



UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

**Estandarización de un método
fluorométrico para la determinación
de la densidad parasitaria por
Plasmodium en modelos
farmacológicos de malaria *in vivo* e *in
vitro*.**

Maria Helena Arias Marciales.

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Ciencias, Departamento de farmacia
Bogotá, Colombia

2015.

Estandarización de un método fluorométrico para la determinación de la densidad parasitaria por *Plasmodium* en modelos farmacológicos de malaria *in vivo* e *in vitro*.

Maria Helena Arias Marciales.

Tesis presentada como requisito parcial para optar al título de:
Magister en Farmacología.

Director:

Ph.D., M.Sc., Químico Farmacéutico. Giovanni Garavito Cárdenas.

Línea de Investigación:

Farmacología de las terapias antiparasitarias empleadas en medicina tradicional y popular.

Grupo de Investigación:

Farmacología de la medicina tradicional y popular (FAMETRA).

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Ciencias, Departamento de Farmacia
Bogotá, Colombia
2015.

A mi esposo y a mis hijos por su paciencia, comprensión y por ser mi soporte durante la realización de esta tesis.

A mis padres y hermanos por su amor y apoyo a lo largo de mi vida.

Agradecimientos

La realización del presente trabajo conto con la colaboración de diferentes personas e instituciones a quienes expreso mi más sincero agradecimiento, por ser parte fundamental en la realización de esta tarea.

Agradezco a mi director de tesis el Profesor Giovanni Garavito Cárdenas por su orientación y apoyo en la realización de este trabajo, a los Profesores del Departamento de Farmacia y del Posgrado en Farmacología por su enseñanza.

Agradezco especialmente a Vanessa Otero Jiménez, investigadora del grupo “FAMETRA” Farmacología de la Medicina Tradicional y Popular, por su contribución en la realización de este trabajo, por compartirme su conocimiento y por los buenos momentos compartidos.

Doy gracias a mis compañeros, Zully Johanna Rodríguez, Victoria Rodríguez y Jorge Enrique Hernández, por su compañía, apoyo y trabajo en equipo, por los buenos momentos compartidos y por los que vendrán.

Agradezco a las siguientes instituciones por su apoyo para la realización de este trabajo:

- Universidad Nacional de Colombia, Facultad de Ciencias, Departamento de Farmacia.
- Programa Ecos Nord por la financiación de una pasantía de investigación en Toulouse, Francia.

Resumen

La eficacia *in vivo* e *in vitro* de potenciales antimaláricos generalmente es evaluada mediante la determinación microscópica directa de la parasitemia de *Plasmodium* en extendidos de sangre teñidos con Giemsa. Este proceso es subjetivo, consume mucho tiempo, carece de precisión y requiere de personal técnico experimentado. En el presente estudio hemos adaptado y optimizado un método basado en la fluorescencia del SYBR Green I (SGI). La sincronicidad (para el cultivo de *P. falciparum*), el uso de sangre entera (*Whole blood cell_WBC*) frente a células rojas infectadas (para el modelo *in vivo*), y los parámetros de lisis y el tiempo de tinción (en ambos modelos) fueron examinados para definir las condiciones óptimas.

El tiempo de tinción fue robusto entre 5 minutos y 4 horas (2 horas óptimo); el cultivo asincrónico del parásito permite evaluar las concentraciones más bajas y la WBC no interfiere. Bajo condiciones experimentales óptimas, el ruido de fondo generado es bajo, hay buena linealidad (dentro de los rangos de parasitemia empleados comúnmente en estos modelos farmacológicos). El método de Bland-Altman evidenció una fuerte correlación entre el método SGI y el estándar Giemsa. El Factor Z fue $0,5 > Z > 0$ para el modelo *in vitro* y $Z > 0,5$ para el modelo *in vivo*, lo que confirma que el método es apropiado para el cribado de alto rendimiento. Estos hallazgos sugieren que nuestro método alternativo basado en la fluorescencia es adecuado para la evaluación *in vitro* e *in vivo* de sustancias o extractos con posible actividad frente a malaria.

Palabras clave: Antimaláricos – *Plasmodium falciparum* - *Plasmodium berghei* – *in vivo* – *in vitro* – SYBR Green I – Espectrometría de fluorescencia.

Abstract

The *in vitro* and *in vivo* efficacy of potential antimalarials is usually assessed by direct microscopical determination of the parasitaemia of *Plasmodium* infected red blood cells on Giemsa stained blood smears. This process is subjective, time consuming, lacks accuracy and requires experimented technicians. In the present study we adapted and optimized a SYBR Green I (SGI) fluorescence-based method. The synchronicity (for the culture of *P falciparum*), the use of whole blood-cells (WBC) versus isolated infected red blood cells (for the *in vivo* model), and the lysis parameters as same as the staining time (for both models) were examined to define optimal conditions.

In our hands staining incubation time ranged from 5 minutes to 4 hours (2 hours being optimal); *in vitro* asynchronous parasite culture allows to assess lower concentrations and WBC did not interfere. Under optimal experimental conditions, the background generated was low; the linearity is good (within the ranges of parasitaemia commonly employed in these pharmacological models). The Bland–Altman plot showed a strong correlation between SGI and standard Giemsa method. Z factor was $0,5 > Z > 0$ for the *in vitro* model and $Z > 0,5$ for *in vivo* model, confirming that the method is appropriate for high-throughput screening. These findings suggest that our alternative fluorescence-based assay is suitable for *in vitro* and *in vivo* anti malarial drug assessment.

Keywords: Antimalarial drugs – *Plasmodium falciparum* - *Plasmodium berghei* – *in vivo* – *in vitro* – SYBR Green I – Fluorescence spectrometry.

Contenido

Pág.

| | |
|--|--------------------------------|
| Resumen | IX |
| Lista de figuras | XIV |
| Lista de abreviaturas | ¡Error! Marcador no definido.V |
| Introducción | 1 |
| 1. MALARIA | 7 |
| 1.1 Generalidades malaria | 7 |
| 1.2 Situación epidemiológica..... | 8 |
| 1.3 Estrategias para la erradicación y el control del paludismo | 11 |
| 1.4 Ciclo biológico | 12 |
| 1.5 Agente etiológico..... | 14 |
| 1.5.1 <i>P. falciparum</i> | 15 |
| 1.5.2 <i>P. vivax</i> | 15 |
| 1.5.3 <i>P. ovale</i> | 15 |
| 1.5.4 <i>P. malariae</i> | 15 |
| 1.5.5 <i>P. Knowlesi</i> | 15 |
| 1.6 Fisiopatología y manifestaciones clínicas de la enfermedad | 16 |
| 1.6.1 Manifestaciones clínicas | 17 |
| 1.6.2 Fisiopatología de malaria severa por <i>P. falciparum</i> | 17 |
| 1.7 Diagnóstico de malaria | 19 |
| 1.8 Tratamiento | 21 |
| 1.9 Vigilancia, monitoreo y evaluación de la resistencia en malaria | 22 |
| 2. Determinación de las condiciones óptimas del método fluorométrico para la evaluación del porcentaje de parasitemia en los modelos farmacológicos de malaria <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i> | 25 |
| 2.1 Capacidad del ensayo: Linealidad y rango | 25 |
| 2.2 Límite de detección (LD) y límite de cuantificación (LC) | 26 |
| 2.3 Determinación de la calidad del método (Factor Z) | 26 |
| 2.4 Materiales y métodos | 27 |
| 2.5 Modelo farmacológico de cultivo de <i>P. falciparum</i> | 27 |
| 2.5.1 Recuento de parasitemia por el método basado en fluorescencia | 28 |
| 2.6 Modelo farmacológico <i>in vivo</i> de malaria murina | 28 |

| | | |
|-----------|---|------------|
| 2.6.1 | Recuento de parasitemia por el método basado en fluorescencia..... | 29 |
| 2.7 | Optimización del método..... | 29 |
| 2.8 | Estudio de las capacidades del método fluorométrico..... | 30 |
| 2.8.1 | Modelo farmacológico <i>in vitro</i> | 30 |
| 2.8.2 | Modelo farmacológico <i>in vivo</i> | 30 |
| 2.9 | Determinación de las Unidades de Fluorescencia relativa (UFR) bajo condiciones optimizada..... | 30 |
| 3. | Adaptación del método de lectura por fluorometría, al modelo farmacológico <i>in vitro</i> de cultivo de <i>Plasmodium falciparum</i>..... | 33 |
| | Resultados y discusión..... | 33 |
| 3.1 | Adaptación y optimización del método fluorométrico..... | 34 |
| 3.1.1 | Capacidad del ensayo: Linealidad y rango | 34 |
| 3.2 | Parámetros de la metodología | 43 |
| 3.2.2 | Exactitud del método fluorescente por SYBR Green I..... | 45 |
| 3.2.3 | Sensibilidad del método fluorescente con SYBR Green I..... | 47 |
| 3.2.4 | Calidad del método (Factor Z)..... | 48 |
| 4. | Adaptación y optimización del método de lectura por fluorometría, al modelo farmacológico <i>in vivo</i> de <i>Plasmodium berghei</i>..... | 53 |
| | Resultados y discusión..... | 53 |
| 4.1 | Adaptación y optimización del método fluorométrico..... | 54 |
| 4.1.1 | Capacidad del ensayo: Linealidad y rango | 54 |
| 4.1.2 | Determinación del tipo de muestra | 58 |
| 4.1.3 | Determinación del proceso de lisado de las muestras..... | 63 |
| 4.2 | Parámetros de la metodología..... | 65 |
| 4.2.1 | Linealidad de la respuesta fluorescente generada por SYBR Green I..... | 65 |
| 4.2.2 | Exactitud del método fluorescente por SYBR Green I..... | 67 |
| 4.2.3 | Sensibilidad del método fluorescente con SYBR Green I..... | 69 |
| 4.2.4 | Calidad del método (Factor Z)..... | 70 |
| 5. | Conclusiones y recomendaciones | 71 |
| 5.1 | Conclusiones..... | 71 |
| 5.2 | Recomendaciones..... | 72 |
| A. | Anexo A: Protocolo de fluorometría con SYBR Green I para el modelo farmacológico <i>in vitro</i> de <i>P. falciparum</i> | 73 |
| B. | Anexo B: Protocolo de fluorometría con SYBR Green I para el modelo farmacológico <i>in vivo</i> de <i>P. berghei</i> | 100 |

Bibliografía 123

Lista de figuras

Pág.

| | |
|--|----|
| Figura 1: Países con transmisión activa de malaria, 2013..... | 8 |
| Figura 2: Proporción de casos de malaria no complicada por especie parasitaria a semana epidemiológica 51 de 2014 | 10 |
| Figura 3: Ciclo biológico de la malaria | 13 |
| Figura 4: Exámenes microscópicos para diagnóstico de malaria 2000-2013 | 21 |
| Figura 5: Optimización del tiempo de tinción, concentración parasitaria vs respuesta fluorescente (UFR) | 35 |
| Figura 6: Optimización del tiempo de tinción, Pendiente (A) y Coeficiente de correlación (B) | 36 |
| Figura 7: Optimización del tiempo de tinción, Limite de detección (LD) y Limite de cuantificación (LC) | 37 |
| Figura 8: Optimización del tiempo de tinción, Concentración parasitaria mínima a la que se logra calcular el Factor Z | 38 |
| Figura 9: Optimización del tipo de cultivo Sincrónico, concentración parasitaria vs respuesta fluorescente | 39 |
| Figura 10: Optimización del tipo de cultivo Asincrónico, concentración parasitaria vs respuesta fluorescente | 40 |
| Figura 11: Optimización del tipo de cultivo Sincrónico o Asincrónico, Pendiente (A) y Coeficiente de correlación (B) | 41 |
| Figura 12: Optimización del tipo de cultivo Sincrónico o Asincrónico, Limite de detección (LD) y Limite de cuantificación (LC) | 42 |
| Figura 13: Respuesta fluorescente generada por los controles positivo (C+) y negativo (C-) en el método de fluorescencia SYBR Green I, bajo condiciones optimizadas | 43 |
| Figura 14: Evaluación de la linealidad entre la respuesta fluorescente (RFU) y el porcentaje de parasitemia | 44 |
| Figura 15: Evaluación de la linealidad entre la respuesta fluorescente (RFU) y el porcentaje de parasitemia; Pendiente (A) y coeficiente de correlación r^2 (B) | 45 |
| Figura 16: Representación gráfica de la diferencia entre el método de fluorescencia SGI y el método de extendidos de sangre coloreados con Giemsa frente a sus valores medios | 46 |
| Figura 17: Evaluación de la sensibilidad del método fluorométrico con SGI; límite de detección (LD) y límite de cuantificación (LC) | 47 |
| Figura 18: Evaluación de la calidad del método fluorométrico con SGI; Factor Z | 49 |
| Figura 19: Optimización del tiempo de tinción, concentración parasitaria Vs respuesta fluorescente | 55 |
| Figura 20: Optimización de tiempo de tinción, Pendiente (A) y coeficiente de correlación (B) | 56 |

| | |
|--|----|
| Figura 21: Optimización del tiempo de tinción, límite de detección y límite de cuantificación | 57 |
| Figura 22: Optimización del tiempo de tinción, concentración parasitaria mínima a la que se logra calcular el factor Z | 58 |
| Figura 23: Optimización del tipo de muestra sangre total frente a glóbulos rojos..... | 60 |
| Figura 24: Optimización del tipo de muestra sangre total frente a glóbulos rojos, Pendiente (A) y coeficiente de correlación (B) | 61 |
| Figura 25: Optimización del tipo de muestra sangre total frente a glóbulos rojos, límite de detección y límite de cuantificación | 62 |
| Figura 26: Efecto del proceso de pre-lisis en la Pendiente (A), el Coeficiente de Correlación (B) y los Límites de Detección (DL) y de cuantificación (QL) | 64 |
| Figura 27: Datos generados bajo condiciones optimizadas | 65 |
| Figura 28: Evaluación de la linealidad entre la respuesta fluorescente (RFU) y el porcentaje de parasitemia..... | 66 |
| Figura 29: Evaluación de la linealidad entre la respuesta fluorescente (RFU) y el porcentaje de parasitemia; Pendiente (A) y coeficiente de correlación r^2 (B)..... | 67 |
| Figura 30: Representación gráfica de la diferencia entre el método de fluorescencia SGI y el método microscópico de valoración de extendidos de sangre coloreados con Giemsa, frente a sus valores medios | 68 |
| Figura 31: Modelo <i>in vivo</i> , evaluación de la sensibilidad del método fluorométrico con SGI; límite de detección (LD) y límite de cuantificación (LC)..... | 69 |
| Figura 32: Evaluación de la calidad del método fluorométrico con SGI; Factor Z | 70 |

Abreviaturas

Abreviatura Término

| | |
|------------------|---|
| ADN | Ácido desoxirribonucleico |
| AQ-SP | Amodiaquina - Sulfadoxina-Pirimetamina |
| BES | Boletín epidemiológico semanal |
| C- | Control negativo |
| C+ | Control positivo |
| CI ₅₀ | Concentración inhibitoria 50 |
| CI ₉₀ | Concentración inhibitoria 90 |
| CO ₂ | Dióxido de carbono |
| CQ | Cloroquina |
| CTDA | Combinación terapéutica con derivados de artemisinina |
| DMSO | Dimetil-sulfoxido |
| EDTA | Ácido etilendiaminotetraacético |
| ELISA | Ensayos de inmunoabsorción ligados a enzimas |
| FAMETRA | Farmacología de la medicina tradicional y popular |
| FCB2 | <i>falciparum Colombia Bogotá 2</i> |
| GB | Glóbulos Blancos |
| g/dL | Gramos por decilitro |
| GPI | Glicosil-fosfatidil-inositol |
| GR | Glóbulos rojos |
| GRNP | Glóbulos rojos no parasitados |
| GRP | Glóbulos rojos parasitados |
| HRP-2 | Proteínas ricas en histidina 2 |
| h | Hora |
| Hto | Hematocrito |
| ICAM-1 | Moléculas de adhesión intracelular-1 |
| INS | Instituto Nacional de Salud |
| IPTi | Tratamiento intermitente preventivo para infantes |
| IPTp | Tratamiento intermitente preventivo para embarazo |
| Kg | Kilogramo |
| LC | Límite de cuantificación |
| LD | Límite de detección |
| mm ³ | Milímetro cúbico |
| mL | Mililitro |
| MPS | Ministerio de la Protección Social |
| MTI | Mosquiteros tratados con insecticidas |
| OMS | Organización Mundial de la Salud |
| P. | <i>Plasmodium</i> |
| PBS | Tampón fosfato salino |
| PCR | Reacción en cadena de la polimerasa |
| PDR | Pruebas de diagnóstico rápido |
| PfEMP-1 | Proteína de membrana eritrocitaria 1 de <i>P.</i> |

| Abreviatura | Término |
|--------------------|---|
| | <i>falciparum</i> |
| pLDH | Lactato deshidrogenasa plasmodial |
| SIVIGILA | Sistema Nacional de Vigilancia en Salud Pública |
| SGI | SYBR Green I |
| SMC | <i>Quimio-prevención estacional de la malaria</i> |
| SP | Sulfadoxina-pirimetamina |
| TNF- α | Factor de necrosis tumoral α |
| TPIe | Tratamiento preventivo intermitente durante el embarazo |
| UFR | Unidades de Fluorescencia Relativa |
| VIH/SIDA | Virus de inmunodeficiencia humana/Síndrome de inmunodeficiencia adquirida |
| WHO | World Health Organization. |

Introducción

Desde que Trager y Jensen (1976) describieron un protocolo para el cultivo *in vitro* de las etapas eritrocíticas de *P. falciparum* y Desjardins (1979) propuso su semi-automatización y miniaturización, para lograr el crecimiento en placas de microtitulación, el modelo farmacológico *in vitro* de cultivo de *P. falciparum*, se ha mantenido a la cabeza como técnica de tamizaje primario en la investigación de nuevas alternativas terapéuticas y el estudio de combinaciones de fármacos. La valoración final compara la parasitemia de los pozos testigo, tratados con el vehículo de los tratamientos, frente a la parasitemia de aquellos que reciben tratamiento o el control activo; este modelo permite emplear el mismo agente que parasita al hombre, es relativamente rápido y accesible y sin las restricciones éticas que acompañan el trabajo en los modelos de animal íntegro empleados en malaria; sin embargo, presenta limitaciones de bioseguridad derivadas del empleo de un agente infeccioso que requiere para su crecimiento eritrocitos y plasma humanos.

Al tratarse de un modelo de interacción íntima entre las sustancias (o extractos) estudiadas y el microorganismo, el acceso al parásito es inmediato, sin significar necesariamente que la actividad se mantenga en evaluaciones posteriores de su desarrollo, con lo cual este modelo sería incapaz de detectar su potencial actividad antimalárica; la evaluación de la actividad antimalárica requiere el uso de animales de experimentación que permitan conocer los procesos farmacocinéticos que ocurren en un animal íntegro y los procesos derivados del paso de las sustancias a través de membranas o la biotransformación de las mismas que puedan estar directamente relacionadas con su actividad.

La prueba farmacológica de referencia para la evaluación de la actividad esquizonticida *in vivo* de potenciales antimaláricos es el llamado test supresivo de cuatro días o *test de Peters* descrito hace 40 años (Peters y Robinson, 1965). En este modelo los ratones son

infectados en el día 0 con una suspensión de células rojas parasitadas con *Plasmodium murino*, dos horas después de la infección y cada día a la misma hora hasta completar 4 días de tratamiento, los ratones son tratados con los compuestos a evaluar (o con el vehículo para el grupo control). En el día 4 se hacen extendidos de sangre periférica tomada de la cola y se tiñen con Giemsa, por microscopía se determina el porcentaje de glóbulos rojos parasitados por el recuento de 1000-10.000 eritrocitos bajo el objetivo 100X.

Para la determinación del crecimiento parasitario y el porcentaje de parasitemia en los estudios de farmacología experimental en malaria el método más comúnmente empleado es el de conteo microscópico de extendidos teñidos con Giemsa que permite el conteo de los glóbulos rojos parasitados y la identificación de la morfología del parásito; es engorroso, requiere frotis de buena calidad y el conteo de un número elevado de eritrocitos que garanticen su confiabilidad, tiene implícito un sesgo subjetivo (diferencias significativas en la parasitemia estimada por diferentes microscopistas), y resultados falsos positivos y negativos de más de 36% y 18%, respectivamente, haciéndolo inadecuado para la cuantificación rápida en el tamizaje primario de posibles candidatos a fármacos (Smeijsters et al., 1996; Bennett et al., 2004; Bacon et al., 2007; Grimberg, 2011).

Otros métodos empleados para determinar el porcentaje de parasitemia son los métodos radioisotópicos, considerados como patrón de oro en estudios de actividad *in vitro* e *in vivo* dada su alta especificidad y sensibilidad (lograda por la unión directa de los radiomarcadores al material genético del parásito), y los métodos de ELISA que emplean anticuerpos monoclonales contra moléculas del *Plasmodium* como las proteínas ricas en histidina 2 (HRP-2) y la lactato deshidrogenasa plasmodial (pLDH); estos métodos, requieren la realización de protocolos de múltiples pasos y tiene un elevado costo; adicionalmente, los métodos radioisotópicos envuelven el manejo y disposición de materiales radiactivos, mientras que con los métodos de ELISA no es posible determinar la muerte del parásito una vez las enzimas se expresan, haciéndolos poco informativos en estudios de parásitos quiescentes; adicionalmente en zonas de alta diversidad genética la sensibilidad de la HRP-2 puede verse comprometida por variaciones genéticas en los puntos de unión a proteínas (Bennett et al., 2004; Bacon et al., 2007; Grimbert, 2011).

Desde 2004, numerosos autores han reportado el uso de fluorimetría para la determinación del crecimiento parasitario y la susceptibilidad a fármacos de *P. falciparum* en ensayos *in vitro*; estos métodos se basan en la detección de ADN parasitario en glóbulos rojos infectados, pero presentan limitaciones debido a que los colorantes empleados no son específicos para el ADN de *Plasmodium*; los estudios realizados muestran el uso exitoso del método de cuantificación con SGI en la evaluación de aislados de *P. falciparum*; sin embargo, se ha generado controversia sobre la capacidad del método para medir la susceptibilidad *in vitro* en muestras en sangre entera (Smilkstein et al., 2004, Moneriz et al., 2009; Vossen et al, 2010; Grimberg, 2011).

