bovino (SFB) inactivado.

Ratones machos de la cepa C57BL/6, con 6 semanas de nacidos y un peso cercano a los 30 gramos, fueron usados y mantenidos bajo ambientes controlados, cumpliendo con las normativas éticas y profesionales establecidas nacional e internacionalmente.

Equipo. Las metodologías *in vitro* e *in vivo* se desarrollaron utilizando el equipo iBox® Explorer2™ Imaging Microscope, de la marca UVP, que captura imágenes de células fluorescentes en alta resolución a escala macroscópica (cm) y microscópica (μm), a través de un sistema de cámaras con nueve grados de magnificación. En adelante llamaremos a este equipo TM2.

Generación de *T. cruzi* fluorescente (YBM-GFP).

Construcción del plásmido: El vector pTREX fue donado por el Dr. Takeshi Nara de la Universidad de Tokio. El gen GFP fue amplificado desde pEGFP_C3 (Clontech) con los primers GFPF or ward GGGGGATCCATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGC y GFP ReverseGGTGGATGGATCCCCCGCGGTACTTACGACTGC. El vector pTREX_GFP_skl fue construido a partir del vector pHD1336-GFPskl (la GFP lleva en el C-terminal la secuencia SKL, señal de importación al glicosoma). El fragmento correspondiente al ORF de la GFP skl mas una extensión de 355 pb fue escindido del vector pHD1336_GFP-skl por digestión usando las enzimas de restricción HindIII y XhoI. El fragmento de 1155 pb fue posteriormente ligado usando los mismos sitios de restricción en el vector pTREX. Mezclas de ligación fueron usadas para transformar la cepa de *Escherichia coli* XI1-blue. Las colonias positivas para la doble resistencia Tet+/Amp+ fueron seleccionadas y los plásmidos recombinantes fueron purificados con buffer EasyPrep y analizados por digestión usando HindIII/XhoI.

Transfección: Un cultivo de 40 mL epimastigotes de la cepa YBM de *T. cruzi* fueron crecidos hasta alcanzar un densidad celular entre 0,5 y 1×10^7 parásitos/mL y se centrifugaron a 4000 g por 5 min a temperatura ambiente. El sedimento celular fue lavado por centrifugación dos veces con 10 mL de PBS frío estéril. Los parásitos fueron resuspendidos en 400 μL de buffer de electroporación/transfección (140 mM NaCl, 25 mM HEPES, 0,74 mM Na₂HPO₄, pH 7,5), a una densidad de 1×10^8 parásitos/mL (9). Las células fueron entonces transferidas a una cubeta de 0,4 cm de paso de luz y fueron añadidos 50 μg de ADN plasmídico (pTREX_GFPskl). La mezclas fueron incubadas por 10 min en hielo y entonces sujetas a un pulso de 50 μF , 25 Ω y 0,375 V, con el equipo Harvard Apparatus Btx Ht 100, placa manejador de alto rendimiento Electroporation Lab (Harvard, USA). Las células electroporadas fueron mantenidas en hielo hasta ser transferidas a cajas de cultivo celular de 25 mm³ con 10 mL de medio LIT suplementado con 10 % SFB e incubadas a

28°C por 48 horas (10). Después de este tiempo 500 µg/ml de G418 (Geneticin, Sigma) como agente seleccionador de epimastigotes transfectados, fueron añadidos a los cultivos.

Selección. La morfología y el número de parásitos fueron chequeados con un microscopio óptico invertido (Nikon eclipse 80i). A los 23 días de la transfección los parásitos fueron diluidos a la mitad en medio LIT fresco suplementado con 500 µg/mL de G418. Se realizó la selección en una placa de 24 pozos (1 mL/pozo), con repetidas diluciones hasta lograr obtener clones resistente a G418 y que expresaran la GFP en el glicosoma de forma homogénea en todos los parásitos.