El método fluorométrico con SGI muestra una correlación directa y lineal entre el porcentaje de parasitemia y las Unidades de Fluorescencia Relativa (UFR), con r^2 de 0,93 a 0,99, independientemente de las cepas de *P. falciparum* utilizadas, las características de cultivo o el tipo de muestra utilizados; la cuantificación fluorométrica de ADN parasitario es simple, sensible y altamente específica debido a que el SGI, es un colorante de cianina que se une con alta avidéz al ADN de doble hélice de los parásitos y puede ser excitado a 488 nm usando un láser de luz visible comúnmente disponible en varios fluorómetros comerciales (Smilkstein et al., 2004; Johnson et al., 2007; Abiodum et al., 2010; Chaorattanakawee et al., 2013).

Una evaluación comparativa de los métodos SGI y HRP-2 ELISA para medir la susceptibilidad *in vitro* de *P. falciparum*, encontró similitudes en el límite de detección de muestras de sangre entera y las tradicionales muestras del cultivo; la sensibilidad del ensayo SGI fue menor en muestras con bajos porcentajes de parasitemia y en muestras enriquecidas con sangre entera (mayor fluorescencia de fondo y aumento en la variabilidad de los resultados), probablemente consecuencia de la unión de SGI al ADN de otras células presentes en la sangre entera, resultando esto particularmente problemático en cultivos de referencia de baja parasitemia (<1,0%) o muestras clínicas frescas de <0,2% de parasitemia, situaciones no comunes en el modelo farmacológico empleado en el tamizaje primario de actividad antiparasitaria (Vossen et al, 2010; Chaorattanakawee et al., 2013).

Reportes previos relacionados con evaluación fluorométrica, mediante citometría de flujo, en modelos *in vitro* de actividad frente a Plasmodium y Babesia generaron valores de

factor Z en el rango de 0,73 a 0,95, sugiriendo que el método fluorométrico podría ser adaptado a la lectura en un fluorómetro común (Guswanto et al., 2014).

Los estudios reportados empleando fluorimetría con SGI han mostrado resultados comparables a los métodos microscópico y radioisotópico, permitiendo el análisis de volúmenes grandes de muestras en corto tiempo; este método es simple, no produce materiales de desecho radiactivos y es altamente costo efectivo, reduciendo el costo de procesamiento de una placa de 96 pozos en casi 10 veces, comparado con los métodos radioisotópico o ELISA, por lo que en los últimos años se ha generalizado su uso para determinar el porcentaje de parasitemia, las CI_{50} y CI_{90} y la quimiosensibilidad parasitaria frente a diferentes antimaláricos (Bennett et al., 2004; Smilkstein et al., 2004; Johnson et al., 2007).

Trabajos previos hacen evidente la necesidad de conocer las capacidades y optimizar el método de fluorescencia como una prioridad para asegurar la calidad de los resultados generados; el método debe ser conocido no sólo en cuanto a su rango y linealidad sino que debe ser optimizado para mayor eficiencia, capacidad de detección, velocidad y bajo consumo de reactivos (Zhang et al, 1999; Guswanto, et al, 2014).

El grupo de investigación “Farmacología de la Medicina Tradicional y Popular” (FAMETRA), evalúa remedios empleados por las comunidades indígenas para el tratamiento de la malaria, a fin de determinar su potencial actividad antiplasmodial y antimalárica, empleando los modelos farmacológicos de malaria *in vitro*, de *P. falciparum*, e *in vivo* de malaria de roedores y utilizando el método microscópico para la determinación de la densidad parasitaria, lo cual resulta en una ardua labor derivada de requerirse el conteo de un número estadísticamente significativo de eritrocitos infectados, para garantizar su confiabilidad; lo anterior nos ha llevado a plantearnos la pregunta de si ¿El método basado en fluorimetría con SGI puede ser útil para la determinación de la densidad parasitaria por *Plasmodium* en los modelos farmacológicos de malaria *in vivo* e *in vitro*?

El presente trabajo buscó dar respuesta a este interrogante, adaptando el método fluorométrico con SGI para la determinación de la densidad parasitaria por *P. Falciparum*, descrito por Smilkstein et al., en 2004, a las condiciones experimentales de nuestro modelo *in vitro* y por primera vez determinar la capacidad y utilidad del método para su aplicación en el modelo farmacológico en roedores. En ambos modelos farmacológicos

se analizó el efecto del tiempo de incubación y la pre-lisis de las muestras; adicionalmente, en el modelo *in vitro* se evaluó el efecto que puede tener en los resultados diferentes características del cultivo (cultivos sincrónicos y asincrónicos) y en el modelo *in vivo* el tipo de muestra (sangre total o concentrado de eritrocitos). El análisis de las muestras se realizó en el lector de fluorescencia LB 970 Twinkle (BERTHOLD-Technologies. GmbH & Co.KG.), con ondas de emisión y excitación de 485 nm y 535 nm, respectivamente.

Objetivos:

Objetivo General:

Estandarizar un método de lectura por fluorimetría para la determinación de la densidad parasitaria en los modelos farmacológicos de malaria *in vitro* e *in vivo*.

Objetivos específicos

- a. Adaptar el método de lectura por fluorimetría, a las condiciones experimentales del Grupo de investigación “Farmacología de la medicina tradicional y popular” (FaMeTra) del Departamento de Farmacia de la Universidad Nacional de Colombia, en el modelo farmacológico *in vitro*.
- b. Adaptar el método de cuantificación de densidad parasitaria por fluorimetría en el modelo farmacológico en roedores.
- c. Estandarizar el método de lectura por fluorimetría para los modelos farmacológicos de malaria *in vivo* e *in vitro* como posible herramienta para la evaluación de sustancias con potencial actividad antimalárica.

1.MALARIA

1.1 Generalidades

La malaria es una enfermedad ocasionada por los parásitos protozoarios del género Plasmodium, familia Plasmodidae del phylum Apicomplexa, capaces de infectar a diferentes clases de vertebrados; se han descrito más de 175 especies, pero solo 5 producen la enfermedad en el hombre: *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. ovale*, *P. malariae* y *P. knowlesi* (WHO, 2014; Botero y Restrepo, 2003; Gómez, 2010).

En el año 2013 la malaria junto a las infecciones de vías respiratorias bajas, la infección por VIH/SIDA, las enfermedades diarreicas y la tuberculosis, fueron responsables de casi la tercera parte de las muertes en países en vías de desarrollo, afectando principalmente a niños menores de cinco años; su alta prevalencia en estos países ha sido asociada factores tales como la pobreza, el nivel de alfabetización y deficiencias de saneamiento y nutricionales (WHO, 2014; OMS, 2014a). Otros factores relacionados con la morbimortalidad por malaria son: la insuficiencia o inexistencia de infraestructura hospitalaria, problemas de cobertura en salud, así como las dificultades de acceso de la población a los medicamentos antimaláricos y a las acciones de prevención, diagnóstico y tratamiento, que en ocasiones tienen mayor impacto en regiones de riesgo bajo o nulo, que en las zonas de alto riesgo (prevalencia del parásito $\geq 5\%$, en niños de 2-9 años) (WHO, 2014b).

Según la encuesta de hogares en África subsahariana 2011-2013, el nivel de ingresos y el bajo nivel educativo son factores predictores significativos en las brechas de cobertura en mosquiteros tratados con insecticidas (MTI), en tratamiento preventivo intermitente durante el embarazo (TPIe), en cuidado de la fiebre, en pruebas de diagnóstico y en recepción de terapias combinadas con derivados de la artemisinina CTDA; en 2010 de

los 198 millones de casos reportados a nivel mundial, 18'133.811, correspondieron a la región de África donde el 42,6% de la población vive con menos de un dólar al día (WHO, 2013; WHO, 2014).

“La malaria disminuye la fuerza laboral e incrementa el ausentismo escolar y la inestabilidad social, reduciendo la capacidad productiva y el nivel de ingresos de la población”; su control y erradicación se constituye como uno de los objetivos de desarrollo del milenio y es clave para el logro de al menos otros seis objetivos, que buscan hacer frente a la lucha contra la pobreza, el hambre, el analfabetismo, la degradación del medio ambiente, la discriminación contra la mujer y la reducción en 2/3 partes de la mortalidad de niños menores de 5 años entre 1990 y 2015 (Sachs & Malaney, citado en Garavito, 2003; ONU, 2000).

1.2 Situación epidemiológica

La malaria o paludismo, se padece de forma endémica en 104 países, 97 de los cuales actualmente tienen transmisión activa de la enfermedad; la población que presenta mayor riesgo corresponde a niños menores de 5 años y mujeres gestantes y aunque es una enfermedad altamente transmisible puede ser prevenida y tratada; el tratamiento a tiempo puede evitar complicaciones e incluso la muerte (WHO, 2014).

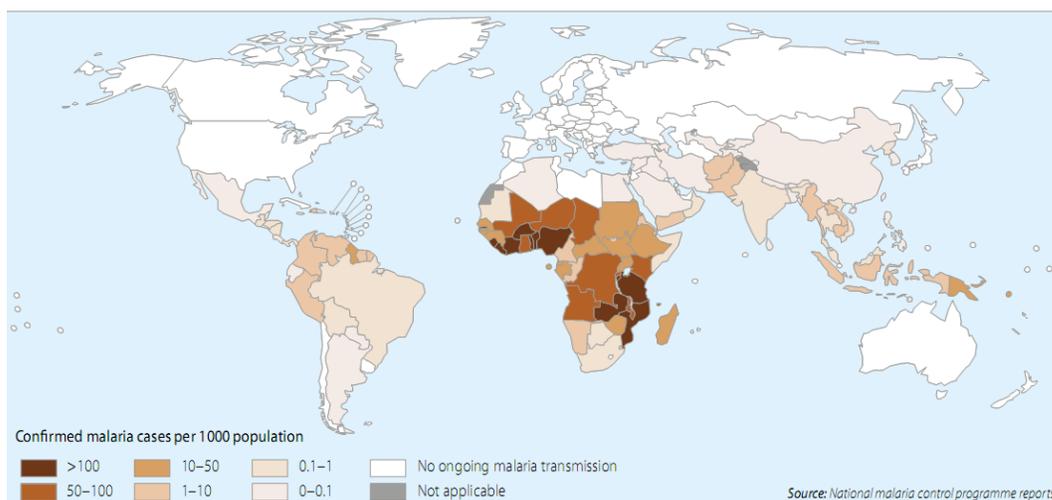


Figura 1. Países con transmisión activa de malaria, 2013 Tomado de: World Malaria Report, 2014.

P. vivax y *P. falciparum*, son las especies que ocasionan el mayor número de infecciones alrededor del mundo; la primera es responsable del 8% de las infecciones a nivel global, correspondiendo el 47% a infecciones fuera del continente Africano, de las cuales el 80% ocurrieron en tres países: India, Indonesia y Pakistán; sin embargo, *P. falciparum* ocasiona el mayor número de complicaciones y muertes y aunque está presente en 88 países con transmisión activa de paludismo tiene mayor prevalencia en el continente africano (WHO, 2014).

En la región de la Américas, durante el periodo 2000-2013, el número de casos confirmados de malaria paso de 1,2 millones a 427.000; de los casos reportados en 2013, el 30% correspondió a infecciones por *P. falciparum*, con incrementos notables en Guyana y Surinam (50%) y República Dominicana y Haití (100%), para el mismo año se notificaron 82 muertes resultando en una disminución del 79%, en comparación con el año 2000 (WHO, 2014). El mismo año 2013, 13 de los 21 países con transmisión activa reportaron una disminución mayor al 75% en la incidencia de casos confirmados por microscopia (Argentina, Belice, Bolivia, Costa Rica, Ecuador, El Salvador, Guatemala, Honduras, México, Nicaragua, Paraguay, Surinam y Guyana Francesa), y por tercer y segundo año consecutivo Argentina y Paraguay reportaron cero casos autóctonos (WHO, 2014).

En Colombia, para 2013, 7'150.000 personas habitaban en zonas de alto riesgo de transmisión de malaria (>1 caso/1000 habitantes) y 3'720.000 en zonas de bajo riesgo (<1 caso/1000 habitantes); de los 38.233 casos de malaria no complicada confirmados en 2014, 18.642 casos (49,60%), fueron producto de infecciones por *P. vivax*; *P. falciparum* produjo 18.343 casos (48,8%); *P. malariae* 8 casos (0,02%); y 525 casos (1,4%), fueron producto de infecciones mixtas (*P. falciparum*-*P. vivax*) (WHO, 2014; INS, 2014a; INS, 2014b).

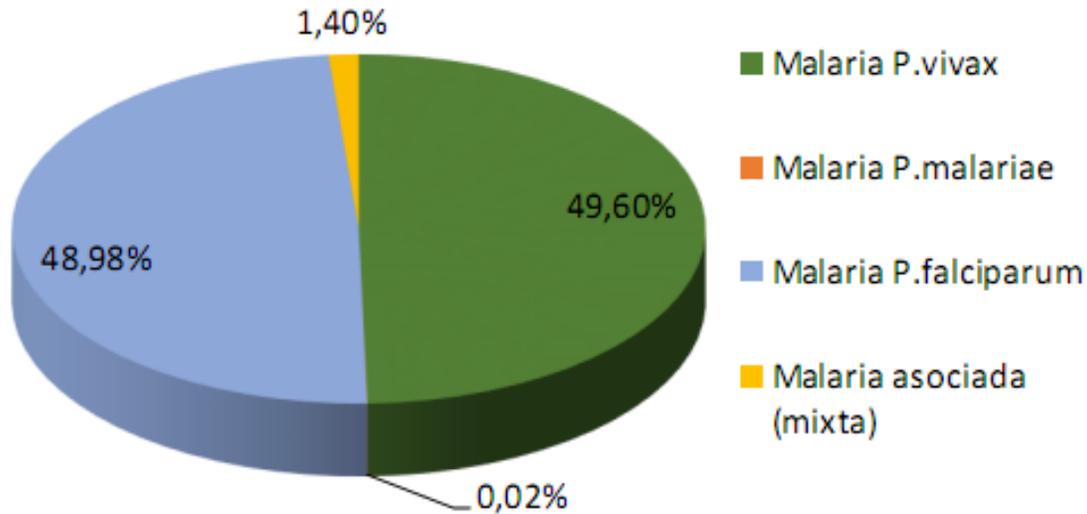


Figura 2. Proporción de casos de malaria no complicada en Colombia, por especie parasitaria a semana epidemiológica 51 de 2014. Tomado de: Boletín epidemiológico semanal. Número 51 de 2014.

En 2014, seis departamentos reportaron el 88,9% de los casos: Choco (41,6%), Antioquia (24,0%), Nariño (12,4%), Bolívar (4,4%), Córdoba (3,8%) y Amazonas (2,7%); los grupos étnicos más afectados son el afrocolombiano e indígena con el 48% y 15% de los casos, respectivamente, afectando principalmente a hombres (61,1%) con edades entre los 15 a 19 años (13,2%); para el mismo año 2014, la mortalidad por malaria incremento drásticamente pasando de 9 muertes en 2013 a 18 en 2014, las muertes por malaria se produjeron en los departamentos de Chocó, 8 muertes; Guaviare, Nariño y Valle del Cauca, 2 muertes cada uno; Cauca, Córdoba y Vichada, 1 muerte cada uno y Guainía con un caso procedente de Venezuela (INS, 2014b).

En 2015, hasta la semana epidemiológica 22 (31 de mayo a 6 de junio) se han reportado 14.237 casos de malaria no complicada, 287 casos de malaria complicada y cuatro casos de muerte por malaria (INS, 2015)

1.3 Estrategias para la erradicación y control del paludismo.

Las estrategias de control y eliminación de la malaria se centran en el control del vector, para reducir la transmisión de la enfermedad y en la eliminación parasitaria; los métodos de control vectorial más comúnmente empleados son el uso de mosquiteros tratados con insecticidas (MTI), y la fumigación intradomiciliaria; mientras que para la eliminación del parásito se recurre a la quimioprevención y el manejo y tratamiento de personas infectadas. En 2013, en África subsahariana el uso de MTI produjo una reducción de la morbilidad y la mortalidad de 50 y 55%, respectivamente en niños menores de 5 años; adicionalmente esta medida preventiva tiene un efecto positivo en la disminución de la mortalidad por infecciones respiratorias, malnutrición y bajo peso al nacer y contribuye con la disminución de la anemia y el riesgo de la infección placentaria en mujeres gestantes (WHO, 2014).

La quimioprevención abarca tres estrategias para cobertura de toda la población en riesgo de malaria; la primera medida es el tratamiento preventivo intermitente en el embarazo o IPTp por sus siglas en inglés (*Intermittent preventive treatment in pregnancy*) y consiste en la administración de sulfadoxina-pirimetamina (SP), en el segundo y tercer trimestre del embarazo, ayudando a reducir la anemia materna, el bajo peso al nacer y la mortalidad perinatal (WHO, 2014).

La quimioprevención estacionaria de malaria o SMC por sus siglas en inglés (*Seasonal Malaria Chemoprevention*), es la segunda estrategia y es usada para brindar cobertura a niños en edades entre los 3 a 59 meses, que representan el grupo de mayor riesgo de muerte por infección malárica, consiste en la administración de amodiaquina y sulfadoxina-pirimetamina (AQ-SP), la cual debe darse únicamente cuando las condiciones climáticas incrementen el riesgo de transmisión de la enfermedad (WHO, 2014).

La tercera y última estrategia es el tratamiento quimiopreventivo intermitente para infantes o IPTi, por sus siglas en inglés (*Intermittent Preventive Treatment for Infants*), basada en la administración de SP, que provee protección a menores de 5 años, reduciendo la anemia y la admisión hospitalaria por malaria; su administración se

recomienda exclusivamente en áreas con moderada y alta transmisión de malaria (inoculación entomológica ≥ 10), donde exista baja resistencia a SP y que no exista el uso concomitante de SMC (WHO, 2014).

A pesar de los logros alcanzados hasta el momento, la capacidad del vector y del parásito de generar resistencia a los insecticidas y medicamentos empleados para su control y erradicación, hacen evidente la necesidad de seguir trabajando en el descubrimiento y puesta en marcha de nuevas medidas de prevención y tratamiento a fin de lograr el control y, de ser posible, la erradicación de la enfermedad (WHO, 2014).

1.4 Ciclo biológico

El parásito tiene dos ciclos claramente diferenciados; el primer ciclo “esporogónico o exógeno” corresponde a la fase sexuada y se lleva a cabo en el tracto digestivo de la hembra del mosquito *Anopheles*, mientras que el segundo ciclo “esquizogónico o endógeno”, corresponde a la fase asexual que se desarrolla en el hombre (Romero, 2007; Botero, 2003).

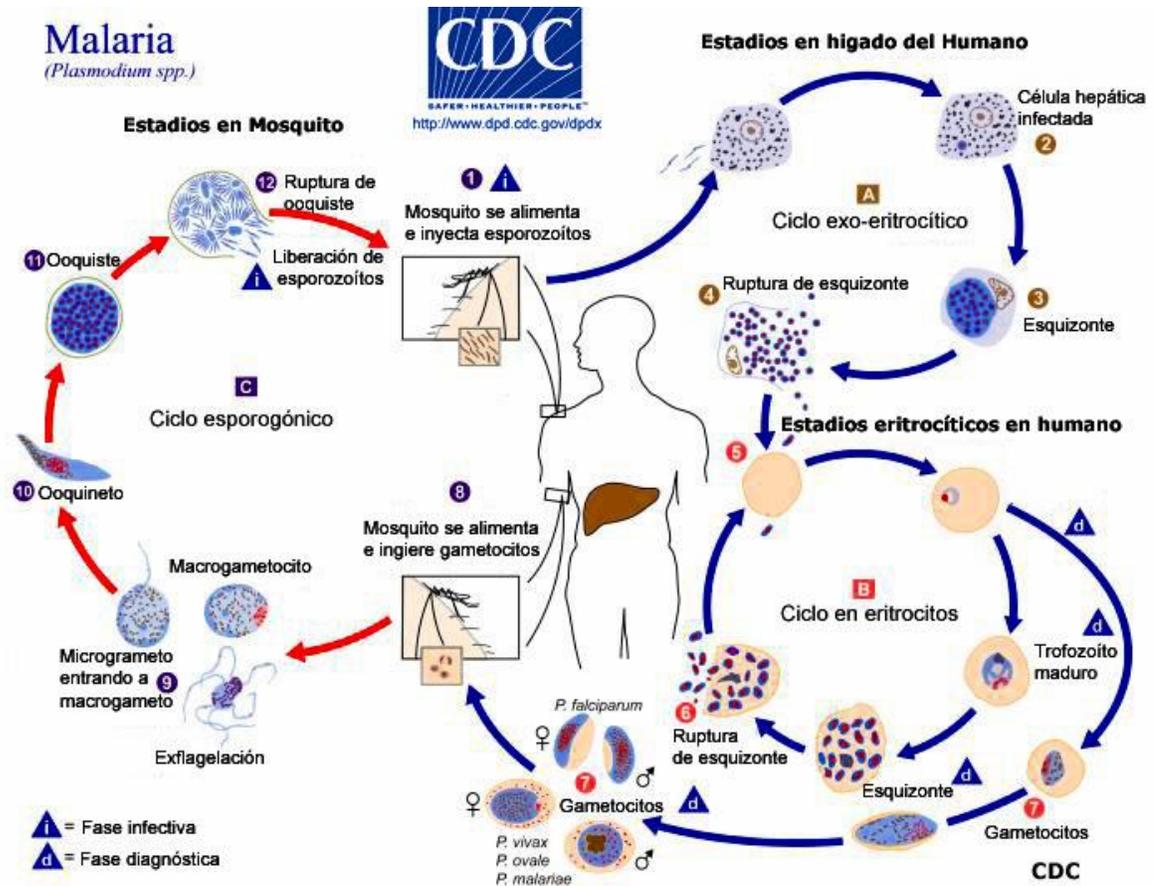


Figura 3. Ciclo biológico de la malaria.
Tomado de: <http://www.cdc.gov/malaria/about/biology/>

El ciclo esporogónico inicia cuando la hembra del mosquito *Anopheles* pica a una persona infectada e ingiere gametocitos, una vez en el intestino del mosquito, el macrogametocito madura a macrogameto, mientras que el microgametocito fragmenta su núcleo originando los flagelos (exflagelación); posteriormente los flagelos se separan dando origen a los microgametos (células sexuales masculinas maduras), que penetran dentro del macrogameto fecundándolo (Romero, 2007).