Inmunomicroscopía de fluorescencia. Para el análisis de la GFP fluorescente en el glicosoma de los epimastigotes transfectados, las células fueron lavadas tres veces con PBS y fijadas por incubación con 4% de paraformaldehído en PBS por 10 min. Los parásitos fueron lavados con PBS y adheridos a portaobjetos cubiertos con 0,1 % de poli-L-lisina por 10 min. Ellos fueron entonces lavados nuevamente con PBS para remover las células no adheridas. El ADN fue teñido con 1 mg/mL de DAPI por 5 min en PBS y seguidamente fueron lavados cinco veces con PBS (11). Finalmente los portaobjetos fueron montados con 90 % de glicerol en PBS y 5 % m/v 1,4-diazabicio (2,2,2)octano (DABCO) y analizados en un microscopio invertido.

Curva de calibración. A través de diluciones seriadas y por conteo directo se prepararon 9 soluciones de epimastigotes de YBM-GFP (entre 5x10⁵ y 5x10⁷ parásitos/mL), que se dispusieron por triplicado en una microplaca de 96 pozos. Se usó como blanco del ensayo el medio LIT solo, a un volumen de 150 µL por pozo. Para realizar la captura de imágenes fluorescentes con TM2 se diseñó un molde ajustable a la plataforma de visualización y captura de imagen, que permite una ubicación constante de la microplaca. Las condiciones del para determinar fluorescencia fueron: filtro de excitación: 455/95 nm, filtro de emisión: 535/45 nm, intensidad de irradiación de la lámpara: 2, forma de irradiación: side, tiempo de irradiación: 150 s, y zoom: 0,17x. Mediante un análisis de regresión por mínimos cuadrados se determinaron las características de desempeño del método en estudio (ecuación de la recta y coeficiente de correlación).

Visualización de fluorescencia en modelo *in vitro*. En una microplaca de 96 pozos se dispusieron 1x10⁶ epimastigotes/mL de YBM-GFP, junto con un rango de concentraciones de Benznidazol (Bz) (Sigma) entre 1 µM y 90 µM. Se incluyó un control (solo parásitos) y un blanco (medio LIT). Cada condición fue establecida por triplicado. La microplaca se mantuvo en cámara húmeda, a temperatura ambiente y sin agitación durante el ensayo. Las lecturas de fluorescencia se realizaron durante 18 días consecutivos y las condiciones del equipo para medir fluorescencia fueron las mismas a las usadas en la curva de calibración.

Visualización de fluorescencia en modelo *in vivo*. Este procedimiento se diseñó basado en trabajos anteriores (12),

realizando ligeras modificaciones. Brevemente, 6 ratones fueron infectados con 2,5x10⁵ epimastigotes de YBM-GFP en las almohadillas de las patas traseras el día 0, y aleatoriamente se distribuyeron en dos grupos (3 ratones/grupo), a saber: no tratados y tratados con Bz (100 mg/kg/día). El Bz se disolvió en agua destilada al 7 % de Tween 80 y 3 % de etanol y fue suministrado por vía oral a partir del sexto día. El tratamiento se realizó de manera consecutiva una vez al día hasta el final del ensayo. Las imágenes de fluorescencia fueron tomadas cada dos días entre los días 1 y 11 posteriores a la infección. Antes de cada medida de fluorescencia los animales eran anestesiados por vía intraperitoneal con una mezcla de Ketamina (0,70 µL/g) y Xilacina (0,35 µL/g). Una vez sedados, se colocaban en la plataforma de visualización y captura de imagen del equipo TM2 de manera dorsal y con la planta de las patas traseras hacia arriba. Los parámetros de medición fueron: filtro de excitación: 455/95 nm; filtro de emisión: 535/45 nm; intensidad de irradiación de la lámpara: 4; forma de irradiación: side; tiempo de irradiación: 90 s; y zoom: 0,25x.

Análisis estadístico. Los resultados se procesaron mediante el programa estadístico GraphPad Prism, V 5.0. Se obtuvieron los respectivos parámetros de cada modelo asumiendo un intervalo de confianza de 95 % (p < 0,05).

RESULTADOS

Generación de *T. cruzi* fluorescente (YBM-GFP). Una línea celular de epimastigotes de *T. cruzi* fue obtenida al transfectar parásitos con la construcción pTREX_GFP_skl (Figura 1A). Esto fue logrado mediante el cultivo continuo de transfectantes en presencia de 500 µg/mL de G418 durante 100–110 días. Solo después de transcurrido este periodo de tiempo se observó una tasa de división celular normal, similar al equivalente a la salvaje (9). La línea celular que expresa la GFP fue estable en su forma constitutiva y correctamente localizada en el glicosoma para los sucesivos repiques en medio LIT, y fue verificado usando inmunomicroscopía de fluorescencia (Figura 1B).

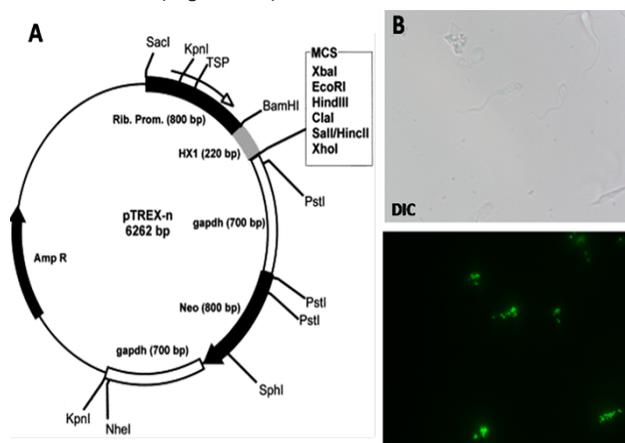
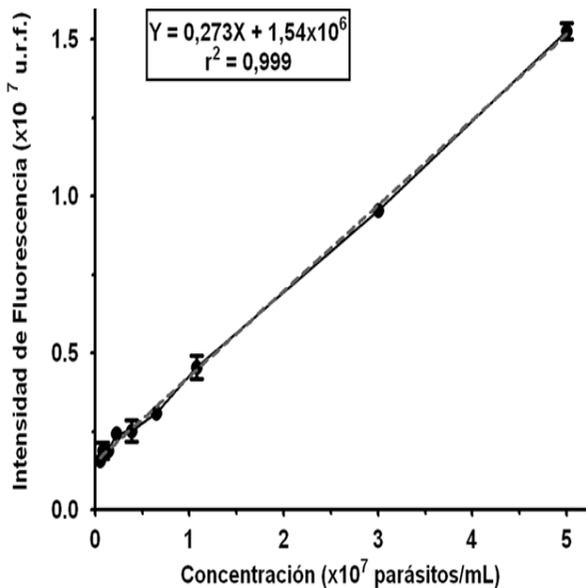


Figura 1. (A) Representación esquemática del plásmido pTREX_GFPskl utilizado en la generación de *T. cruzi* fluorescente (YBM-GFP). (B) Inmunomicroscopía de fluorescencia, ensayando la expresión de la GFP en el glicosoma de epimastigotes de *T. cruzi*. DIC: Interferencia de contraste diferencial.

Curva de calibración. A fin de establecer un método de cuantificación a través de la correlación entre la intensidad de fluorescencia y el número de parásitos, diseñamos una curva de calibración. En la Figura 2 se muestra el gráfico obtenido, en donde se aprecia que los puntos esbozados presentan una tendencia lineal que puede ser ajustada por el método de los mínimos cuadrados y que permite determinar la pendiente cuyo valor es positivo ($m = 0,273$), el punto de corte con el eje de las ordenadas es $1,54 \times 10^6$ y el coeficiente de determinación (r^2) es 0,999.