La fecundación del macrogameto da origen al ooquineto o huevo móvil que penetra la pared intestinal situándose entre las capas muscular y epitelial donde crece para formar el ooquiste que a su vez lleva a cabo la síntesis de ADN generando miles de esporozoitos que posteriormente son liberados a la hemolinfa donde muchos son desplazados hasta las glándulas salivares y posteriormente inoculados al hombre cuando este es picado por el mosquito (Botero y Restrepo, 2003).

El ciclo esporogónico inicia cuando el hombre es picado por el mosquito y le son inoculados los esporozoitos que rápidamente migran a la circulación general y de allí al hígado donde invaden a los hepatocitos, dentro del hepatocito los esporozoitos se multiplican dando origen a miles de merozoitos que son liberados a la circulación general e invaden los eritrocitos. En *P. vivax* y *P. ovale*, algunos esporozoitos permanecen de forma latente dentro del hepatocito (hipnozoitos), siendo responsables de las recaídas en estas especies (Romero, 2007; Botero y Restrepo, 2003).

La invasión del eritrocito da inicio al ciclo eritrocitario, los merozoitos cambian de forma a trofozoitos y mediante fragmentación nuclear dan origen al esquizonte, que a su vez presenta dos fases, esquizonte inmaduro y esquizonte maduro, generando la ruptura del eritrocito y la liberación de merozoitos que invaden nuevos eritrocitos e inician un nuevo ciclo eritrocitario; en *P. falciparum*, *P. vivax* y *P. ovale*, el ciclo ocurre cada 48 horas y en *P. malariae* cada 72 horas (Botero y Restrepo, 2003; Romero, 2007).

Durante el ciclo eritrocitario algunos merozoitos no invaden los glóbulos rojos sino que evolucionan a gametocitos (micro y macrogametocitos) circulando como formas infectantes para el mosquito sin producir sintomatología al hombre, su aparición y permanencia depende de la especie infectante, en la infección por *P. falciparum* aparecen de 1 a 3 semanas de iniciada la parasitemia sexual y desaparecen de 4 a 6 semanas después de terminada, mientras que para *P. vivax* aparecen y desaparecen al mismo tiempo que las formas asexuadas (Botero y Restrepo, 2003).

1.5 Agente etiológico:

La enfermedad malárica es ocasionada por esporozoarios del orden Eucoccida, familia Plasmodidae, género Plasmodium (Botero y Restrepo, 2003). Se han descrito más de 120 especies capaces de infectar a vertebrados, pero solo cinco transmiten la enfermedad al hombre: *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. ovale*, *P. malariae* y *P. knowlesi* (Gómez, 2010).

- ***P. falciparum***: Causa la forma más grave de enfermedad malárica, conocida como “fiebre terciana maligna o perniciosa”; invade los glóbulos rojos (GR) de

todas las edades, llegando a alcanzar rápidamente parasitemias de 30% o mayores, su periodo de incubación de 11 a 14 días y puede producir infecciones complicadas en el 5% de los casos, que si no son adecuadamente diagnosticadas y tratadas, ocasionan la muerte del enfermo en corto tiempo (Botero y Restrepo, 2003; Romero, 2007; WHO, 2013).

- ***P. vivax***: causante de fiebre terciana benigna, caracterizada por ataques clínicos leves y baja mortalidad; sin embargo, en los últimos años el número de reportes de complicaciones y muertes ha incrementado notablemente, sin que hasta el momento haya claridad de los factores que lo ocasionan (WHO, 2014). Esta especie posee un estadio hepático latente que favorece la supervivencia del parásito en periodos en los que no hay transmisión por vectores, pudiendo ocasionar recaídas posteriores a la presencia de la primera infección; su periodo de incubación es de entre 5 y 15 días y es responsable del 8% de los casos a nivel mundial (Botero y Restrepo, 2003, Romero, 2007; MPS, 2010; WHO, 2014).
- ***P. ovale***: las infecciones ocasionadas por esta especie pueden ser fácilmente confundidas con las producidas por *P. vivax*, ya que poseen características similares; sin embargo, la prevalencia y la severidad de la infección es mucho menor para *P. ovale*, por lo que es fundamental la correcta identificación de la especie a fin de evitar errores en el diagnóstico y tratamiento que puedan generar complicaciones en el estado de salud del paciente (Gómez, 2010).
- ***P. malariae***: esta especie es responsable de la fiebre cuartana benigna, caracterizada por la producción de paroxismos cada cuatro días, tiene un periodo de incubación de 18 a 40 días y al igual que *P. vivax* y *P. ovale*, puede producir recrudescencias meses o incluso años después de la primera infección (Gómez, 2010).
- ***P. Knowlesi***: es una especie de *Plasmodium* de primates descrita en 1931, para la que se reportó por primera vez una infección en humanos, en 1965; aunque las infecciones por esta especie son poco frecuentes el número de reportes ha

ido en aumento especialmente en Malasia, Tailandia, Filipinas y Singapur (Gómez, 2010).

1.6 Fisiopatología y manifestaciones clínicas de la enfermedad

La fisiopatología de la malaria se debe en gran medida al daño eritrocitario, su severidad deriva de la especie infectante, la densidad parasitaria y el estado inmune de la persona infectada. Las especies que infectan al hombre pueden llevar a complicaciones clínicas, siendo más frecuentes las ocasionadas por *P. falciparum*, la más grave complicación causada por esta especie es la llamada malaria cerebral, producto del ingreso del parásito al sistema nervioso central y por la respuesta inmune inflamatoria local generada por el paso del mismo a través de la barrera hematoencefálica (Romero, 2007; Gómez, 2010; Campuzano y Blair, 2010).

La invasión de los eritrocitos es mediada por receptores de membrana eritrocitarios que se adhieren a la cubierta de superficie del cono apical del merozoíto; cuando el parásito se adhiere al eritrocito vierte productos que rompen temporalmente la integridad de la membrana eritrocitaria, formando una vacuola parasitófora que favorece el ingreso del merozoíto; en la infección por *Plasmodium*, la pérdida de elasticidad, el incremento de la adherencia al endotelio capilar y el aumento de la fragilidad eritrocitaria, dificultan su tránsito a través de los capilares por la formación de rosetas y trombos, produciendo hemólisis, anoxia, anemia progresiva, vasodilatación con aumento de la permeabilidad capilar, deficiencia en la formación de factores de coagulación y disfunciones metabólicas (Botero y Restrepo, 2003).

El pigmento palúdico y el cuerpo residual, como productos de desecho del metabolismo de *Plasmodium*, son liberados a la circulación tras la ruptura de los eritrocitos infectados incrementando la hemólisis y acumulándose en los órganos alterando su correcto funcionamiento, produciendo complicaciones inmunológicas y acumulación de pigmento malárico en diferentes órganos, principalmente en el bazo, el hígado, la médula ósea, los riñones, los pulmones y el cerebro (Botero y Restrepo, 2003).

1.6.1 Manifestaciones clínicas

En infecciones no complicadas, ocasionadas por *Plasmodium*, los signos y síntomas son poco específicos por lo que la anamnesis es clave en la determinación del riesgo y en la identificación de la enfermedad; es frecuente la presencia de fiebre, escalofríos, cefalea, mialgias, artralgias, debilidad, vómito y diarrea; puede haber presencia de esplenomegalia, anemia, leucopenia, trombocitopenia, inmunosupresión y coagulopatía; los síntomas clásicos de la malaria resultan de un estado inflamatorio sistémico producto de la ruptura del esquizonte y la liberación de la molécula parasitaria glicosil-fosfatidilinositol (GPI), que estimula a los macrófagos e incrementa la producción de citoquinas proinflamatorias y del factor de necrosis tumoral alfa - TNF- α (Gómez, 2010; Botero y Restrepo, 2003; MPS, 2010; Campuzano y Blair, 2010).

El paroxismo palúdico producto de la hemólisis de glóbulos rojos, ocurre cada 48 a 72 horas dependiendo de la especie de infectante; en presencia de infecciones mixtas (ocasionadas por más de una especie de *Plasmodium*), puede haber variación en la periodicidad. El acceso febril es precedido por escalofríos, con presencia de bradicardia, cianosis e hipotensión; durante el periodo febril la temperatura puede alcanzar los 41,5°C; en niños es común la presencia de náuseas, vómito y convulsiones, luego de 4 a 6 horas, hay sudoración excesiva y disminución de la temperatura, el paciente suele sentirse sediento y exhausto por el excesivo consumo energía (5.000 calorías en 10 horas), posteriormente siente una marcada mejoría hasta el inicio del próximo acceso febril (Botero y Restrepo, 2003; Romero, 2007).

1.6.2 Fisiopatología de malaria severa por *Plasmodium falciparum*

Las manifestaciones y complicaciones de las infecciones ocasionadas por *P. falciparum*, se deben en gran medida al secuestro de parásitos a la microcirculación lo que evita que puedan ser depurados en el bazo e incrementa su multiplicación; se ha descrito al menos cuatro mecanismos involucrados en el secuestro parasitario: citoadherencia, donde los eritrocitos infectados presentan en la superficie de su membrana protuberancias o *Knobs* con alta concentración de la proteína de membrana eritrocitaria 1 de *P. falciparum* (PfEMP-1); 2. Formación de rosetas (unión de eritrocitos infectados y no infectados); 3. Disminución de la maleabilidad del eritrocito, y 4. Colección de parásitos en la matriz de

proteoglicanos en la superficie de la placenta en casos de malaria placentaria (Campuzano y Blair, 2010).

En las infecciones severas por *P. falciparum* puede haber presencia de una o más de las siguientes manifestaciones clínicas: hiperparasitemia (100.000 o más parásitos por mm³, o densidad parasitaria mayor al 5%), malaria cerebral, anemia severa (hematocrito < 20% y/o hemoglobina < 7,1 g/dL), ictericia, desequilibrio electrolítico, falla renal y hepática, hipertermia, falla respiratoria, hemorragias, vómito incontrolable, edema pulmonar, hipoglucemia y hemoglobinuria (Botero y Restrepo, 2003).

La insuficiencia renal se caracteriza por hipovolemia con oliguria (eliminación menor a 400 mL en 24 horas o 12 mL/Kg/24h) o anuria (eliminación menor a 50 mL/24h); suele ser aguda y reversible, el daño renal es producto de lesión glomerular y nefritis; en casos severos puede presentarse uremia, hipocalcemia e hiponatremia (125 a 135 milimoles/L); los exámenes de laboratorio pueden mostrar valores de creatinina en suero ≥ 3 mg/dL (Botero y Restrepo, 2003).

La malaria cerebral, es la complicación más grave de las infecciones por *P. falciparum*, se presenta alteración en el estado de conciencia que puede ir desde obnubilación hasta coma profundo, su desarrollo se ha relacionado con la expresión de la PfEMP-1 con alta afinidad por las moléculas de adhesión intracelular-1 (ICAM-1) (Campuzano y Blair, 2010).

Entre los signos y síntomas de la malaria cerebral se destacan: cefalea intensa, manifestaciones neurológicas (delirio, espasticidad, hiperreflexia, Babinsky positivo, disartria, ataxia, clonus, alteraciones de la sensibilidad superficial, incontinencia, convulsiones tónico clónicas parálisis facial, trismus), en ocasiones pueden presentarse hemorragias producto de la coagulación intravascular diseminada (Botero y Restrepo, 2003; Gómez, 2010).

En infecciones tratadas la mortalidad puede ser de entre 10 a 30% y sin tratamiento puede presentarse en el 80% de los casos entre 24 a 72 horas; se ha descrito el desarrollo de secuelas neurológicas tales como monoparesias, ceguera cortical, alteraciones del comportamiento, polineuropatía, dificultades en el lenguaje y edema

cerebral, afectando principalmente a niños con alrededor del 17,7% de los casos (Botero y Restrepo, 2003; Gómez, 2010).

Aunque no hay claridad acerca de los mecanismos que conllevan el desarrollo de malaria cerebral, se reconocen dos hipótesis, la primera apunta al bloqueo mecánico de los vasos cerebrales por eritrocitos parasitados, mientras que la segunda plantea la malaria cerebral como una respuesta inmune de tipo inflamatorio, que produce la liberación de factores de adhesión endotelial que afectan la permeabilidad de las membranas favoreciendo la producción de hemorragias y salida de líquido del cerebro (Gómez, 2010).

1.7 Diagnóstico de malaria

El diagnóstico de malaria se establece por la visualización del parásito en un extendido de sangre periférica teñido con Giemsa o por la detección de antígenos parasitarios mediante pruebas de diagnóstico rápido (PDR); en 2009, la OMS, estableció como condición necesaria para el inicio del tratamiento la realización de al menos una de estas pruebas, sin embargo cuando no es posible su realización el tratamiento podrá iniciarse fundamentado en criterios clínicos y epidemiológicos para disminuir el riesgo de complicaciones y mortalidad (Gómez, 2010; Botero y Restrepo, 2003; Romero, 2007; MPS, 2010; Campuzano y Blair, 2010).

La microscopía es considerada como estándar de oro para el diagnóstico de malaria, y es la prueba más ampliamente difundida por su alta efectividad, sensibilidad y bajo costo; permite el diagnóstico aún en presencia de densidades parasitarias bajas (5-10 parásitos/ μ l de sangre), la identificación de la especie, estadio de desarrollo parasitario y presencia de granulaciones en los glóbulos rojos (GR); su efectividad puede verse afectada por la experiencia del microscopista, la parasitemia del paciente, la especie infectante y el tiempo destinado al diagnóstico (Gómez, 2010; Botero y Restrepo, 2003; Romero, 2007; MPS, 2010; Campuzano y Blair, 2010, WMR, 2014).

La prueba de gota gruesa debe ir acompañada de un extendido en una lámina portaobjetos, fijada y teñida para ser observada bajo el microscopio, la lectura debe

hacerse a partir del segundo tercio final donde los GR no estén superpuestos, para determinar el porcentaje de GR parasitados lo cual permite establecer un pronóstico, pacientes con porcentajes de parasitemia mayores al 1% tienen mayor riesgo de complicaciones (Gómez, 2010; Botero y Restrepo, 2003; Romero, 2007; MPS, 2010; Campuzano y Blair, 2010).

Otras pruebas diagnósticas como las PDR, emplean anticuerpos monoclonales para la detección de antígenos parasitarios, buscan la presencia pLDH, para detectar el género *Plasmodium*; pueden ser específicas para *P. falciparum* detectando la presencia de la enzima aldolasa o de HRP-2, expresada en la superficie de la membrana de los GR, o combinar HRP-2 y pLDH pan-malaria, para permitir diferenciar *P. falciparum* de otras especies. Las PDR resultan poco útiles en la detección de infecciones con baja densidad parasitaria <200 parásitos/ μ l en *P. falciparum* y *P. vivax*; proveen poca información sobre la severidad de la infección, resultan inútiles en determinación de la densidad parasitaria y pueden detectar antígenos circulantes aun cuando la infección ya ha sido erradicada dando como resultados falsos positivos, limitando su uso en el seguimiento de los pacientes tratados o que han recibido quimiopprofilaxis (Botero y Restrepo, 2003; Romero, 2007; MPS, 2010; Grimberg, 2011; WHO, 2014).

El diagnóstico de malaria empleando la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), no es usada de manera rutinaria para el diagnóstico debido a su mayor complejidad y elevado costo, esta prueba resulta especialmente útil para el diagnóstico ante la sospecha de un resultado falso negativo, para confirmar la especie infectante, monitorear la respuesta al tratamiento y en la identificación de cepas de *Plasmodium* con polimorfismos genéticos asociados a resistencia a antimaláricos (Campuzano y Blair, 2010).

En los últimos años, se ha incrementado notablemente el uso de PDR para el diagnóstico de malaria, especialmente África, donde su uso para el diagnóstico de la enfermedad paso del 47% en 2010 a 62% en 2013; sin embargo, el examen microscópico sigue siendo considerado como estándar de oro para el diagnóstico, durante el mismo año, se realizaron cerca de 197 millones de pruebas microscópicas. Con un incremento en el número de pruebas en 22 países con respecto a 2010 (WHO, 2014).

Figure 5.4 Number of microscopic examinations performed for malaria, by WHO region, 2000–2013

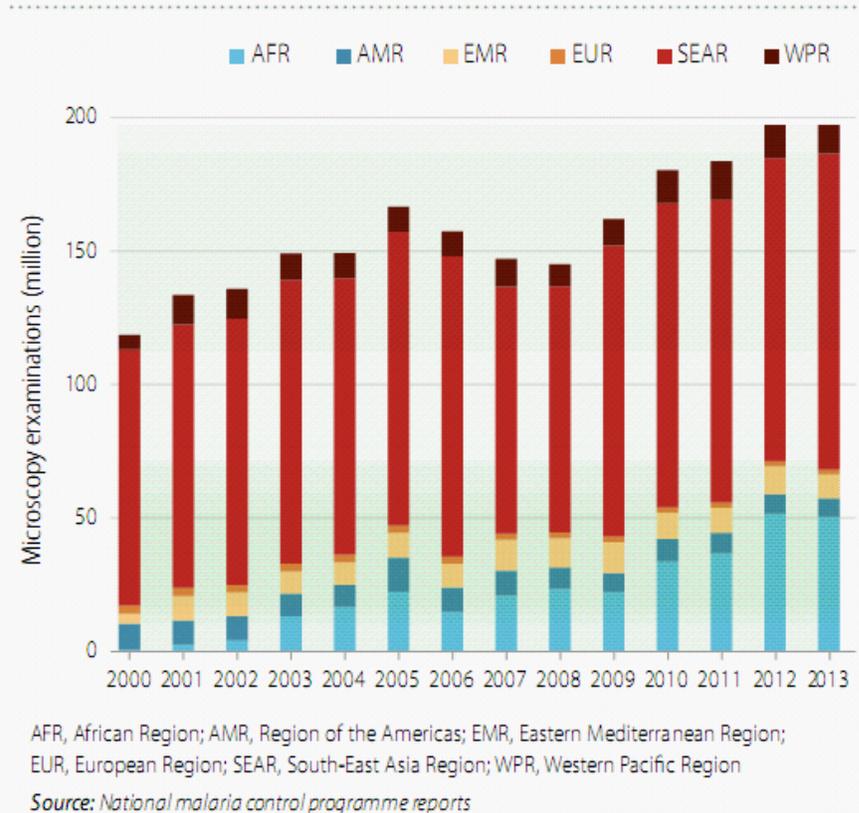


Figura 4. Exámenes microscópicos para diagnóstico de malaria 2000-2013
 Tomado de World Malaria Report 2014.

1.8 Tratamiento

Antes de iniciar el tratamiento farmacológico debe establecerse: el diagnóstico, gravedad de la enfermedad, especie causante, densidad parasitaria, tolerancia del paciente al tratamiento vía oral, edad, presencia de una gestación en curso, antecedentes de episodios maláricos y tratamientos anteriores (MPS, 2010).

Desde 2001, la OMS recomienda el uso de CTDA, como tratamiento de primera línea para los casos de malaria no complicada por *P. falciparum*, y el uso de cloroquina para el

tratamiento de malaria no complicada por *P. vivax*, combinado con la administración por 14 días de primaquina para prevenir las recaídas, en países donde no se ha reportado resistencia a estos agentes quimioterapéuticos. En Colombia no se ha reportado resistencia de *P. vivax* a la cloroquina por lo que la combinación de cloroquina y primaquina son el esquema de tratamiento de primera línea para el tratamiento de las infecciones ocasionadas por este agente (MPS, 2010; WHO, 2013).

1.9 Vigilancia, monitoreo y evaluación de la resistencia en malaria

Las actividades de vigilancia de la malaria y los datos aportados por los sistemas nacionales de monitoreo sirven como fuente para predecir las tendencias de la enfermedad especialmente en los temas relacionados con el control y la aparición de resistencia del parásito a los tratamientos (WHO, 2010; WHO, 2013).

La resistencia al tratamiento es la capacidad del parásito de sobrevivir y/o multiplicarse aunque el tratamiento haya sido administrado en dosis correctas y por el tiempo recomendado; *P. falciparum* ha desarrollado resistencia a amodiaquina, cloroquina, mefloquina, quinina, sulfadoxina-pirimetamina, a artemisinina en cuatro países de la subregión del gran Mekong (Camboya, Myanmar, Tailandia y Vietnam), y a los dos componentes de la CTDA en la provincia de Pailin en Camboya; *P. vivax* es resistente a sulfadoxina-pirimetamina en muchas regiones alrededor del mundo, y a cloroquina en Indonesia, Timor Oriental, Papua, Nueva Guinea y otras regiones de Oceanía (MPS, 2010; WHO, 2010; WHO, 2013).

Los estudios de efectividad terapéutica son considerados como “prueba de oro” para la determinación de la eficacia de los tratamientos antimaláricos y la aparición de resistencia, la información obtenida a través de estos estudios puede complementarse con estudios *in vitro* y el uso de marcadores genéticos que se constituyen como fuentes útiles de información acerca de la sensibilidad intrínseca del parásito y de la aparición de mutaciones genéticas que puedan relacionarse con el surgimiento de la resistencia a los

medicamentos antimaláricos (WHO, 2010); sea cual fuere el método empleado para obtener información acerca del comportamiento del parásito frente a los tratamientos antimaláricos siempre es necesario determinar el porcentaje de parasitemia, por lo que se requiere de un método confiable, efectivo, accesible y seguro y que además permita el análisis de volúmenes grandes de muestras en corto tiempo.