Intensidad de fluorescencia ($\times 10^7$ u.r.f.)	0,16	0,19	0,19	0,24	0,25	0,31	0,46	0,96	1,53
Concentración ($\times 10^7$ parásitos/mL)	0,05	0,08	0,14	0,23	0,39	0,65	1,08	3,00	5,00

Figura 2. Correlación entre la intensidad de fluorescencia y el número de parásitos YBM-GFP obtenida en el equipo TM2. Cada condición fue realizada por triplicado y se utilizó un volumen por pozo de 150 μ L. La intensidad de fluorescencia está expresada en u.r.f. = unidades relativas de fluorescencia.

Visualización de fluorescencia en modelo *in vitro*.

Para evidenciar la susceptibilidad de los epimastigotes YBM-GFP frente a Bz se desarrolló un ensayo basado en el método tradicional de una curva de proliferación, pero tomando como respuesta la intensidad de fluorescencia. La proliferación de YBM-GFP se vio afectada por la presencia de Bz, como se puede observar en la Figura 3A, así, después de 48 horas las curvas correspondientes a las diferentes concentraciones de droga comienzan a divergir de manera dosis dependiente.

Adicionalmente se esbozó una curva dosis respuesta graficando el porcentaje de inhibición de la proliferación en función de las concentraciones de Bz, tomando los datos a las 216 horas del ensayo (Figura 3B). A partir de este gráfico y usando un método de interpolación lineal (13), se determinó la concentración de Bz capaz de inhibir la proliferación del 50 % de los epimastigotes en el cultivo (IC_{50}), dando un valor de $5,3 \pm 1,3 \mu$ M.

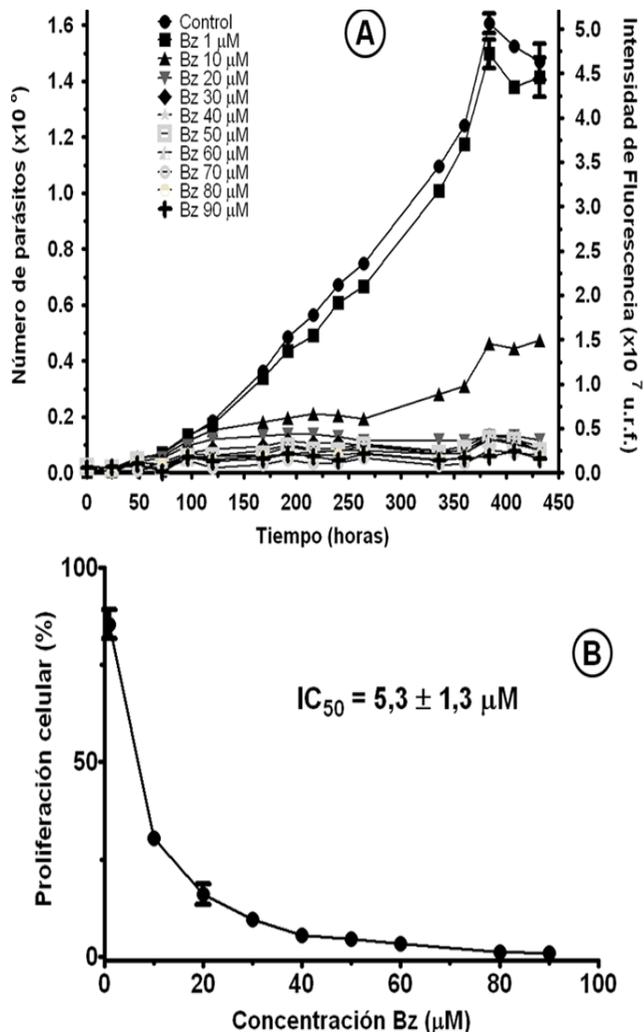


Figura 3. Susceptibilidad de epimastigotes YBM-GFP a Bz. (A) Proliferación de epimastigotes YBM-GFP en función del tiempo en presencia de Bz a las concentraciones indicadas. (B) Efecto de Bz sobre la proliferación de epimastigotes YBM-GFP. Cada punto experimental representa la media y el error estándar para la exposición al fármaco por cuadruplicado. El valor $IC_{50} = 5,3 \pm 1,3 \mu$ M se obtuvo por el método de interpolación lineal de Huber y Koella, tomando los valores a las 216 horas del ensayo.

Visualización de fluorescencia en modelo *in vivo*.

Con el propósito de visualizar el desarrollo parasitario en ratones a través de imagenología con fluorescencia, se realizó un ensayo para corroborar la acción de Bz sobre la proliferación de YBM-GFP. En las imágenes de la Figura 4 se observan las almohadillas de las patas traseras de los ratones C57BL/6, las cuales presentan coloraciones que varían entre el rojo y el azul. En el lado derecho de la figura se encuentra la escala de fluorescencia que va de 0 (color azul oscuro) a 1 (color rojo), esto quiere decir, que las zonas de coloración roja son los sitios donde hay mayor intensidad de fluorescencia, por tanto, mayor cantidad de parásitos.

No fue posible realizar la cuantificación parasitaria debido a los fenómenos de autofluorescencia celular que ocurren en el mismo rango de emisión de la GFP, esto genera poca transparencia en los registros de intensidad de la fluorescencia, que no permiten una correlación directa con el número de parásitos. Por esta razón, las proteínas

rojas fluorescentes resultan mejores biomarcadores, ya que emiten en un rango más alto del espectro electromagnético (14,15).

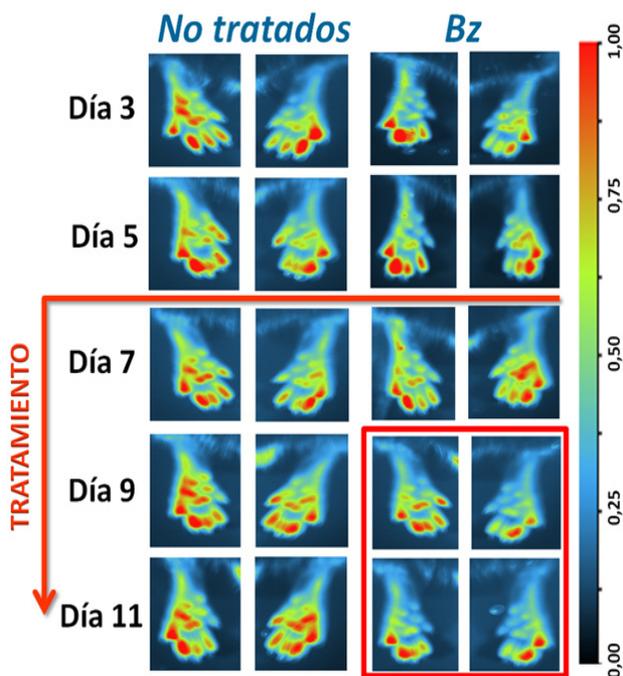


Figura 4. Fluorescencia de los parásitos YBM-GFP registrada en las patas traseras de los ratones C57BL/6. Los ratones (3 por grupo) fueron infectados en las almohadillas de las patas traseras con $2,5 \times 10^5$ epimastigotes de YBM-GFP y las imágenes fueron tomadas cada dos días a partir del día 1 al 11 posterior a la infección.

DISCUSIÓN

Los métodos tradicionales para la evaluación de drogas anti-*T. cruzi* en la fase preclínica incluyen ensayos como las curvas dosis-respuesta, con las cuales se hace un seguimiento del crecimiento parasitario frente a un compuesto químico de interés, pero este procedimiento requiere de varias horas-hombre para el conteo diario, además de grandes cantidades de medio de cultivo (16). Asimismo, el uso de animales para ensayos de actividad anti-*T. cruzi* requiere 60 días de experimentación, y la evolución del proceso de parasitemia se hace a través de muestras de sangre, que generan sufrimiento adicional al ratón (16). La reciente utilización de *T. cruzi*-GFP ha permitido abordar desde una nueva visión la evaluación de drogas con potencial antiparasitario, puesto que hace posible la correlación directa entre fluorescencia y número de parásitos en modelos *in vitro* e *in vivo*, permitiendo de forma simultánea el análisis de los resultados, reduciendo los tiempos de experimentación, y generando un trato amigable con los ratones al no ser sacrificados ni expuestos a constantes punciones para la toma de muestras de sangre.