Por más de 100 años la determinación de la densidad parasitaria se ha basado en el recuento microscópico de eritrocitos de extendidos de sangre periférica teñidos con Giemsa; este método se ha usado desde 1904 y aún hoy es considerado como el “estándar” para el diagnóstico de malaria, porque además de permitir el conteo de los glóbulos rojos parasitados, contribuye en la identificación de la morfología del parásito (Bacon et al., 2007; Bennett et al., 2004; Grimberg, 2011).

La búsqueda de un nuevo método que permitiera reducir la subjetividad de la microscopia y el análisis de grandes cantidades de muestra en menor tiempo llevó al desarrollo del método de incorporación de la hipoxantina tritiada que requiere el uso de materiales radiactivos y de un mayor tiempo para la lectura ya que la incorporación de la hipoxantina solo se produce cuando se da la síntesis de ADN y esto ocurre en los estadios tardíos del ciclo de vida del parásito; adicionalmente su costo es elevado lo que lo hace poco práctico para ser usado rutinariamente especialmente en países donde la enfermedad es endémica y los recursos económicos son limitados (Grimberg, 2011; Smilkstein et al., 2004).

Otro método empleado para monitorear el crecimiento parasitario corresponde a los ensayos de ELISA usando anticuerpos monoclonales de *Plasmodium spp.* o pLDH y HRP-2; este método ha mostrado un desempeño similar al del método de la incorporación de la hipoxantina y aunque fácil de usar tiene como inconveniente la dificultad para la consecución de los kits, la realización de un protocolo de múltiples pasos, al igual que la hipoxantina requiere de un largo tiempo de incubación (72 horas) y su costo también es elevado para su uso rutinario en países donde la enfermedad se padece de forma endémica (Bacon et al., 2007; Grimberg, 2011).

Todos estos inconvenientes han hecho necesaria la búsqueda de métodos alternativos, es así que a partir de la década de los 80's se han evaluado métodos tales como el uso

de marcadores fluorescentes de ADN por ser especialmente útiles en la cuantificación de la parasitemia en malaria, debido a que los GR normales carecen de ADN propio, mientras el parásito si lo posee (Grimberg, 2011).

2. Determinación de las condiciones óptimas del método fluorométrico para la evaluación del porcentaje de parasitemia en los modelos farmacológicos de malaria *in vitro* e *in vivo*

La revisión de los hallazgos publicados previamente alrededor de esta metodología llevo a la selección del fluorocromo a emplear, el pH y la concentración de fluorocromo, para la cual se realizaron algunos ensayos preliminares que la fijaron en (2X) SGI/buffer de lisis (Smilkstein et al., 2004; Moneriz, et al., 2009; Izumiyama et al, 2009, Theron et al., 2010).

Para determinar el tiempo óptimo de tinción y obtener la mejor respuesta fluorescente, las muestras de sangre parasitadas y no parasitadas se sometieron a tiempos de incubación de 5 y 30 minutos, 1, 2, 4, 6, 24 y 48 horas; empleando como indicadores de desempeño los parámetros de la metodología.

2.1 Capacidad del ensayo: Linealidad y Rango

El método debe tener una adecuada relación lineal entre el porcentaje de parasitemia y la respuesta en URF a lo largo del rango de concentraciones parasitarias cuantificadas en el modelo farmacológico; la linealidad y rango del método en los modelos farmacológicos *in vitro* e *in vivo* se evaluaron a través de un análisis de regresión, la determinación del coeficiente de correlación y la pendiente; estos parámetros fueron empleados para determinar el rango de concentraciones parasitarias dentro de las cuales el método proporciona un grado aceptable de linealidad, exactitud y precisión (ICH, 1996).

La exactitud del método puede ser inferida una vez la precisión y la linealidad han sido establecidas, también puede ser reportada como la diferencia entre la media determinada por el método y el valor aceptado como real; la determinación de la concordancia entre dos métodos puede establecerse a través del método de análisis estadístico de Bland y Altman (Bland y Altman, 1986). En los modelos biológicos la calibración con cantidades conocidas del "analito" es difícil o imposible, por lo que los verdaderos valores permanecen desconocidos, entonces, un nuevo método debe evaluarse por comparación con un método establecido en lugar de frente a la cantidad verdadera; si el nuevo método concuerda bien con el antiguo, este último puede ser remplazado; en este caso la gráfica de las diferencias de los resultados de los dos métodos frente a su media permite investigar la relación entre los errores de medición y el valor verdadero.

2.2 Limite de detección (LD) y límite de cuantificación (LC)

El más bajo porcentaje de parasitemia que genere una señal fluorescente significativamente diferente de la generada por el control negativo (C-) se denomina límite de detección (LD); de la misma forma el límite de cuantificación (LC) corresponde al más bajo porcentaje de parasitemia que se puede cuantificar con exactitud y precisión aceptables (Moneriz et al, 2009).

2.3 Determinación de la calidad del método (Factor Z).

Para determinar la calidad del método los datos fueron sometidos al análisis estadístico propuesto por Zhang et al., en 1999, donde los datos generados por los controles positivo (C+ entendido como la máxima señal) y negativo (C- entendido como el ruido de fondo) así como su variabilidad se utilizan para determinar el rango dinámico de la señal; el factor Z es un parámetro estadístico que representa la separación de las distribuciones generadas por las señales de los controles positivo y negativo (Zhang et al., 1999).

En pruebas de tamizaje de fármacos el factor Z puede ser igual a uno, en un método ideal (variación en la respuesta igual a cero); valores entre 0,5 y 1 ($1 > Z > 0,5$) denotan un método excelente, con gran separación de banda; valores entre 0,5 y cero ($0,5 > Z > 0$) denotan un método bueno o de doble respuesta, con una separación de banda pequeña, mientras que valores iguales o inferiores a cero ($0 \geq Z$) indican que no hay separación entre las distribuciones haciendo prácticamente imposible un tamizaje farmacológico confiable (Zhang et al., 1999).

En este estudio, se describe la adaptación y optimización de un método fluorométrico, alternativo a la citometría en flujo, que empleando SGI y valiéndose de fluorómetros comúnmente disponibles en varios laboratorios, es confiable, robusto, rápido y accesible para la cuantificación de parasitemia en los modelos farmacológicos *in vitro* e *in vivo* de actividad antiplasmodial y antimalárica de sustancias o extractos de origen vegetal.

2.4 Materiales y Métodos

Reactivos: SYBR Green I a concentración 10.000X en DMSO, para tinción de ácidos nucleicos y qPCR fue adquirido a INVITROGEN y almacenado a -20°C ; una solución a 100X en DMSO se preparó previo a su uso. El buffer de lisis consiste en una solución de Tris (20 mM), EDTA (5 mM), saponina (0,008% [p/v]), y Triton X-100 (0,08% [v/v]), se preparó previamente, se ajustó a pH 7,5 y se almacenó a 4°C . Cloroquina difosfato se adquirió de Sigma y se preparó una solución madre a 10 mM. La cepa FCB2 de *P. falciparum* se obtuvo del Instituto Nacional de Salud; los glóbulos rojos humanos y el suero fueron gentilmente donados por Hemocentro Distrital. La cepa ANKA de *P. berghei* empleada en los estudios fue gentilmente donada por el instituto de inmunología de la Universidad del Valle, San Fernando (Garavito, 2003).

2.5 Modelo farmacológico de cultivo de *P falciparum*.

La cepa FCB2 se mantuvo en cultivo continuo en el laboratorio de acuerdo con la técnica descrita por Trager y Jensen (1976), con menores modificaciones. Los glóbulos rojos parasitados (GRP) se cultivaron en frascos de 25 mL (Corning Costar Corporation,

EE.UU.), que contenían 8,5 mL de medio RPMI 1640, 0,7 mL de suero humano, 0,1 mL L-glutamina y 400 mcL de sangre parasitada (hematocrito = 2%). La parasitemia se mantuvo entre 0,7 y 3% (alrededor de 2%). Los ajustes se hicieron con los glóbulos rojos no parasitados (GRNP) (Anexo A. apéndice 3). Los cultivos se incubaron a 37 °C en atmósfera 5% de CO₂, 5% de O₂ y 90% de N₂, y una humedad de alrededor del 90%. El medio fue renovado todos los días y un control microscópico de la parasitemia se llevó a cabo mediante la realización de un frotis de sangre fijado con metanol y coloreado con Giemsa, (Protocolo Anexo A. apéndice 3) (Deharo, 2000; Garavito, 2007).

La sincronización del cultivo se hizo con sorbitol 5% (Anexo A, apéndice 3)

2.5.1 Recuento de parasitemia por el método basado en fluorescencia.

En general, en un tubo falcón de 15 mL se adicionó 30 µL de GRP más 1.470 µL de PBS (hematocito del 2%); posteriormente se realizaron diluciones seriadas tomando 735 µL de la muestra inicial que se adicionaron a un nuevo falcón conteniendo 15 µL GRNP y 735 µL de PBS, este procedimiento se realizó cuantas veces fue necesario hasta lograr una parasitemia de 0,006 %; al finalizar las diluciones seriadas, de parasitemia 100 µL de cada suspensión de células se transfirieron a una microplaca de 96 pozos por quintuplicado, se adicionó 100 µL de solución de SGI/buffer de lisis a concentración 2X y la placa se incubó a 37°C en la oscuridad, acto seguido se determinó los valores de fluorescencia usando un fluorometro Twinkle LB 970. BERTHOLD_Technologies, con ondas de excitación y emisión de 485nm y 535nm, respectivamente. Los valores de ganancia se establecen en 100. Todas las muestras se procesaron por quintuplicado para tres experimentos independientes.

2.6 Modelo farmacológico *in vivo* de malaria murina

Los estudios *in vivo*, se realizaron de acuerdo con la legislación colombiana que rige el cuidado y uso de animales de laboratorio (Resolución N° 008430 de 1993). La cepa ANKA de *P. berghei* se mantuvo en ratones suizos machos de 20+/-2 g de peso, con agua y alimento *ad libitum* (Bioterio Departamento de Farmacia Universidad Nacional de Colombia). Los grupos de control positivo (C+) se infectaron por inyección intraperitoneal

de 10^7 GRP en solución salina normal 0,9%, como control negativo (C-) usaron animales sanos; la supervivencia de los ratones se supervisó a diario y el ensayo basado en fluorescencia se realizó el día 4 posterior a la infección (Anexo B).

2.6.1 Recuento de parasitemia por el método basado en fluorescencia.

Por punción retroorbital, se obtuvo aprox. 80 μ L de muestra parasitada, se centrifugó a 400g por 5 minutos, se retiró el plasma y se tomó una muestra de 30 μ L sin agotamiento de glóbulos blancos (que llamaremos en adelante sangre total); la muestra se puso en un tubo falcón de 15 mL con 1.470 μ L de PBS (1X), se realizaron diluciones seriadas de parasitemia agregando glóbulos rojos no parasitados, hasta lograr parasitemias de 0,006%, al 2% de hematocrito; en la placa de 96 pozos se adicionó 100 μ L de cada suspensión celular más 100 μ L de SGI (2X)/buffer de lisis, se incubó en la oscuridad a 37°C y se determinaron las UFR como se describió previamente.

2.7 Optimización del método.

Una vez adaptado el método a nuestras condiciones se procedió a su optimización; para ambos modelos se determinó el tiempo de incubación de las muestras con SGI, el resultado de un paso adicional de lisado de las muestras por choque térmico previo a la adición del tampón de lisis; adicionalmente, en el modelo farmacológico *in vitro*, se evaluó el efecto de trabajar con cultivos sincrónicos o asincrónicos, mientras que para el modelo *in vivo* se evaluó el tipo de muestra a emplear (sangre total o concentrado de eritrocitos); estas variables fueron estudiadas para establecer las condiciones óptimas buscando velocidad, eficiencia en la detección de la señal y bajo consumo de reactivos. El efecto de eventos aleatorios como diferentes días y analistas, en la precisión del procedimiento analítico fue estudiado a lo largo del rango del ensayo. La robustez y la calidad del ensayo (factor Z) fueron examinadas.

2.8 Estudio de las capacidades del método fluorométrico.

2.8.1 Modelo farmacológico *in vitro*.

Para estudiar el comportamiento de la fluorescencia generada en UFR, por diferentes porcentajes de parasitemia (%), GRP infectados por *P. falciparum* se diluyeron en serie con GRNP con el fin de ajustar las parasitemias en un rango aproximado entre 0,006% a 5,00%. GRNP fueron empleados como control negativo (C-).

2.8.2 Modelo farmacológico *in vivo*.

Para estudiar la relación entre las URF generadas y el porcentaje de parasitemia, las muestras parasitadas de sangre total, fueron serialmente diluidas con glóbulos rojos no parasitados para ajustar la parasitemia hasta 0,006%, GRNP se emplearon como control negativo (C-).

2.9 Determinación de las Unidades de fluorescencia relativa (UFR) bajo condiciones optimizadas

En una placa de 96 pozos se adicionó 100 μ L de cada dilución más 100 μ L de buffer de lisis conteniendo 2 μ L de SGI, la placa se incubo en la oscuridad a temperatura ambiente durante 2 h, acto seguido se determinó los valores de fluorescencia usando el fluorometro Twinkle LB 970. BERTHOLD_Technologies, con ondas de excitación y emisión de 485nm y 535nm, respectivamente. Todas las muestras se procesaron por quintuplicado para tres experimentos independientes.

Después de la sustracción del ruido de fondo (UFR de GRNP), las UFR correspondientes a cada porcentaje de parasitemia fueron graficados y analizados por regresión lineal. Un

extendido de cada muestras parasitada se coloreó con Giemsa para comprobar la parasitemia por microscopía.

La variabilidad se calculó como la desviación estándar. El límite de detección y el límite de cuantificación se calcularon basándose en la desviación estándar del blanco y la pendiente según lo indicado por las guías de la conferencia internacional de armonización (ICH 1996; Moneriz, 2009), mediante las ecuaciones:

$$LD = 3,3 \sigma / S \quad \text{y} \quad LC = 10 \sigma / S$$

Donde 3,3 es el valor t de student para un nivel de confianza de 95%, σ es la desviación estándar del blanco y S es la pendiente de la curva de calibración (ICH. 1996).

La calidad del método se determinó sometiendo los resultados a la prueba estadística descrita por Zhang et al. (1999), llamada factor Z, el cual se calcula de la siguiente manera:

$$Z = 1 - [(3\sigma_{(C+)} + 3\sigma_{(C-)}) / \mu_{(C+)} - \mu_{(C-)}].$$

Donde μ y σ son la media y la desviación estándar del control correspondiente (control positivo (C+) o (C-) referido al ruido de fondo), respectivamente y el denominador corresponde al valor absoluto de la diferencia en las medias de los controles positivo y negativo.

3. Adaptación del método de lectura por fluorometría, al modelo farmacológico *in vitro* de cultivo de *Plasmodium falciparum*.

Resultados y Discusión.

Los resultados obtenidos en el modelo *in vitro* evidencian que el proceso de tinción es robusto entre una y cuatro horas, determinándose como tiempo óptimo de tinción 2 horas; los límites de detección y cuantificación mostraron ser significativamente menores cuando se emplean cultivos asincrónicos. El análisis de los parámetros del método, bajo condiciones optimizadas, evidenció un ruido de fondo de 38%; la linealidad entre la respuesta en UFR y la parasitemia generada por *P. falciparum* mostro una elevada correlación, valor r^2 de 0,9841 y una pendiente de la recta 852,4, a lo largo de la gama de parasitemias normalmente cuantificadas por el método (0,5-5%). El análisis de precisión bajo el *Bland-Altman plot* evidenció concordancia entre los métodos fluorométrico con SGI y microscópico con Giemsa con una diferencia media de 0,09109% +/-0,26217; los límites de detección y cuantificación fueron 0,5% y 1,5% de parasitemia respectivamente. En relación con la calidad, el factor Z determinado para el ensayo fue de 0,376 evidenciando una separación de banda pequeña ($0,5 > Z > 0$).

3.1 Adaptación y optimización del método fluorométrico.

El método de cuantificación de parasitemia de *P. falciparum* mediante fluorometría, empleando el fluorocromo SGI fue adaptado a las condiciones propias de nuestro

modelo farmacológico de cultivo *in vitro* y prueba de tamizaje farmacológico de extractos o sustancias con promisoría actividad antiplasmodial; el protocolo de la valoración cuantitativa es presentado en el Anexo 1.

3.1.1 Capacidad del ensayo: Linealidad y Rango

Las curvas de concentración parasitaria vs respuesta fluorescente evidencian que en general se mantiene la linealidad a los diferentes tiempos de incubación evaluados; sin embargo los tiempos de incubación de 24 y 48 horas generan curvas diferentes de las otras, Figura 5.

La curva generada a las 48h de tinción presenta un comportamiento totalmente atípico en el cual parece perderse la proporcionalidad en la respuesta ante diferentes niveles de concentración parasitaria Figura 5 (C).

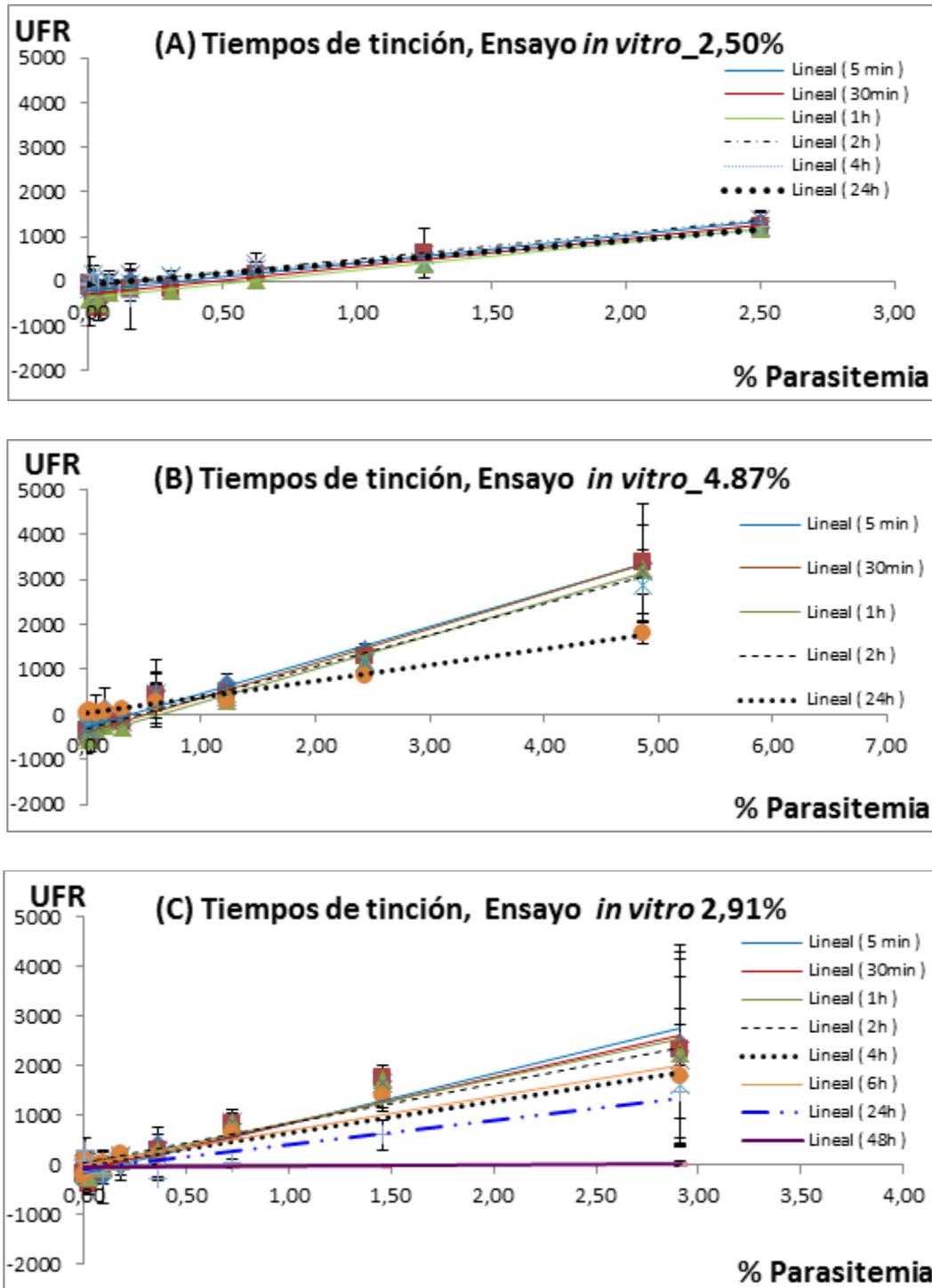


Figura 5. Optimización del tiempo de tinción, concentración parasitaria vs respuesta fluorescente (UFR).
 Todas las mediciones se realizaron en quintuplicado, se presentan resultados de tres muestras procesadas de forma independiente. Cada valor es procesado mediante sustracción de la fluorescencia de fondo.

La pendiente promedio de las curvas generadas a los diferentes tiempos de incubación muestra una marcada disminución después de las 6h, teniendo su valor mínimo a las 48h, periodo en el cual no se evidencia proporcionalidad en la respuesta fluorescente frente a las diferentes concentraciones parasitarias; la variabilidad en los datos es marcadamente alta en los tiempos de tinción de 5 y 30 min; los valores de 6 y 48h provienen de un solo ensayo independiente; frente a la pendiente generada el tiempo de tinción es robusto entre 1 y 6 h, Figura 6 (A).