Aprovechando las ventajas que ofrece la visualización de protozoarios fluorescentes, hemos diseñado metodologías novedosas que siguen en tiempo real el efecto antiproliferativo de la droga Bz en *T. cruzi*, usada como principal tratamiento en personas infectadas. Para el diseño de este estudio partimos de una curva de calibración que nos permitió cuantificar *T. cruzi*-GFP usando como

parámetro de medición la fluorescencia. En este ensayo el r^2 fue mayor a 0,995 lo que indica que el modelo ajustado por mínimos cuadrados es capaz de explicar la respuesta (intensidad de fluorescencia) en función de la variable de concentración de parásitos, debido a la correspondencia entre los resultados experimentales y la recta ajustada, cumpliendo con las condiciones de linealidad del método analítico (17). También se tiene un rango dinámico que abarca dos órdenes de magnitud, y está comprendido entre 5×10^5 y 5×10^7 parásitos/mL, esto lo hace un método cuantitativo aplicable (17). El coeficiente de determinación obtenido con esta metodología es similar a otro trabajo (9), donde reportaron un r^2 de 0,999 a partir del diseño de una curva de calibración con parásitos de *T. cruzi* de la cepa Dm28c marcados con el plásmido pBEX/GFP, utilizando un lector de placas. La comparación de ambos resultados permiten validar el método de cuantificación con el equipo de visualización TM2, aumentando las potencialidades del aparato que no está diseñado para la realización de ensayos *in vitro*, siendo además un innovador ensayo de cuantificación parasitaria altamente ventajoso por ser expedito, robusto y sencillo.

Una vez correlacionada la intensidad de la fluorescencia con el número de parásitos se procedió a realizar una curva de proliferación que permitiera evidenciar como la droga comercial Bz afecta la proliferación de epimastigotes YBM-GFP en un modelo *in vitro*, como era de esperarse las curvas muestran la acción dosis dependiente del compuesto, corroborando su ya probada actividad antiparasitaria (18). A partir de la curva de proliferación se esbozó una curva dosis respuesta para determinar el IC₅₀ que arrojó un valor de $5,3 \pm 1,3 \mu\text{M}$, siendo muy cercano a los reportados para 4 cepas colombianas de *T. cruzi*, a saber: MG, JEM, SPR y GAL61, cuyos valores se encuentran entre 4,90 y $5,85 \mu\text{M}$ (19). Con base en lo expuesto, ambas curvas permitieron verificar que la fluorescencia registrada se corresponde con cada protozoario YBM-GFP vivo, y que una proliferación de parásitos se correlaciona con un aumento en la intensidad de fluorescencia, mientras que la disminución de este parámetro se acompañó con la muerte de epimastigotes. Esto nos permite establecer un método innovador utilizando el equipo TM2, que ofrece como ventajas la reducción considerable de los tiempos de análisis (150 segundos por medición, mucho menor al tiempo que requiere el conteo directo en cámara de Neubauer); y la disminución en los gastos de medio de cultivo con respecto al ensayo tradicional (se manejan volúmenes de $150 \mu\text{L}$ por pozo). Estas características hacen a la técnica claramente útil y conveniente para ser aplicada. Lo anterior valida la medición de la intensidad de fluorescencia como una respuesta biológica para la realización de ensayos *in vitro*, que sirven como indicadores del potencial antiparasitario de drogas alternativas.