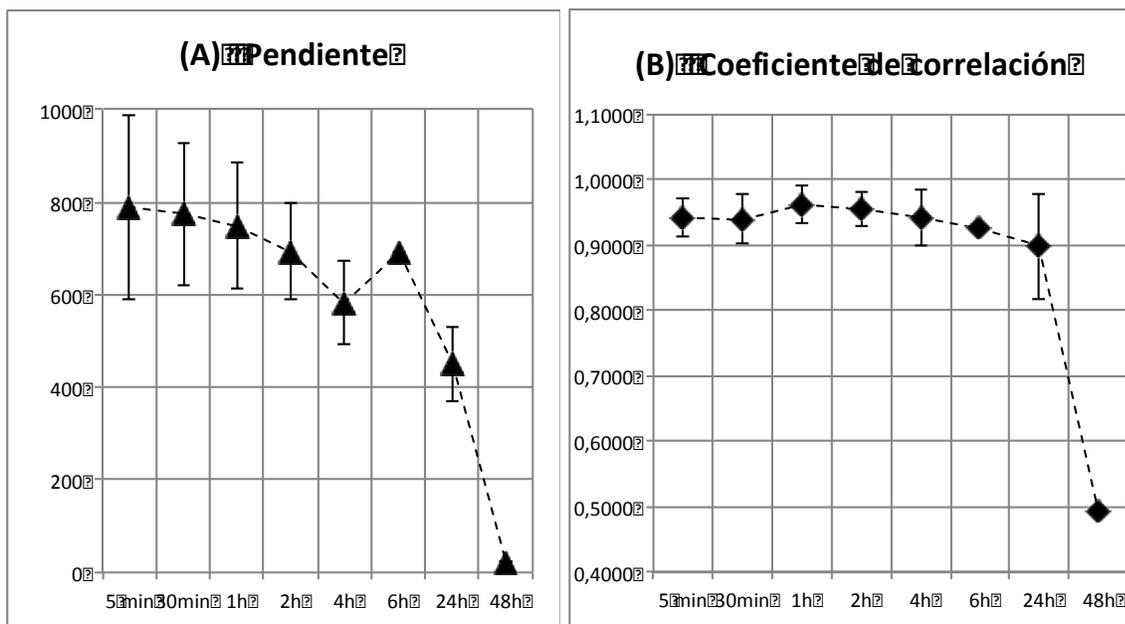


Figura 6. Optimización del tiempo de tinción, Pendiente (A) y Coeficiente de correlación (B).

Todas las mediciones se realizaron en quintuplicado, se presentan resultados de tres muestras procesadas de forma independiente. Cada valor es procesado mediante sustracción de la fluorescencia de fondo.

El coeficiente de correlación promedio de las curvas logradas a los diferentes tiempos de tinción evidencia una marcada disminución después de las 6h, con una alta variabilidad a las 24h y un valor mínimo a las 48h (0,49325) indicando una muy poca correlación de los puntos con la curva generada; frente al coeficiente de correlación el tiempo de tinción es robusto entre 5 min y 6 h, Figura 6 (B).

Los límites promedio de cuantificación y de detección presentaron alta variabilidad a los 5 min, se mantuvieron relativamente constantes entre 1h y 6 h y posterior a ello se

presenta aumento en la variabilidad y en los valores promedio de estos indicadores; los valores de 6h y 48h provienen de un solo ensayo independiente; el tiempo de tinción es robusto entre 1h y 4 h, Figura 7.

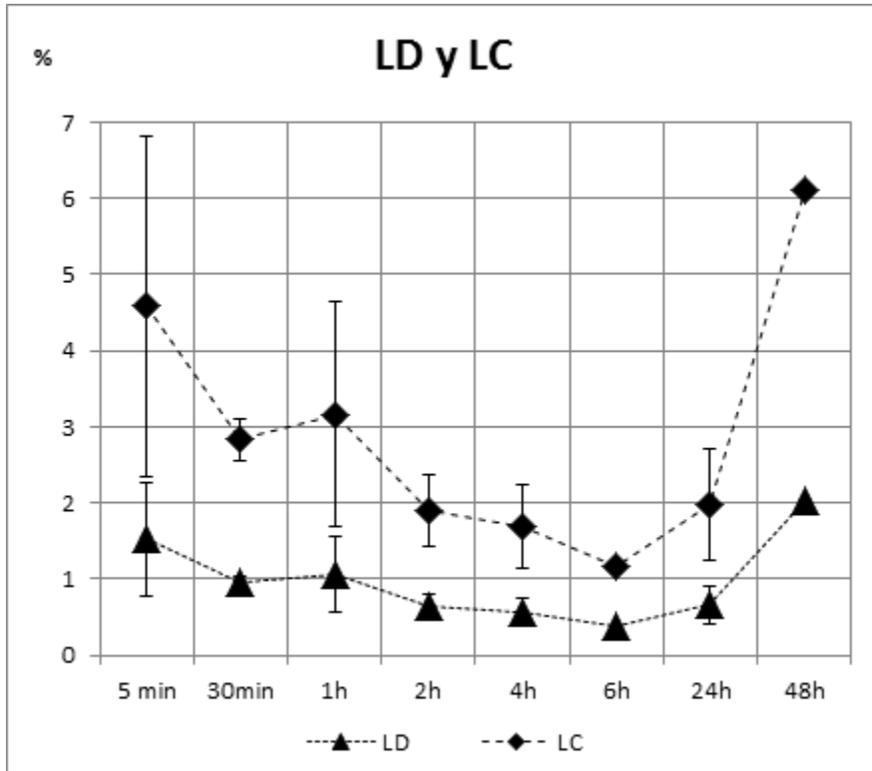


Figura 7. Optimización del tiempo de tinción, Limite de detección (LD) y Limite de cuantificación (LC).
 Todas las mediciones se realizaron en quintuplicado, se presentan resultados de tres muestras procesadas de forma independiente. Cada valor es procesado mediante sustracción de la fluorescencia de fondo.

El factor Z alcanzó valores entre 0,5 y 0,0 ($0,5 > Z > 0$), el promedio de concentración parasitaria mínima a la cual se logra calcular factor Z se mantiene relativamente constante entre 1h y 6h presentando una alta variabilidad a los 5 min, los valores se mantuvieron relativamente constante hasta las 6 h y posterior a ello se presenta variabilidad; en cuanto al factor Z el tiempo de tinción es robusto entre 1 y 6 h, Figura 8.

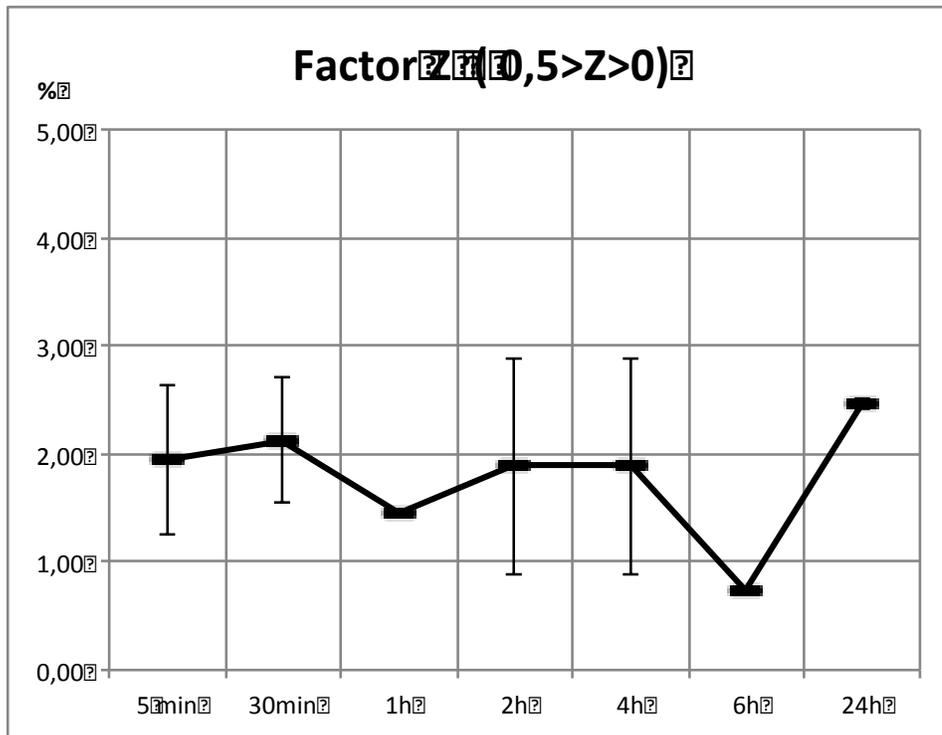


Figura 8. Optimización del tiempo de tinción, Concentración parasitaria mínima a la que se logra calcular el Factor Z.

Todas las mediciones se realizaron en quintuplicado, se presentan resultados de tres muestras procesadas de forma independiente. Cada valor es procesado mediante sustracción de la fluorescencia de fondo.

En general el tiempo de incubación es robusto entre 1h y 4h; por razones de velocidad, eficiencia se determina un tiempo óptimo de tinción de 2h.

El efecto de trabajar con cultivos sincrónicos o asincrónicos fue otra variable evaluada para establecer sus condiciones óptimas. En cultivo sincrónico es evidente que a bajas concentraciones parasitarias la fluorescencia generada por el C- tiende a ser superior a la de las muestras, generando valores inferiores a cero (al ser sustraída la fluorescencia del ruido de fondo), Figura 9. En cultivo asincrónico se logra acreditar fluorescencia en bajas concentraciones parasitarias, que es superior a cero evidenciando respuesta fluorescente superior a la del C-, Figura 9.

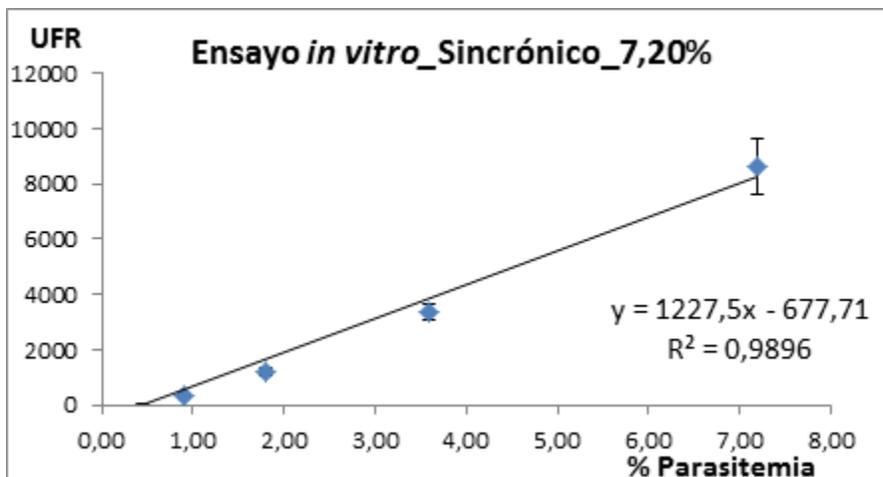
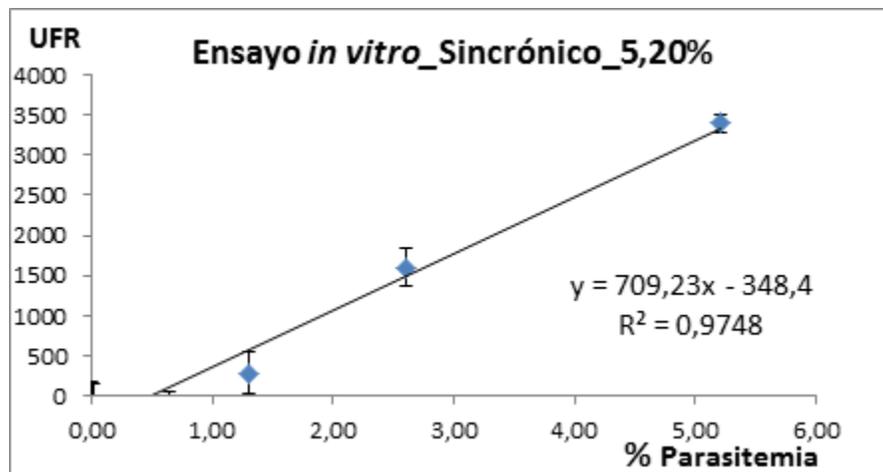
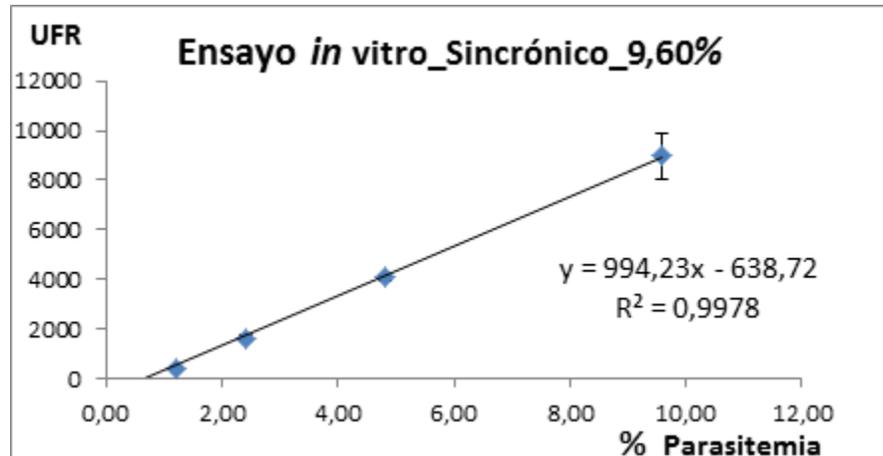


Figura 9. Optimización del tipo de cultivo Sincrónico, concentración parasitaria vs respuesta fluorescente.

Todas las mediciones se realizaron en quintuplicado, se presentan resultados de tres muestras procesadas de forma independiente. Cada valor es procesado mediante sustracción de la fluorescencia de fondo.

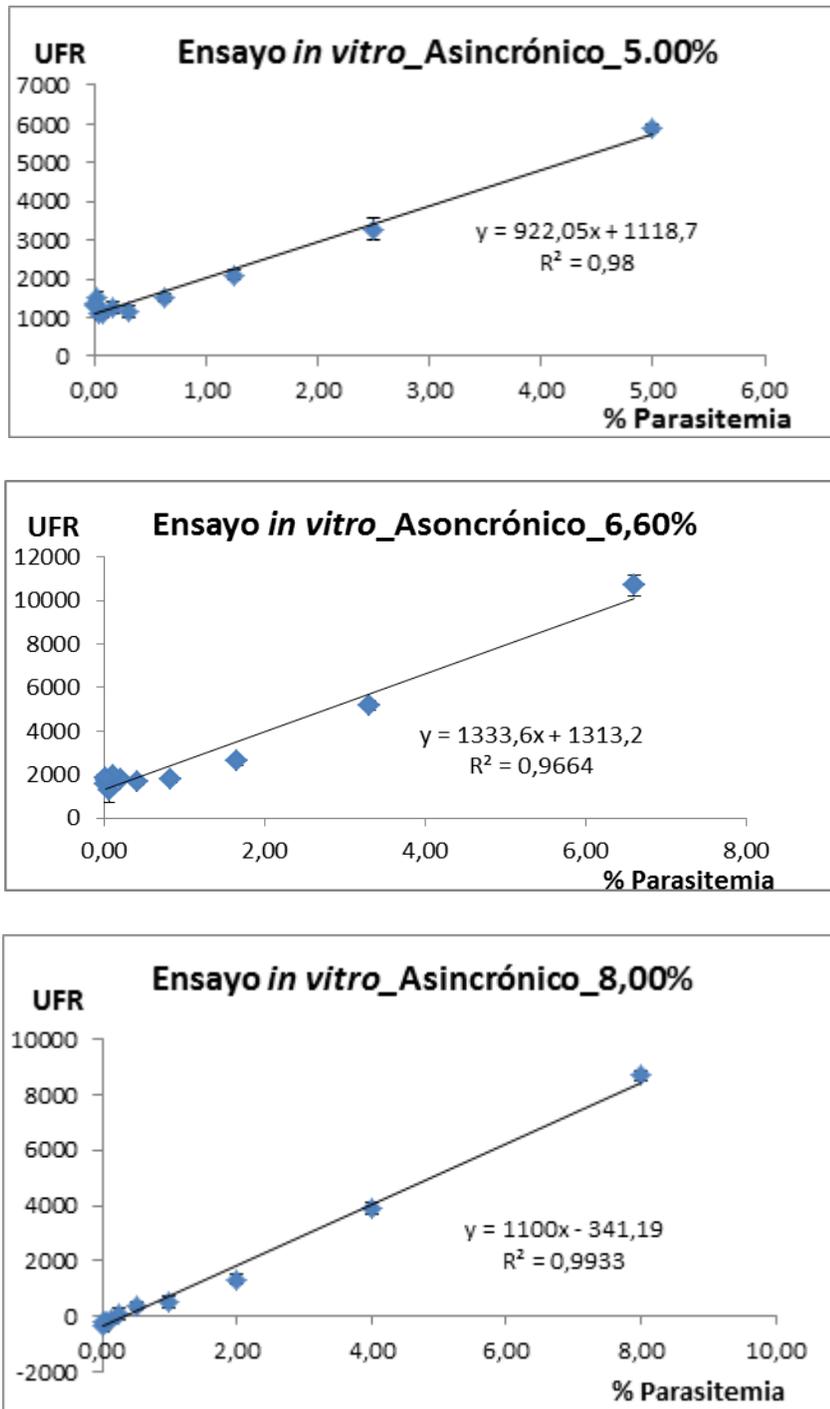


Figura 10. Optimización del tipo de cultivo Asincrónico, concentración parasitaria vs respuesta fluorescente.

Todas las mediciones se realizaron en quintuplicado, se presentan resultados de tres muestras procesadas de forma independiente. Cada valor es procesado mediante sustracción de la fluorescencia de fondo.

El empleo del cultivo asincrónico permite valorar concentraciones parasitarias menores a las que se logra evidenciar cuando se emplea el cultivo sincrónico.

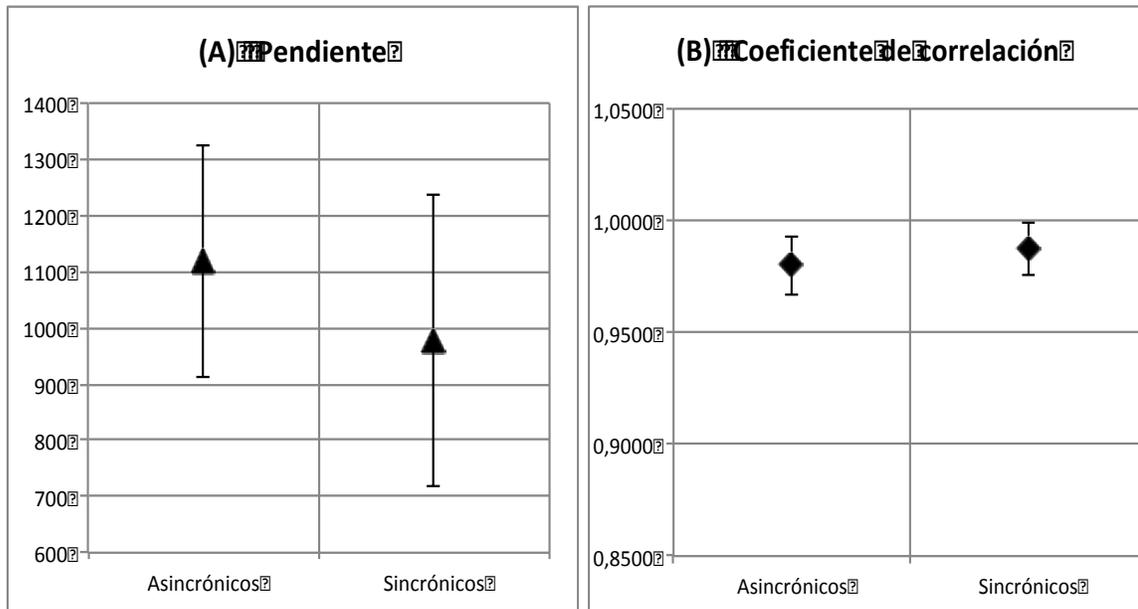


Figura 11. Optimización del tipo de cultivo Sincrónico o Asincrónico, Pendiente (A) y Coeficiente de correlación (B).

Todas las mediciones se realizaron en quintuplicado, se presentan resultados de tres muestras procesadas de forma independiente. Cada valor es procesado mediante sustracción de la fluorescencia de fondo.

Se presenta variabilidad en la pendiente de las curvas estudiadas, la cual puede ser derivada de procesos en el modelo farmacológico, derivados del comportamiento de la cepa y que deben ser ajustados. En cuanto a la pendiente y el coeficiente de correlación no son evidentes diferencias significativas derivadas del uso de cultivos sincrónicos o asincrónicos, Figura 11.

Los límites de detección y de cuantificación son significativamente inferiores cuando se emplea un cultivo asincrónico, frente a los encontrados con un cultivo sincrónico, confirmando que en el cultivo sincrónico a bajas concentraciones parasitarias la fluorescencia generada por el C- tiende a ser superior a la de las muestras, como se comentó anteriormente, Figura 12.

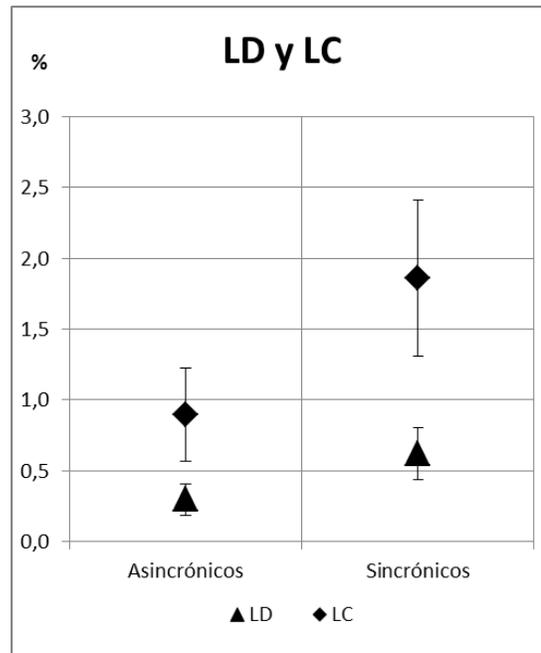


Figura 12. Optimización del tipo de cultivo Sincrónico o Asincrónico, Limite de detección (LD) y Límite de cuantificación (LC).

Todas las mediciones se realizaron en quintuplicado, se presentan resultados de tres muestras procesadas de forma independiente. Cada valor es procesado mediante sustracción de la fluorescencia de fondo.

El uso de cultivos sincrónicos facilita la valoración microscópica del parásito en estadios de anillos, sin embargo, la asincronía es el comportamiento biológico normal de *P. falciparum* en el hospedero humano. Nuestros resultados corroboran los hallazgos de Smilkstein et al., (2004), e Izumiyama et al., (2009), que demuestran que SGI permite diferenciar con una alta exactitud entre GRP y GRNP, en cultivos sincrónicos y asincrónicos, lo cual permitiría superar esta limitante.

3.2 Parámetros de la metodología.

La fluorescencia generada por los GRNP al contacto con el SGI es estable como ruido de fondo; bajo condiciones optimizadas, el control positivo (GRP) generó en promedio una respuesta de 4918 +/- 570 UFR en tanto que el control negativo (GRNP) en promedio presentó una fluorescencia de 1876 +/- 217. En relación a la señal generada por el

control C+ los GRNP originan una lectura de fluorimetría que corresponde al 35% (95% CI: 36-41%, n = 10), Figura 13.

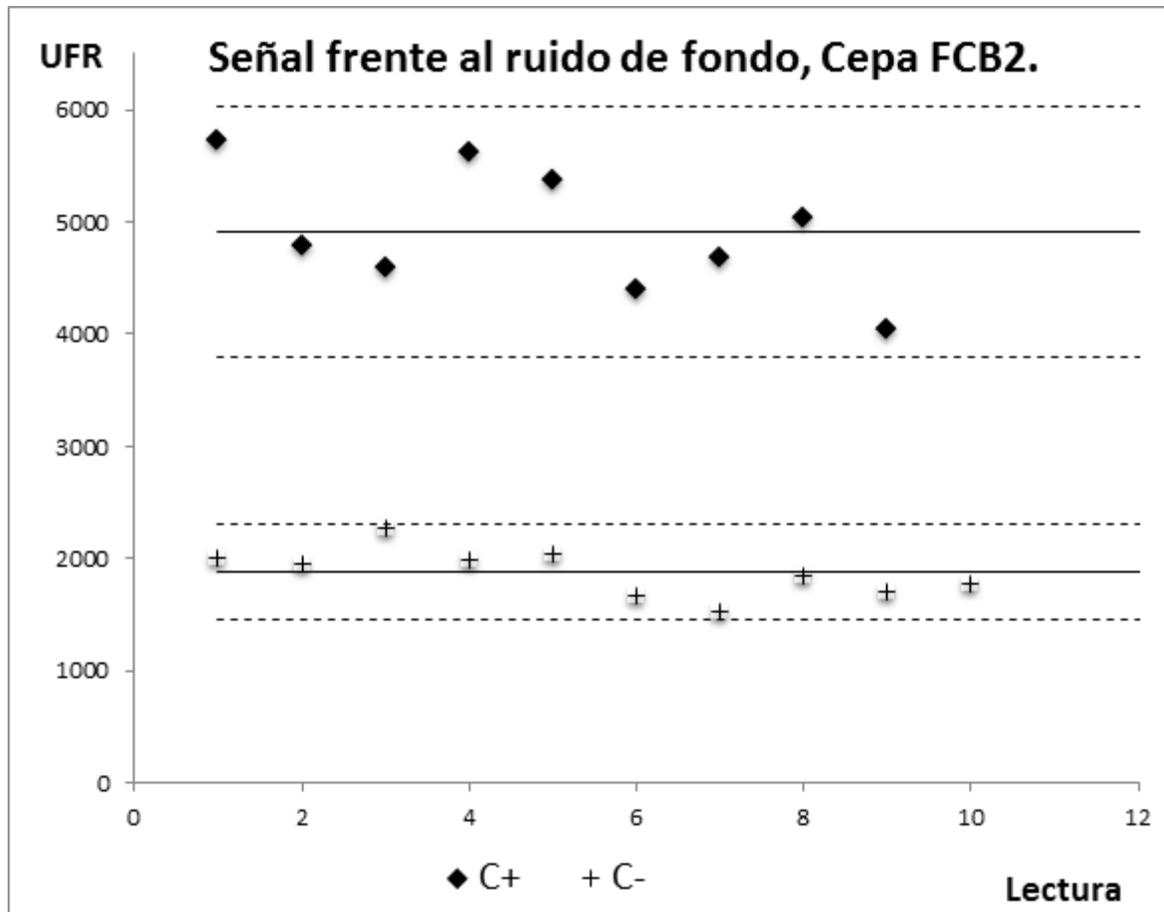


Figura 13. Respuesta fluorescente generada por los controles positivo (C+) y negativo (C-) en el método de fluorescencia SGI, bajo condiciones optimizadas. Las líneas horizontales continuas representan el promedio de respuesta, las líneas punteadas delimitan el intervalo de confianza del 95% de cada conjunto de datos. UFR (unidades de fluorescencia relativa), C + (control positivo), C- (ruido de fondo, Glóbulos Rojos No Parasitados).

3.2.1 Linealidad de la respuesta fluorescente generada por SYBR Green I.

Para evaluar la linealidad entre el porcentaje de parasitemia y la correspondiente respuesta fluorescente generada los resultados se representan gráficamente y se analizan por regresión, encontrando una correlación lineal positiva entre las UFR y la parasitemia, Figura 14.

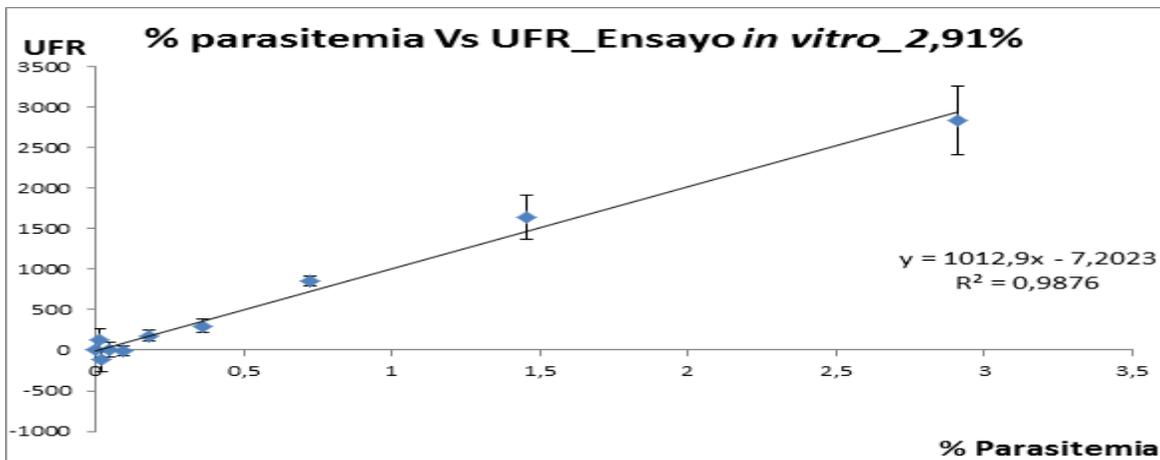
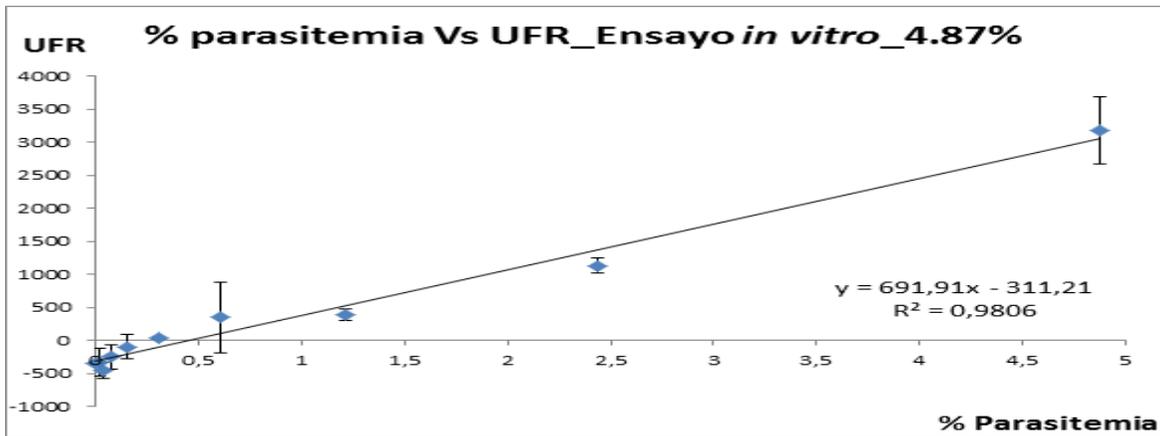
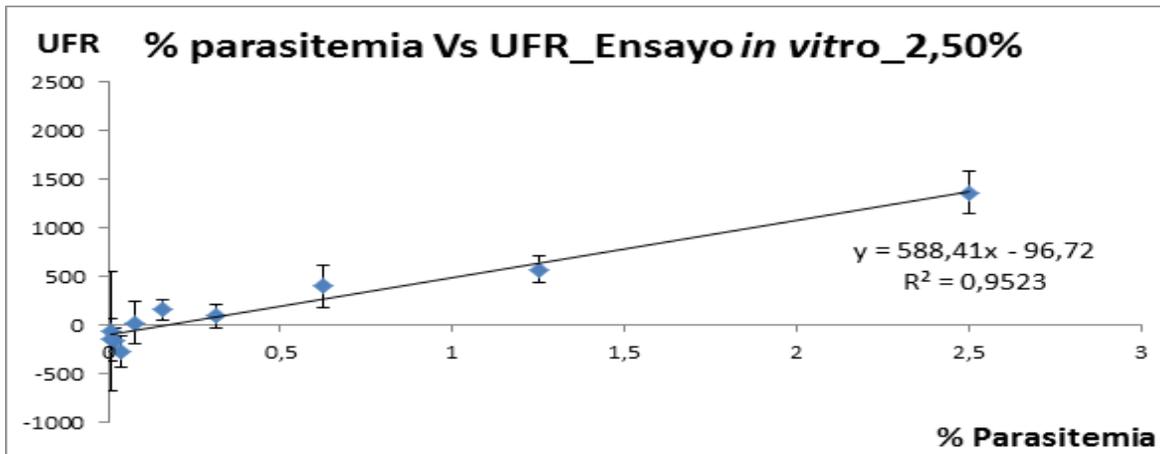


Figura 14. Evaluación de la linealidad entre la respuesta fluorescente (RFU) y el porcentaje de parasitemia.

Todas las mediciones se realizaron en quintuplicado, se presentan resultados de tres muestras procesadas de forma independiente. Cada valor es procesado mediante sustracción de la fluorescencia de fondo.

La pendiente promedio de la línea de regresión generada fue 852,4 +/- 227,0, con un coeficiente de correlación promedio de 0,9841 +/- 0,0049 (r^2), Figura 15.

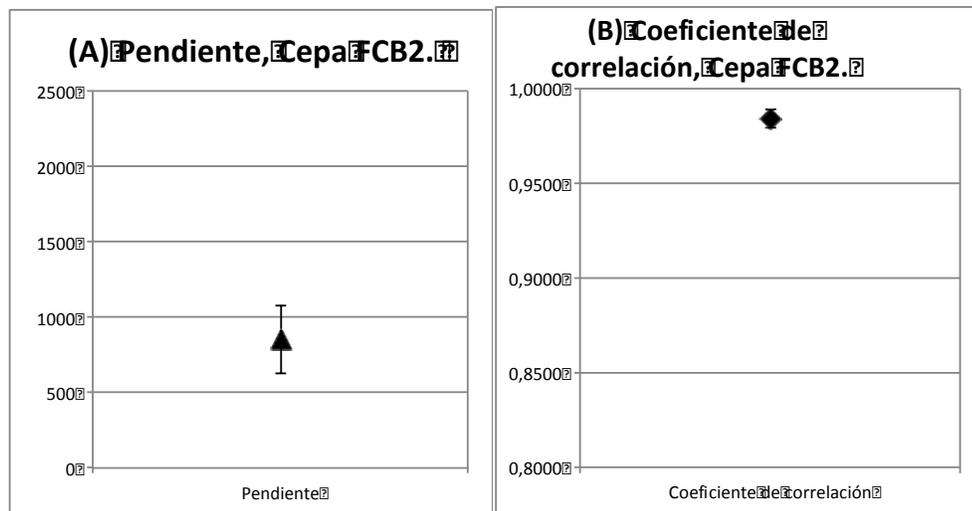


Figura 15. Evaluación de la linealidad entre la respuesta fluorescente (RFU) y el porcentaje de parasitemia; Pendiente (A) y coeficiente de correlación r^2 (B). Todas las mediciones se realizaron en quintuplicado, se presentan resultados de dos muestras procesadas de forma independiente. Cada valor es procesado mediante sustracción de la fluorescencia de fondo.

3.2.2 Exactitud del método fluorescente por SYBR Green I.

La exactitud del método de fluorescencia empleando SGI, en comparación con el recuento microscópico de extendidos de sangre teñidos con Giemsa, se evaluó en muestras de eritrocitos procedentes del cultivo de *P. falciparum*, sometidas al procedimiento de marcaje con SGI o tinción de Giemsa y procesadas mediante lectura de fluorescencia o valoración microscópica de la parasitemia. Se desarrolló un análisis bajo el proceso propuesto por Bland y Altman (1986). Los resultados evidencian concordancia entre los dos métodos con una diferencia media de 0,09109 +/- 0,26217 %, Figura 16.

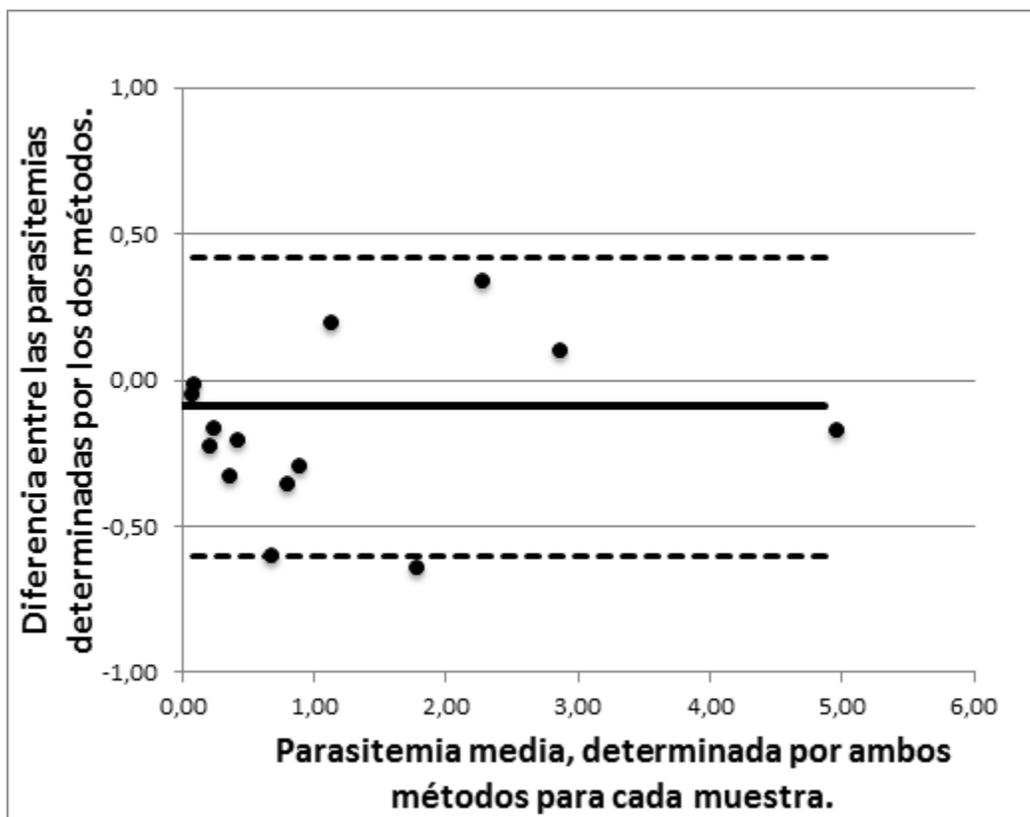


Figura 16. Representación gráfica de la diferencia entre el método de fluorescencia SGI y el método de extendidos de sangre coloreados con Giemsa frente a sus valores medios.

Muestras de cultivo de *P. falciparum* marcadas con SGI o coloreadas con Giemsa y determinada su parasitemia. Los datos se trazan para evaluar la concordancia entre los dos métodos de tinción. La línea continua indica la diferencia de medias entre los dos métodos. Las líneas punteadas indican los límites superiores e inferiores de concordancia.

Los dos métodos fueron comparados a lo largo del rango de valores de parasitemia que se encuentran típicamente en el modelo farmacológico, cuando es empleado en el tamizaje *in vitro* de sustancias o extractos con posible actividad antiplasmodial (0,5-5%), buscando conocer que tanto se corresponden los dos métodos de valoración de parasitemia.

En el diseño experimental de este modelo farmacológico las diferencias de parasitemia entre el control negativo (vehículo de los tratamientos) y el grupo tratado, normalmente deben ser > 50% para poder clasificar como activo un tratamiento; luego aun si los dos métodos muestran lecturas que difieren hasta en un 0,5%, podríamos reemplazarlos

entre si dado que esta diferencia no afectaría a las decisiones sobre tamizaje de actividad; en cada ensayo el grupo control positivo monitorea internamente el desempeño de la prueba. A la luz de lo anterior y teniendo en cuenta que nuestro estudio muestra que el ensayo de fluorescencia con SGI puede arrojar resultados que están tan solo 0,60% por debajo o por encima de los arrojados por el método microscópico con Giemsa, es plausible el uso del nuevo método para los fines de tamizaje *in vitro* de actividad antiplasmodial. La gráfica generada no muestra tendencia direccional o heteroscedasticidad.

3.2.3 Sensibilidad del método fluorescente con SYBR Green I.

La sensibilidad del método basado en fluorescencia de SGI fue valorada mediante la determinación del límite de detección y el límite de cuantificación, Figura 17.

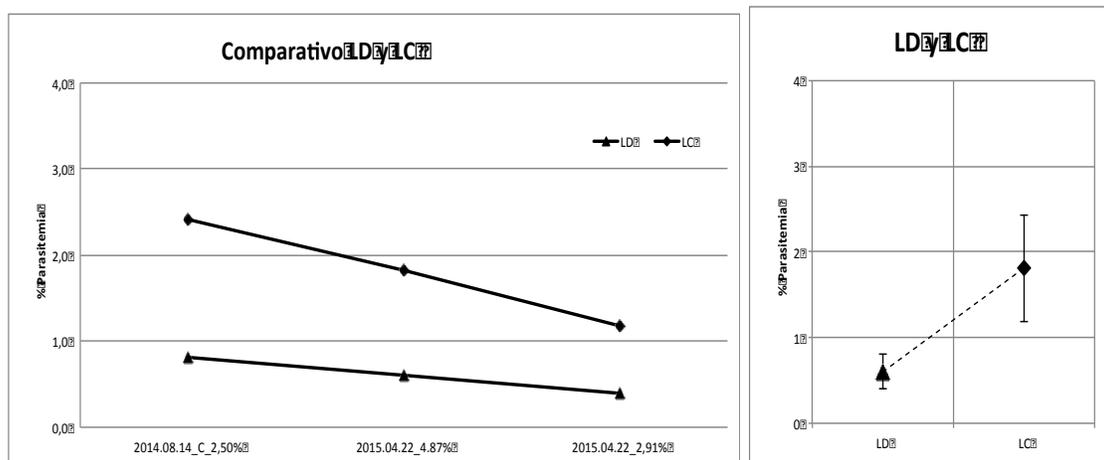


Figura 17. Evaluación de la sensibilidad del método fluorométrico con SGI; límite de detección (LD) y límite de cuantificación (LC). Todas las mediciones se realizaron en quintuplicado, se presentan resultados de tres muestras procesadas de forma independiente.

El límite de detección del método es 0,5+/-0,2% de parasitemia y el límite de cuantificación 1,5+/-0,5% de parasitemia; el LD es significativamente inferior al LC. La correlación lineal entre el porcentaje de parasitemia y la respuesta fluorescente correspondiente se mantiene hasta niveles tan bajos como 0,1%.

Los límites de detección y cuantificación pueden presentar variación dependiendo de la cepa de *P. falciparum* empleada y el estadio de desarrollo parasitario. Johnson et al. (2007), empleando la cepas D6 y W2 reportan un LD de 0,08% en estadio de anillos y 0,04% en estadios de esquizontes, manteniendo un LC constante de 0,5%; Moneriz et al. (2009), reportan LD y LC con valores de 1,37% y 4,14% para la cepa Dd2, después de la remoción de hemoglobina y detergentes de las muestras estudiadas, mientras que Vossen et al., (2010), reportan un LD de 0,20%, para las cepas Dd2 y 3D7; Bei et al. (2010), usando el método de tinción con SGI y citometría de flujo, reportan un LD de 0,2% para la cepa HB3; finalmente, Chaorattakanawee et al., (2013), hallaron LD entre 0,13% a 0,15% y LC entre 0,43% a 0,50% para las cepas W2, D6, 3D7 y K1.

3.2.4 Calidad del método (Factor Z).

La calidad y robustez del ensayo se calculó mediante el uso de la medida estadística del factor Z; en condiciones optimizadas (cultivo asincrónico y tinción 2h), el factor Z logró alcanzar valores entre 0,5 y 0 (0,376+/-0,009), a una parasitemia promedio de 1,6+/-1,2%, Figura 18.