Finalmente, una vez que se estandarizaron las metodologías *in vitro* se procedió a la fase experimental con ratones, en la que se usó el equipo TM2 para realizar un ensayo de imagenología por fluorescencia, a fin de describir la acción de Bz sobre la proliferación de formas parasitarias YBM-GFP *in vivo*. En las imágenes correspondiente a los animales no tratados se evidencia de manera cualitativa que la fluorescencia se incrementa a medida que transcurren

los días (aumentan las zonas rojas), esto se explica por el proceso de parasitemia en desarrollo; mientras que los ratones tratados con Bz muestran una disminución en las zonas rojas y amarillas a partir del noveno día, lo que se traduce en un decrecimiento en la proliferación de protozoarios fluorescentes producto del efecto citotóxico de la droga. Estos resultados se corresponden con trabajos previos (12), donde trabajaron con tripomastigotes de *T. cruzi* de la cepa CL WT marcados con el plásmido pTrex-Neo-tdTomato, y observaron después del tercer día de tratamiento que las zonas fluorescentes en las patas traseras de ratones de la cepa BALB/c prácticamente desaparecen utilizando la droga Bz. Así, éste método se valida como un protocolo de tratamiento a corto plazo que evalúa la supresión de la replicación de los parásitos en sitios subcutáneos, requiriendo solo 11 días en total, tiempo suficiente para el establecimiento de la infección y la fácil visualización del aumento o disminución de la proliferación parasitaria mediante la captura de imágenes con fluorescencia. Además, la evaluación de drogas antiparasitarias alternativas en modelos *in vivo* usando el equipo TM2 ofrece importantes ventajas, como la generación imágenes en tiempo real del efecto anti-*T. cruzi* de compuestos químicos, usando un método no invasivo, seguro, ético y eficiente.

Para concluir, se tiene proyectado obtener cepas de *T. cruzi* que expresen los genes reporteros de la proteína roja fluorescente, para poder cuantificar crecimiento parasitario en modelos *in vivo*, y también emplear las metodologías *in vitro* e *in vivo* que se han validado, para evaluar candidatos quimioterapéuticos que se proyecten de manera prometedora como tratamiento de la enfermedad de Chagas, esto permitirá atender esta problemática de manera oportuna.

AGRADECIMIENTOS. Al Bioterio de la Fundación IDEA, MppEUCT, República Bolivariana de Venezuela, por suministrar los ratones que fueron usados en el ensayo de visualización de fluorescencia para el modelo *in vivo*