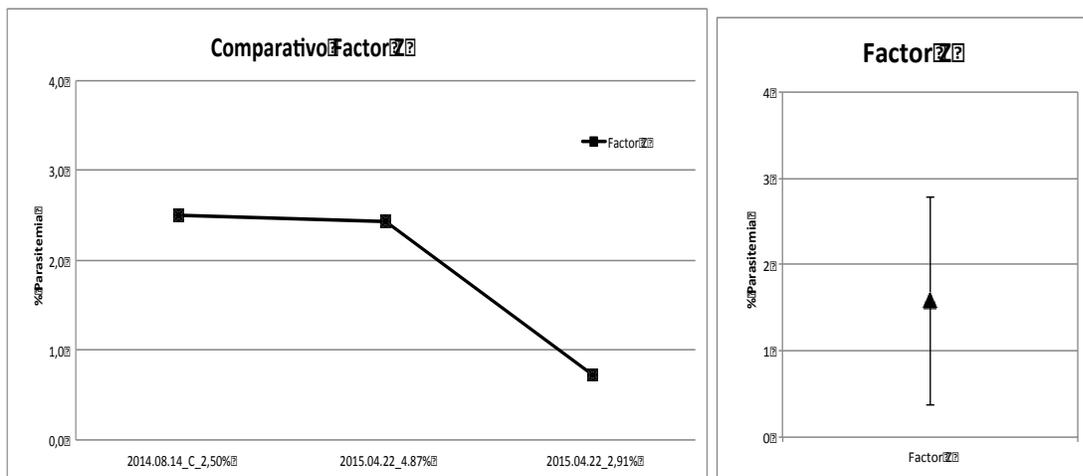


Figura 18. Evaluación de la calidad del método fluorométrico con SGI; Factor Z. Todas las mediciones se realizaron en quintuplicado, se presentan resultados de dos muestras procesadas de forma independiente.

Este estudio reporta la adaptación y optimización de un método alternativo (empleando un equipo accesible en muchos laboratorios), basado en fluorescencia y adecuado a las condiciones específicas de tamizaje de actividad antiplasmodial, es decir, en muestras de cultivo con parasitemias significativas (>1%), en las cuales el efecto de un tratamiento activo debe reflejar una reducción mayor del 50% de la señal (respecto al grupo control vehículo de tratamientos) y con bajo consumo de reactivos.

Finalmente se estudió la robustez frente al tiempo de tinción evidenciando que no se presentan diferencias importantes en los parámetros del método entre una y cuatro horas, desde las seis horas los valores de estos indicadores comienzan a cambiar y la variabilidad en su determinación aumenta. En nuestras condiciones demostramos que es adecuada la tinción con SGI a (2X), en cultivos asincrónicos y el ensayo es robusto desde una hasta 4 horas en relación con el tiempo de la tinción, proponiéndose 2h como tiempo óptimo.

Frente a los parámetros del método Vossen et al., (2010), encontró un bajo ruido de fondo del 13,92% generado por el agua destilada frente a RPMI; cuando mezcló SGI con medio RPMI obtuvo un ruido de fondo estable e independientemente de aditivos, así mismo muestras con eritrocitos no infectados presentaron un ruido de fondo inferior que el RPMI, probablemente derivado de la amortiguación de la señal producida por la hemoglobina.

En condiciones óptimas, empleando la cepa FCB2 de *P. falciparum*, el ruido de fondo generado por el C- (GRNP) frente al C+ fue 38%; probablemente derivado de inconsistencias en el comportamiento de la cepa, debidas a la longevidad de la cepa y a inconsistencias en el crecimiento de la misma.

Bajo condiciones optimizadas (Cultivo asincrónico y tinción 2h) se verificó la linealidad de fluorescencia del SGI sobre un rango de parasitemia conocida (determinada mediante examen microscópico) en una gama de 1,8% a 5%, que enmarca los niveles de parasitemia generalmente empleados en el modelo farmacológico.

La escogencia del método de cuantificación de parasitemia a ser empleado en un modelo farmacológico debe tomar en cuenta las particularidades de la prueba; según lo demostrado por Moneriz et al., (2009), el cálculo de concentración inhibitoria 50 (IC₅₀) no se ve afectado por la elección del colorante fluorescente de ADN, la presencia de la hemoglobina o de detergentes de lisis en la muestra, sugiriendo que en estos modelos farmacológicos de estimación de la IC₅₀, la baja sensibilidad no es asunto crítico. Recientemente, varios autores informaron la utilidad del ensayo SGI para valorar la sensibilidad de *P. falciparum* (aislados de campo de África y del Sudeste de Asia), a medicamentos evidenciando que el método basado en fluorescencia genera resultados de IC₅₀ comparables a los generados por los métodos tradicionales de incorporación de [3H]-hipoxantina o HRP-2 ELISA (Bacon et al., 2007; Johnson et al., 2007; Rason et al, 2008; Akala et al, 2011; Chaorattanakawee et al., 2013).

Los métodos micro-fluorométricos de alta sensibilidad son críticos en aplicaciones como el control de las infecciones sub-microscópicas en las primeras etapas de la enfermedad o en el embarazo y en la estimación de la eficiencia de las vacunas; como ejemplo, para muestras clínicas no aclaradas de glóbulos blancos, el método HRP-2 ELISA ha demostrado ser superior al método SGI, en la evaluación de campo de aislamientos frescos de *P. falciparum* con baja parasitemia (<0,2%), como los generalmente encontrados en el sudeste asiático (Chaorattanakawee et al., 2013).

Frente al tamizaje *in vitro* de agentes anti-babesia, en cultivos de *Babesia bovis*, el método basado en la fluorescencia de SGI fue evaluado frente a la valoración microscópica clásica; los valores obtenidos de concentración inhibitoria (IC₅₀) de 5 fármacos mostraron concordancia (Guswanto et al., 2014).

Algunas desventajas asociadas con la cuantificación por microscopía de la parasitemia de *P. falciparum*, pueden ser superadas por el método de fluorescencia SGI; por ejemplo, los resultados basados en microscopía pueden ser inconsistentes dado que la exactitud de los valores de parasitemia puede ser influenciada subjetivamente por las personas que hacen la determinación; por el contrario, los valores de fluorescencia siguen siendo los mismos a pesar de ser medidos por diferentes investigadores.

En conclusión, el presente trabajo ha adaptado y optimizado un método, alternativo a la citometría de flujo, que empleando fluorómetros comúnmente disponibles en muchos

laboratorios, es preciso, robusto, accesible y rápido para el tamizaje de sustancias o extractos en el modelo farmacológico de cultivo de *P falciparum*. Las condiciones óptimas para el desarrollo de la valoración mediante fluorescencia con SGI son: cultivos asincrónicos y dos horas de tiempo de tinción; bajo esta condiciones de ensayo detecta con precisión la parasitemia por encima de 1,5%.

4. Adaptación y estandarización del método de lectura por fluorometría, al modelo farmacológico *in vivo* de *Plasmodium berghei*.

Resultados y discusión

La evaluación de la capacidad de SGI para determinar el porcentaje de parasitemia en el modelo farmacológico *in vivo* empleando muestras de sangre entera incluyó tres parámetros: proceso de lisis, tipo de muestra (sangre total frente a glóbulos rojos) y tiempo de incubación. Nuestros resultados muestran que el proceso de lisis previa, por congelación-descongelación de las muestras, no genera diferencias estadísticamente significativas en el desempeño del método, la presencia de sangre total no interfiere en los resultados y el tiempo de tinción es robusto en el rango de 5 minutos a 4 horas siendo 2 horas el tiempo óptimo de tinción.

Bajo nuestras condiciones experimentales optimizadas, la fluorescencia de fondo generada por la sangre total no parasitada (STNP) fue baja (4,61±0,14), existe una buena correlación entre la parasitemia y las UFR, con un coeficiente de correlación promedio de $r^2=0.9618$, con una pendiente promedio de la recta de 1388,1 en un rango de parasitemias de 0,6 a 73%. La precisión estudiada a la luz de la prueba *Bland-Altman plot* muestra una fuerte concordancia entre los métodos de Giemsa y SGI, con una diferencia media de 0,00016 ± 3,37; los límites promedio de detección y cuantificación fueron 1,4% y 4,3% de parasitemia respectivamente. Respecto a la calidad, el factor Z fue 0,5866 evidenciando una separación de banda amplia correspondiente a un excelente método ($1 > Z > 0,5$) y confirmando que este test es

apropiado para el tamizaje de alto rendimiento. A una dosis de 3 mg /Kg de cloroquina (CQ), y bajo las condiciones de nuestra prueba *Test de Peters*, la determinación del porcentaje de inhibición de la parasitemia fue de 81.3+/-8.9%, para el método fluorométrico y 83+/-15% para el método microscópico, respectivamente.

4.1 Adaptación y optimización del método fluorométrico

El método de cuantificación de parasitemia de *P. berghei* mediante fluorometría, empleando el fluorocromo SGI fue adaptado a las condiciones propias de nuestro modelo farmacológico *in vivo* y a la prueba de tamizaje farmacológico de extractos o sustancias con promisoría actividad antimalárica; el protocolo de la valoración cuantitativa es presentado en el Anexo B.

4.1.1 Capacidad del ensayo: Linealidad y Rango

Los resultados obtenidos en tres ensayos independientes, evidencian que las curvas de concentración parasitaria vs respuesta en UFR mantienen la linealidad en los diferentes tiempos de tinción evaluados, sin embargo a tiempo de incubación de 24 y 48 horas se presenta un comportamiento ligeramente atípico en la respuesta en UFR (figura 19).

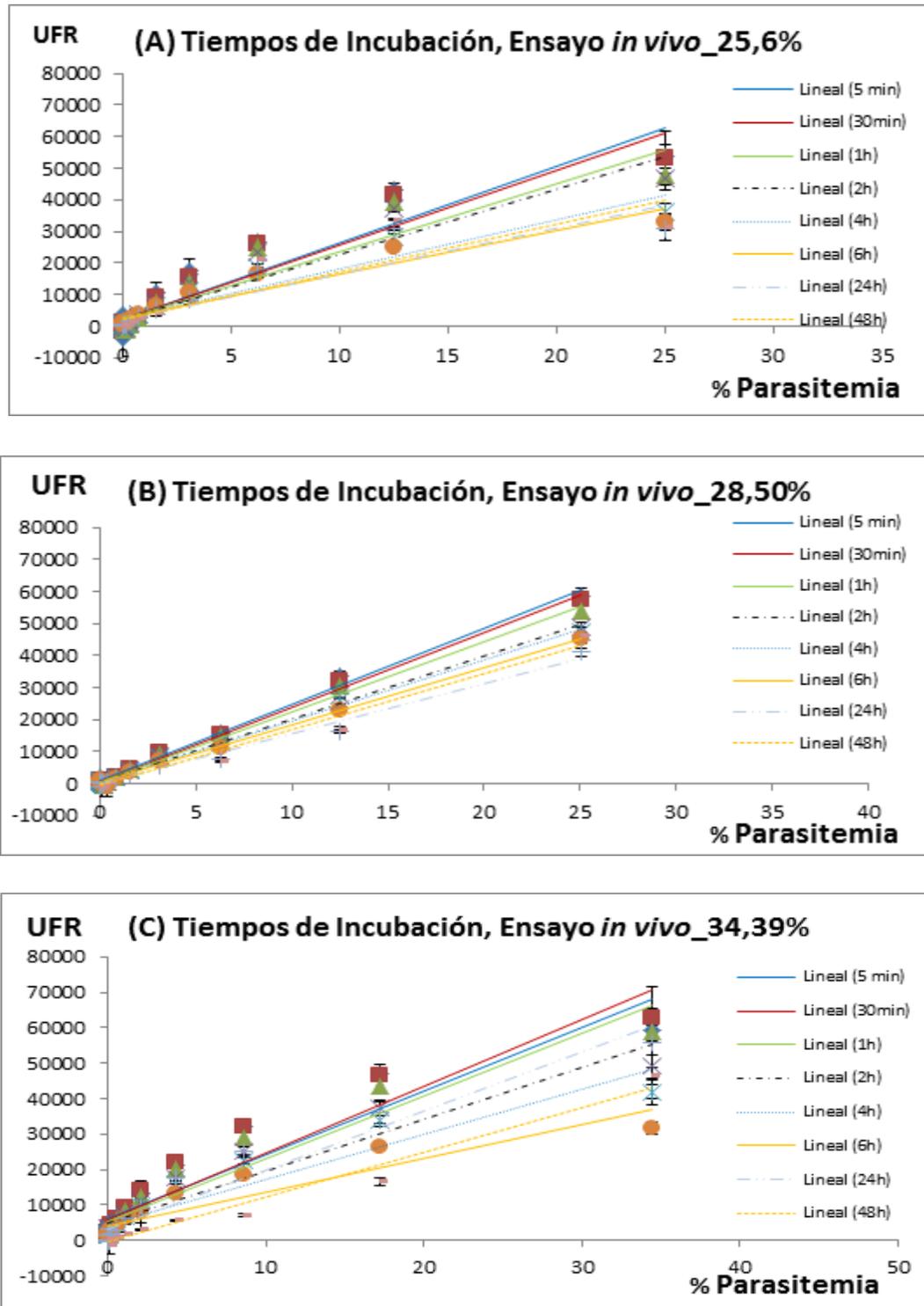


Figura 19. Optimización del tiempo de tinción, concentración parasitaria vs respuesta fluorescente.

Todas las mediciones se realizaron en quintuplicado, se presentan resultados de tres muestras procesadas de forma independiente. Cada valor es procesado mediante sustracción de la fluorescencia de fondo.

La pendiente promedio de las curvas generadas a los diferentes tiempos de tinción muestra una disminución gradual hasta las 6 horas de tinción, con un posterior incremento a las 24 horas, mostrando su valor mínimo a las 6 horas; la variabilidad en los datos es marcadamente alta en los tiempos de tinción de 5 min. Frente a la pendiente generada el tiempo de tinción es robusto entre 1 y 6 h, Figura 20 (A).

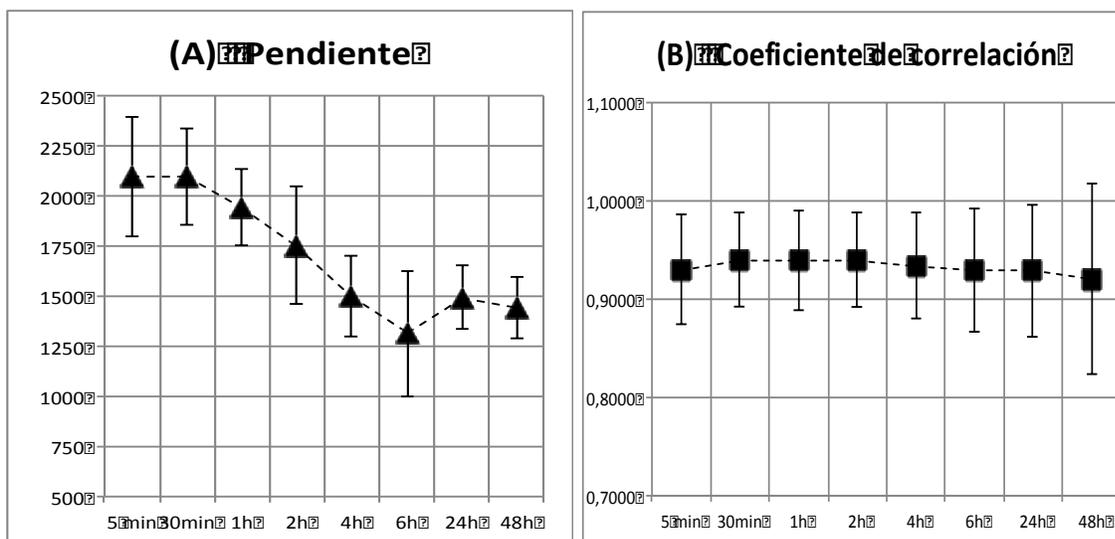


Figura 20. Optimización del tiempo de tinción, Pendiente (A) y Coeficiente de correlación (B).

Todas las mediciones se realizaron en quintuplicado, se presentan resultados de tres muestras procesadas de forma independiente. Cada valor es procesado mediante sustracción de la fluorescencia de fondo.

El coeficiente de correlación promedio de las curvas logradas a los diferentes tiempos de tinción evidencia un comportamiento estable con valores promedio superiores en todos los casos a 0,91999 mostrando el valor mínimo a las 48h de incubación, evidenciando que existe una buena correlación entre los resultados obtenidos en UFR y las curvas de regresión; en tiempos de incubación por debajo de 30 min., y por encima de 6 h la variabilidad de coeficiente de correlación es mayor; frente al coeficiente de correlación el tiempo de tinción del ensayo es robusto entre 30 min y 6 h, Figura 20 (B).

Los límites promedio de detección y cuantificación presentaron alta variabilidad a los 5 y 30 min. y después de 4 h; se mantuvieron relativamente constantes entre 1h y 4 h y

posterior a ello se presenta aumento en la variabilidad y en los valores promedio de estos indicadores; el tiempo de tinción es robusto entre 1h y 4 h, Figura 21.

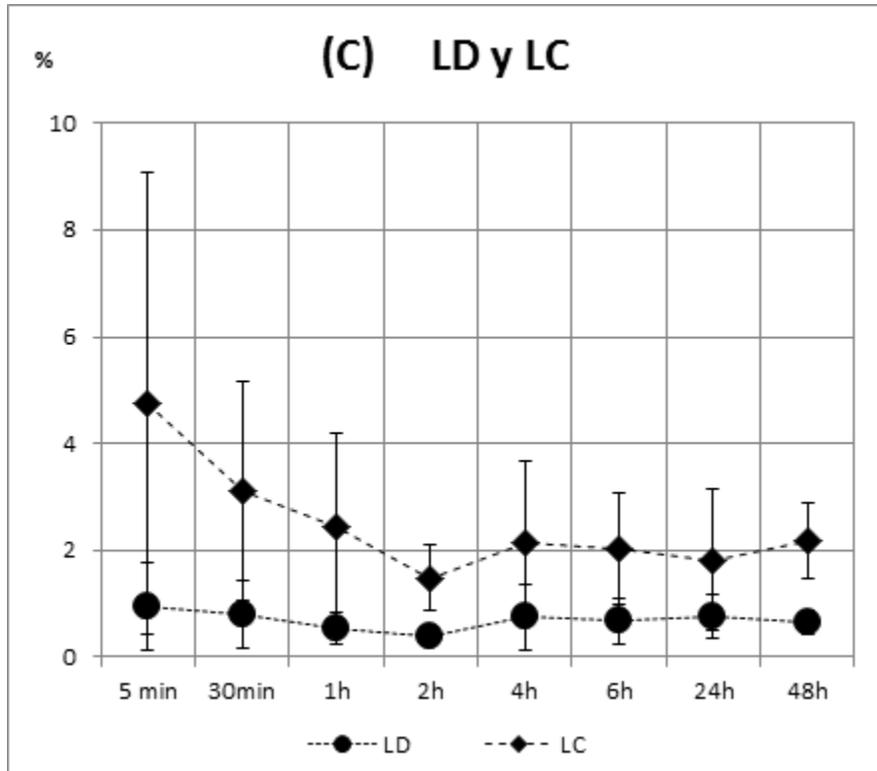


Figura 21. Optimización del tiempo de tinción, Límite de detección (DL) y Límite de cuantificación (QL).

Todas las mediciones se realizaron en quintuplicado, se presentan resultados de tres muestras procesadas de forma independiente. Cada valor es procesado mediante sustracción de la fluorescencia de fondo.

El factor Z alcanzó valores entre 0,5 y 0,9 ($1 > Z > 0,5$), el promedio de concentración parasitaria mínima a la cual se logra calcular factor Z se mantiene relativamente constante entre 1h y 6h presentando una alta variabilidad a los 5 y 30 min, los valores se mantuvieron relativamente constante hasta las 6 h y posterior a ello se presenta variabilidad; en cuanto al factor Z el tiempo de tinción es robusto entre 2 y 6 h, Figura 22.

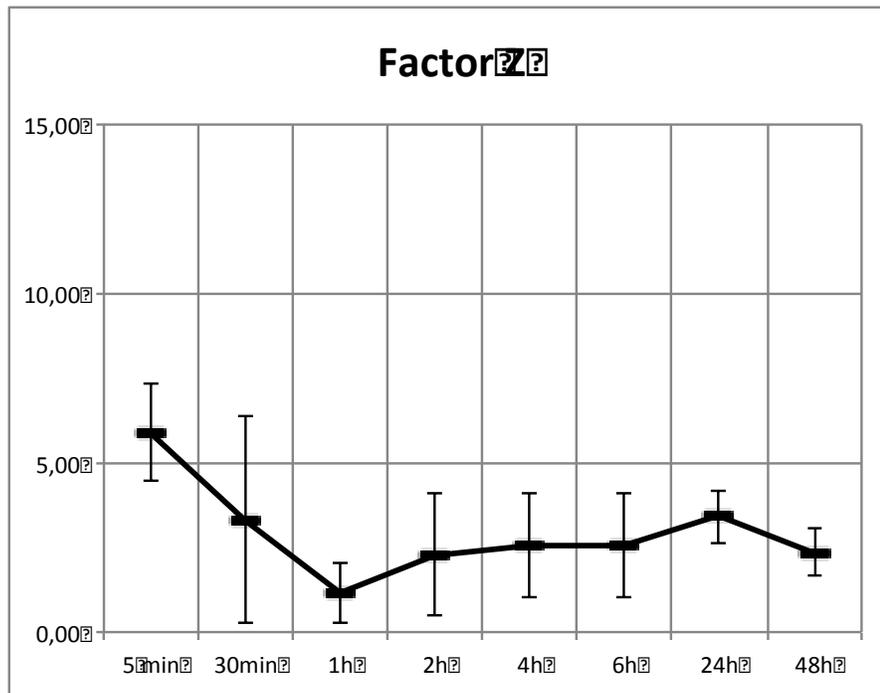


Figura 22. Optimización del tiempo de tinción, Concentración parasitaria mínima a la que se logra calcular el Factor Z.

Todas las mediciones se realizaron en quintuplicado, se presentan resultados de tres muestras procesadas de forma independiente. Cada valor es procesado mediante sustracción de la fluorescencia de fondo.