FINANCIAMIENTO. Este trabajo fue realizado gracias al apoyo financiero del Fondo Nacional de Ciencia Tecnología e Innovación (FONACIT), proyecto 2012002132.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- World Health Organization. Investing to overcome the global impact of neglected tropical diseases: third WHO report on neglected tropical diseases 2015. The Diseases: Chagas disease (pp. 75–81). Disponible en: http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/152781/1/9789241564861_eng.pdf?ua=1. (Acceso 15 de Marzo 2016).
- Organización Mundial de la Salud. Enfermedades tropicales desatendidas. Prevención, control, eliminación y erradicación. Disponible en: http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/150927/1/A66_20-sp.pdf. (Acceso 17 de Marzo 2016).
- Aguilar CM, Ferrer E, Herrera L, Espinosa R, González L, Celis LV, Sanoja MG, Medina M. Guía para el diagnóstico, atención y manejo clínico de la enfermedad de Chagas en Venezuela. SA IAE “Dr. Arnoldo Gabaldón”. Maracay 2014; p. 13. Disponible en: http://svmi.web.ve/wh/documents/Guia_Chagas_2015.pdf. (Acceso 25 de Marzo 2016).
- Bustamante JM y Tarleton RL. Potential new clinical therapies for Chagas disease. *Expert Rev Clin Pharmacol* 2014; 7: 317–325.
- Andreu N, Zelmer A y Wiles S. Noninvasive biophotonic imaging for studies of infectious disease. *FEMS Microbiol Rev* 2011; 35: 360–394.
- Pires SF, DaRocha WD, Freitas JM, Oliveira LA, Kitten GT, Machado CR, Pena SDJ, Chiari E, Macedo AM, Teixeira SMR. Cell culture and animal infection with distinct *Trypanosoma cruzi* strains expressing red and green fluorescent proteins. *Int J Parasit* 2008; 38: 289–297.
- Gubbels MJ y Striepen B. Studying the cell biology of apicomplexan parasites using fluorescent proteins. *Microsc Microanal* 2004; 10: 1–12.
- Chudakov DM, Matz MV, Lukyanov S y Lukyanov KA. Fluorescent proteins and their applications in imaging living cells and tissues. *Physiol Rev* 2010; 90: 1103–1163.
- Kessler RL, Gradia DF, Pontello Rampazzo RdC, Lourenço É E, Fidêncio NJ, Manhaes L, Macagnan Probst C, Rodrigues-Ávila A, Fragoso SP. Stage-regulated GFP expression in *Trypanosoma cruzi*: Applications from host-parasite interactions to drug screening. *PLoS ONE* 2013; 8(6): e67441.
- Concepción JL, Chataing B, Dubourdiou M. Purification and properties of phosphoglucose isomerases of *Trypanosoma cruzi*. *Comparative Biochemistry and Physiology. Part B, Biochemistry & Molecular Biology* 1999; 122: 211–222.
- González-Marcano E, Mijares A, Quiñones W, Cáceres A, Concepción JL. Post-translational modification of the pyruvate phosphate dikinase from *Trypanosoma cruzi*. *Parasitol Int*. 2014, 63: 80–86.
- Canavaci AMC, Bustamante JM, Padilla AM, Perez-Brandan CM, Simpson LJ, Xu D, Boehlke CL y Tarleton RL. *In vitro* and *in vivo* high-throughput assays for the testing of anti-*Trypanosoma cruzi* compounds. *PLoS Negl Trop Dis* 2010; 4 (7): e740.
- Huber W y Koella J. A comparison of three methods of estimating EC50 in studies of drugs resistance in malaria parasites. *Acta Tropica* 1993; 55: 257–261.
- Wiedenmann J, Oswald F, Nienhaus GU. Fluorescent proteins for live cell imaging: opportunities, limitations, and challenges. *IUBMB Life* 2009; 61(11): 1029–1042.
- Stepanenko OV, Verkhusha VV, Kuznetsova IM, Uversky VN, Turoverov KK. Fluorescent proteins as biomarkers and biosensors: Throwing color lights on molecular and cellular processes. *Curr Protein Pept Sci* 2008; 9(4): 338–369.
- Benaim G, Sanders JM, García-Marchán Y, Colina C, Lira R, Caldera AR, Payares G, Sanoja C, Burgos JM, León-Rossell A, Concepción JL, Schijman AG, Levin M, Oldfield E, Urbina JA. Amiodarone has intrinsic anti-*Trypanosoma cruzi* activity and acts synergistically with Posaconazole. *J Med Chem* 2006; 49: 892–899.
- Sierra-Alonso I, Gómez-Ruiz S, Pérez-Quintanilla D y Morante-Zarcelo S. Análisis Instrumental. Netbiblo. España 2010; p. 3–16.
- Bern C, Montgomery SP, Herwaldt BL, Rassi A Jr, Marin-Neto JA, Dantas RO, Maguire JH, Acquatella H, Morillo C, Kirchhoff LV, Gilman RH, Reyes PA, Salvatella R, Moore AC. Evaluation and treatment of chagas disease in the United States: a systematic review. *JAMA* 2007; 298: 2171–2181.
- Mejía-Jaramillo AM, Fernández GJ, Montilla M, Nicholls RS, Triana-Chávez O. Sensibilidad al benzonidazol de cepas de *Trypanosoma cruzi* sugiere la circulación de cepas naturalmente resistentes en Colombia. *Biomédica* 2012; 32:196–205.