En general el tiempo de incubación es robusto entre 1h y 4h; por razones de velocidad y eficiencia se determina un tiempo óptimo de tinción de 2h.

4.1.2 determinación del tipo de muestra

Para determinar el tipo de muestra que se emplearía en los ensayos (Sangre total vs glóbulos rojos), se obtuvo por punción cardíaca de 500-1000 μL de muestra parasitada; 30 μL de muestra parasitada (Sangre total o glóbulos rojos) se transfirieron a un tubo falcón de 15 mL, se realizaron diluciones seriadas, hasta lograr una parasitemia de 0,006% al 2 % de hematocrito. En la placa de 96 pozos se adicionó 100 μL de cada suspensión celular más 100 μL de SGI (2X)/buffer de lisis y se incubo a 37°C en la oscuridad por 2 horas, tiempo después del cual se determinó las UFR.

El proceso de obtención de glóbulos rojos parasitados (GRP) y no parasitados (GRNP) fue el siguiente: las muestras de sangre total parasitada y no parasitada se transfirieron a tubos falcón de 15 mL, se diluyó en un volumen 1:4 con PBS (1X), se centrifugó a 400g, por 30 minutos, se descartó el sobrenadante y se adicionó 10 mL de PBS, se homogeneizó, se centrifugó a 250g por 10 minutos, se descartó el sobrenadante, se resuspendió el pellet con 5mL de PBS y se homogeneizó, de nuevo se centrifugó a 250g por 10 minutos (dos veces), finalmente, se descartó el sobrenadante conservando únicamente los glóbulos rojos lavados (Anexo B).

Se compararon muestras de sangre total infectadas por *P. berghei*, línea de negro, frente aislado glóbulos rojos infectados con *P. berghei* (GRP), línea verde. Los resultados obtenidos en tres ensayos independientes, evidencian que las curvas de concentración parasitaria vs respuesta en UFR mantienen la linealidad a lo largo de las diferentes concentraciones de parasitemia, en ambos tipos de muestra (Figura 23). En todos los ensayos las muestras de sangre total tuvieron mayores valores de UFR, y que generan graficas con mejor respuesta fluorescente ante cambios en los niveles de parasitemia (Figura 23 B).

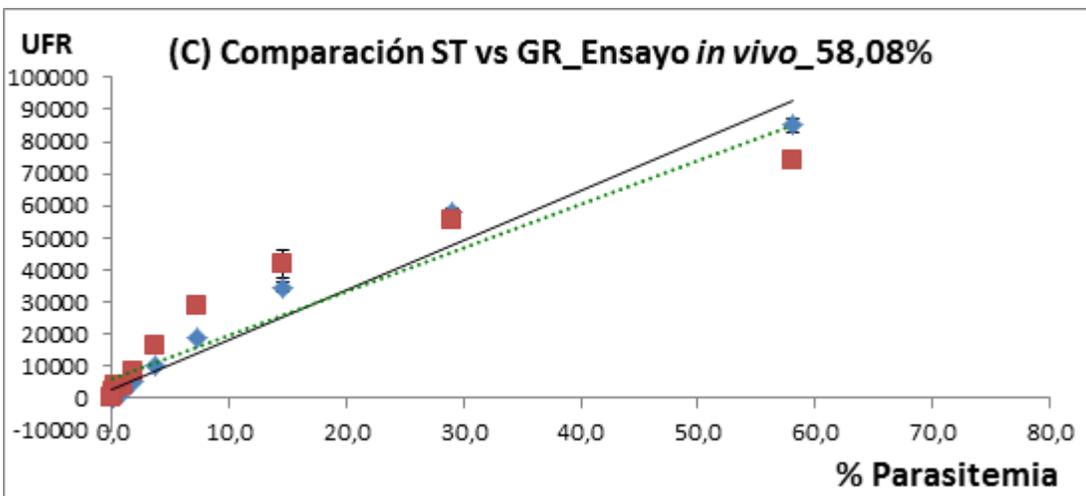
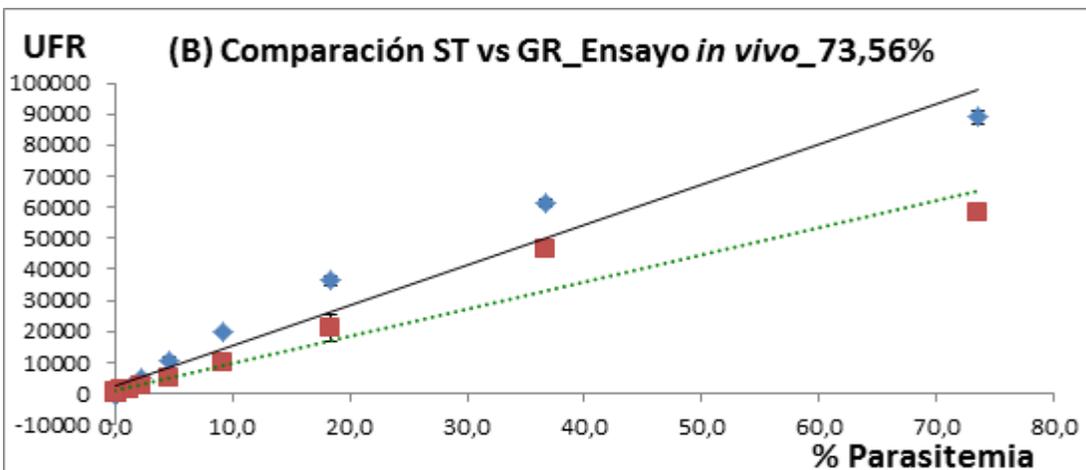
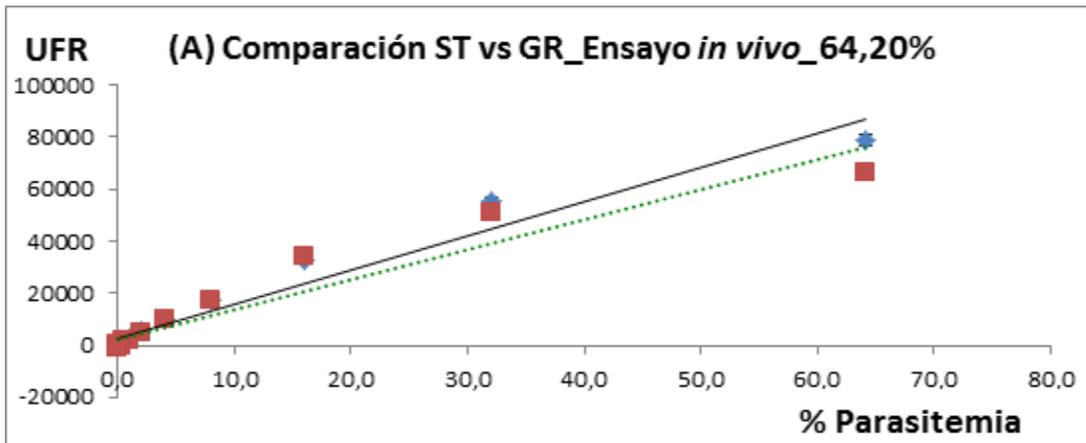


Figura 23. Optimización del tipo de muestra sangre total (línea negra), frente a glóbulos rojos (línea verde). Todas las mediciones se realizaron en quintuplicado, se presentan resultados de tres muestras procesadas de forma independiente. Cada valor es procesado mediante sustracción de la fluorescencia de fondo.

En cuanto a la pendiente promedio de las curvas generadas no se evidencia diferencias significativas derivadas del uso de muestras de sangre completa y muestras de glóbulos rojos, sin embargo, en las muestras de glóbulos rojos existe una mayor variabilidad en los resultados, Figura 24 (A).

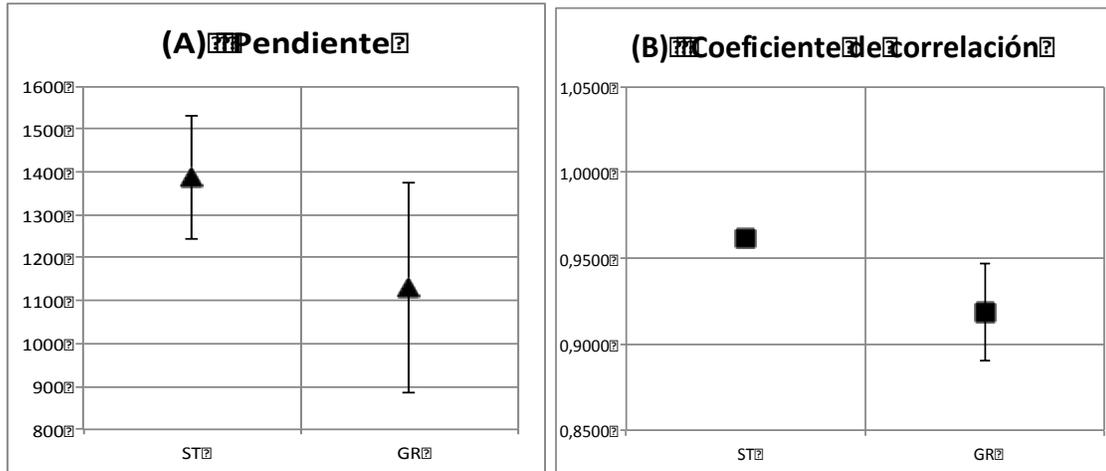


Figura 24. Optimización del tipo de muestra sangre total (ST) frente a glóbulos rojos (GR), Pendiente (A) y Coeficiente de correlación (B). Todas las mediciones se realizaron en quintuplicado, se presentan resultados de tres muestras procesadas de forma independiente. Cada valor es procesado mediante sustracción de la fluorescencia de fondo.

El coeficiente de correlación es significativamente diferente entre ST y GR, las muestras de sangre total están significativamente más cerca de la unidad evidenciando una mejor correlación de los puntos con la recta de tendencia (Figura 24 B).

Los límites de detección y de cuantificación son significativamente inferiores cuando se emplea muestras de glóbulos rojos frente a los encontrados cuando se usan muestras de sangre total. Los LD y LC están claramente diferenciados en ST en tanto que en GR no logran ser significativamente diferentes.

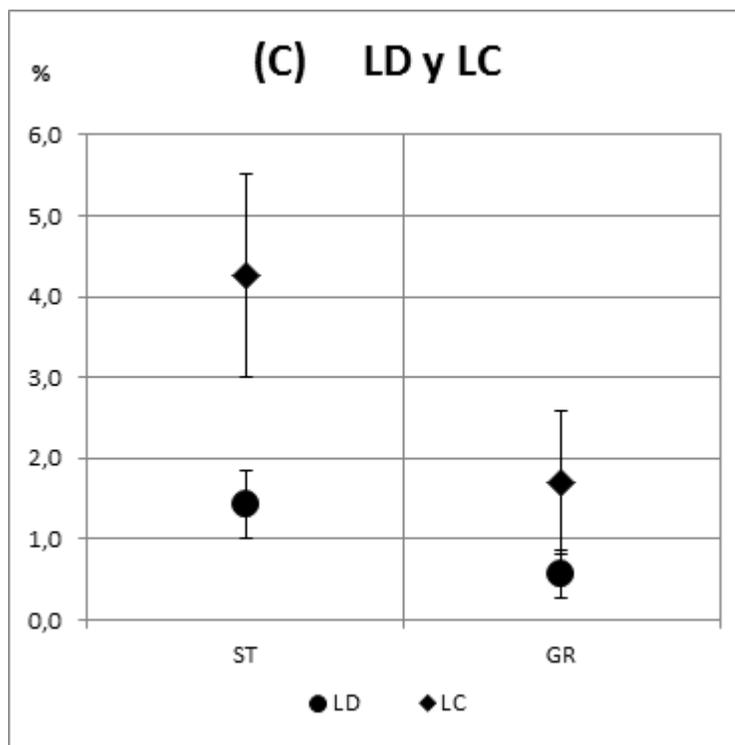


Figura 25. Optimización del tipo de muestra sangre total (ST) frente a glóbulos rojos (GR). Límite de detección (LD) y Límite de cuantificación (LC). Todas las mediciones se realizaron en quintuplicado, se presentan resultados de tres muestras procesadas de forma independiente. Cada valor es procesado mediante sustracción de la fluorescencia de fondo.

Ante el mejor comportamiento de pendiente y coeficiente de correlación con ST y por razones de conveniencia referentes a menor tiempo de procesamiento de las muestras y reducción en los costos por el menor uso de reactivos, se optimiza el uso en matriz de sangre total.

4.1.3 Determinación del proceso de lisado de las muestras

Para determinar si existen diferencias en los resultados de UFR al someter las muestras a un proceso de lisis previa por congelación-descongelación, 30 μ L de sangre total, se transfirieron a un tubo falcón de 15 mL, se realizó diluciones seriadas, hasta lograr una parasitemia de 0,006%, al 2% de hematocrito; en una placa de 96 pozos se adicionó 100 μ L de cada suspensión celular más 100 μ L de SGI (2X)/buffer de lisis, se incubó a 37°C

por 2 horas en la oscuridad y se determinó las UFR. Una segunda placa se llevó a congelación durante toda la noche a -4°C y una tercera placa se congeló por el mismo periodo a -20°C , al día siguiente cada placa, se descongeló a temperatura ambiente por tres horas, se adicionó $100\ \mu\text{L}$ de SGI (2X)/buffer de lisis y se incubó a 37°C en la oscuridad por 2 horas, luego se determinó las UFR (Anexo B)

El efecto de incluir un proceso de pre-lisis por congelación-descongelación se evaluó encontrando que no son evidentes diferencias en la pendiente, derivadas del empleo de los procesos de pre-lisis; el proceso de pre-lisis (-20°C) genera un coeficiente de correlación superior acercándose a la unidad, punto de mayor correlación de los puntos con la curva de regresión y los límites de detección (LD) y cuantificación (LC) no muestran diferencias significativas aun cuando la variabilidad de las determinaciones es marcadamente inferior cuando se emplea el proceso de lisis simple, Figura 26.

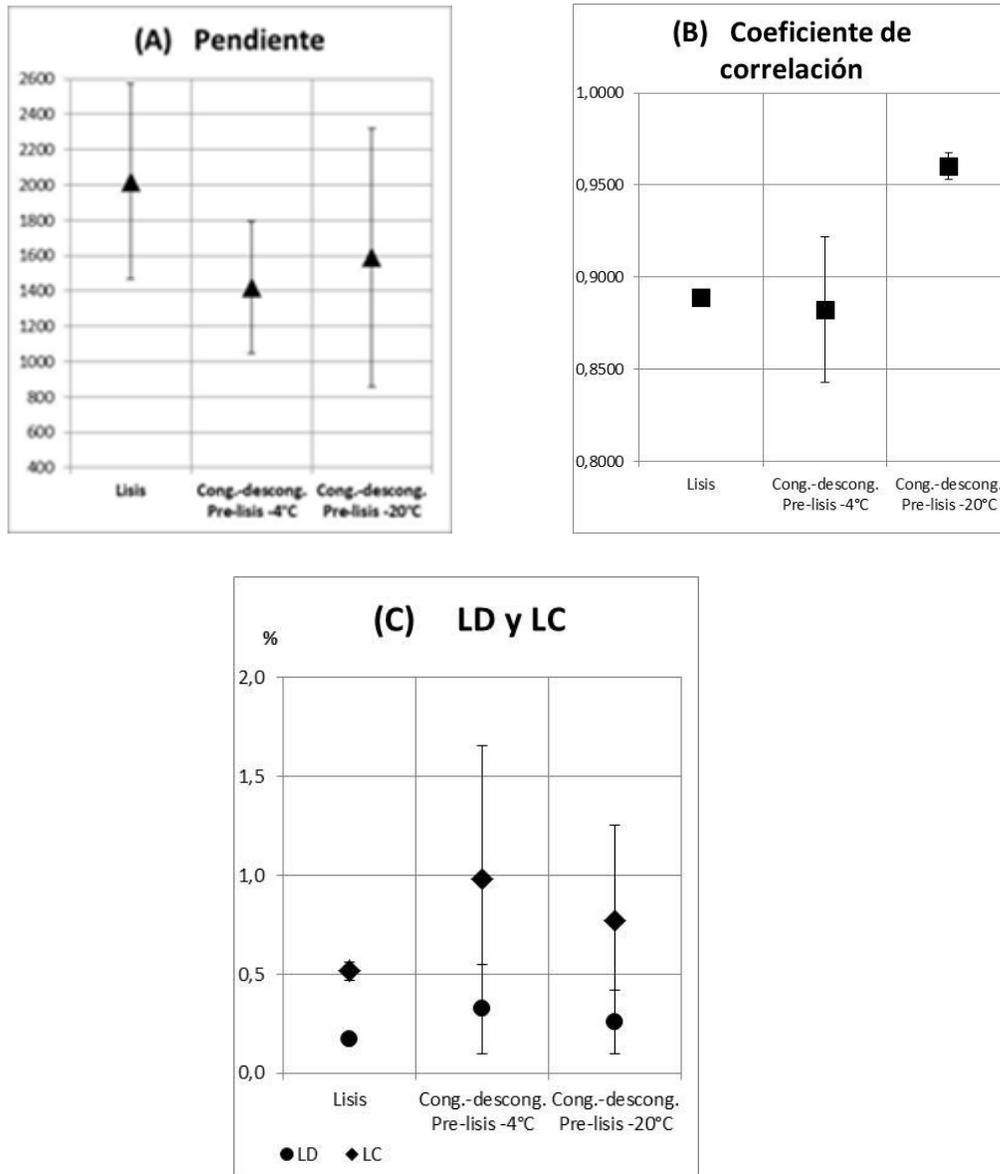


Figura 26. Efecto del proceso de pre-lisis en la Pendiente (A), el Coeficiente de Correlación (B) y los Límites de Detección (DL) y de cuantificación (QL). Todas las mediciones se realizaron en quintuplicado, se presentan resultados de dos muestras procesadas de forma independiente. Cada valor es procesado mediante sustracción de la fluorescencia de fondo.

Se determina como condiciones óptimas del método el procesamiento de las muestras en matriz de sangre completa, un proceso de lisis simple y un tiempo de tinción de dos horas.

4.2 Parámetros de la metodología

La señal generada por SGI combinado con sangre total, es estable como ruido de fondo; en relación con el control positivo (C+, referido como la máxima señal) da origen a una lectura baja de únicamente el 4,61% (95% IC: 4,33-4,89%, n = 15), Figura 27.

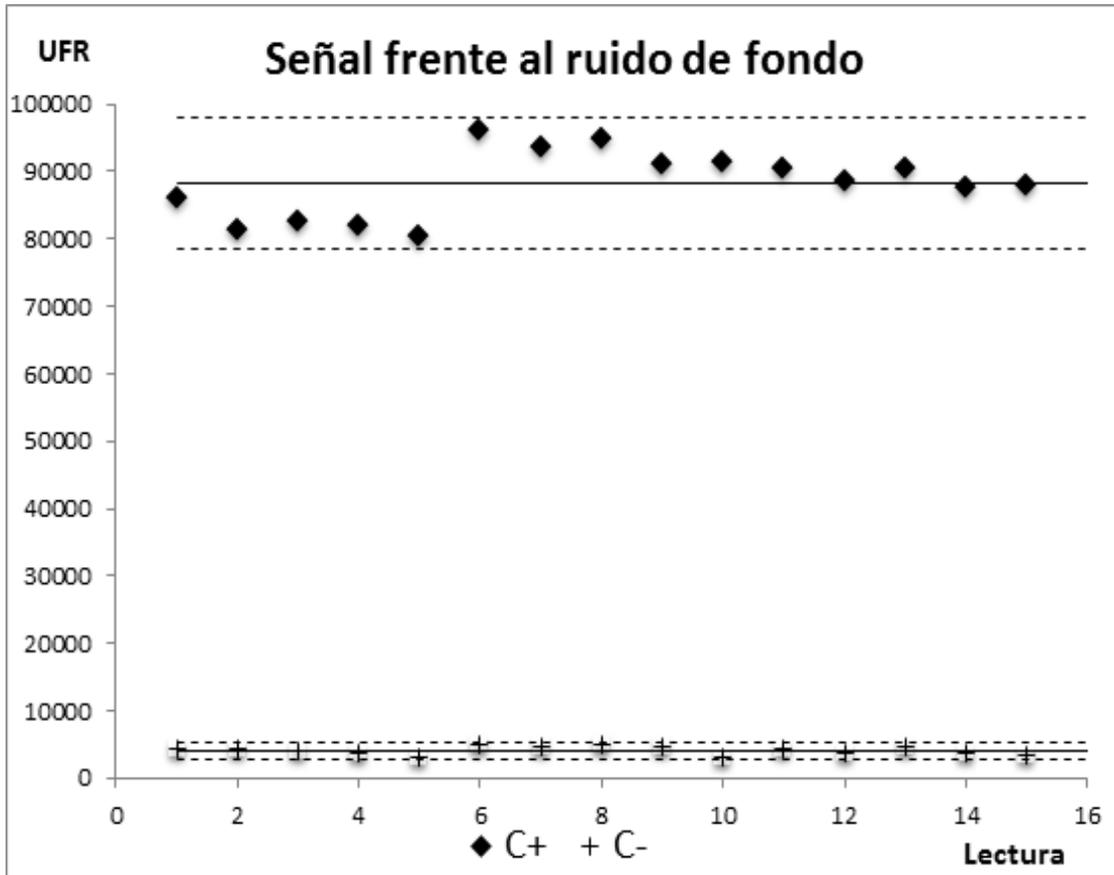


Figura 27. Datos generados bajo condiciones optimizadas, Las líneas horizontales continuas representan el promedio de respuesta, las líneas punteadas delimitan el intervalo de confianza del 95% de cada conjunto de datos. UFR (unidades de fluorescencia relativa), C + (control positivo), C- (control negativo, sangre total).

4.2.1 Linealidad de la respuesta fluorescente generada por SYBR Green I

Para evaluar la linealidad entre el porcentaje de parasitemia y las correspondientes UFR generadas, los resultados fueron graficados y analizados por regresión lineal. La figura 28 muestra una correlación lineal positiva entre las UFR y el porcentaje de parasitemia.

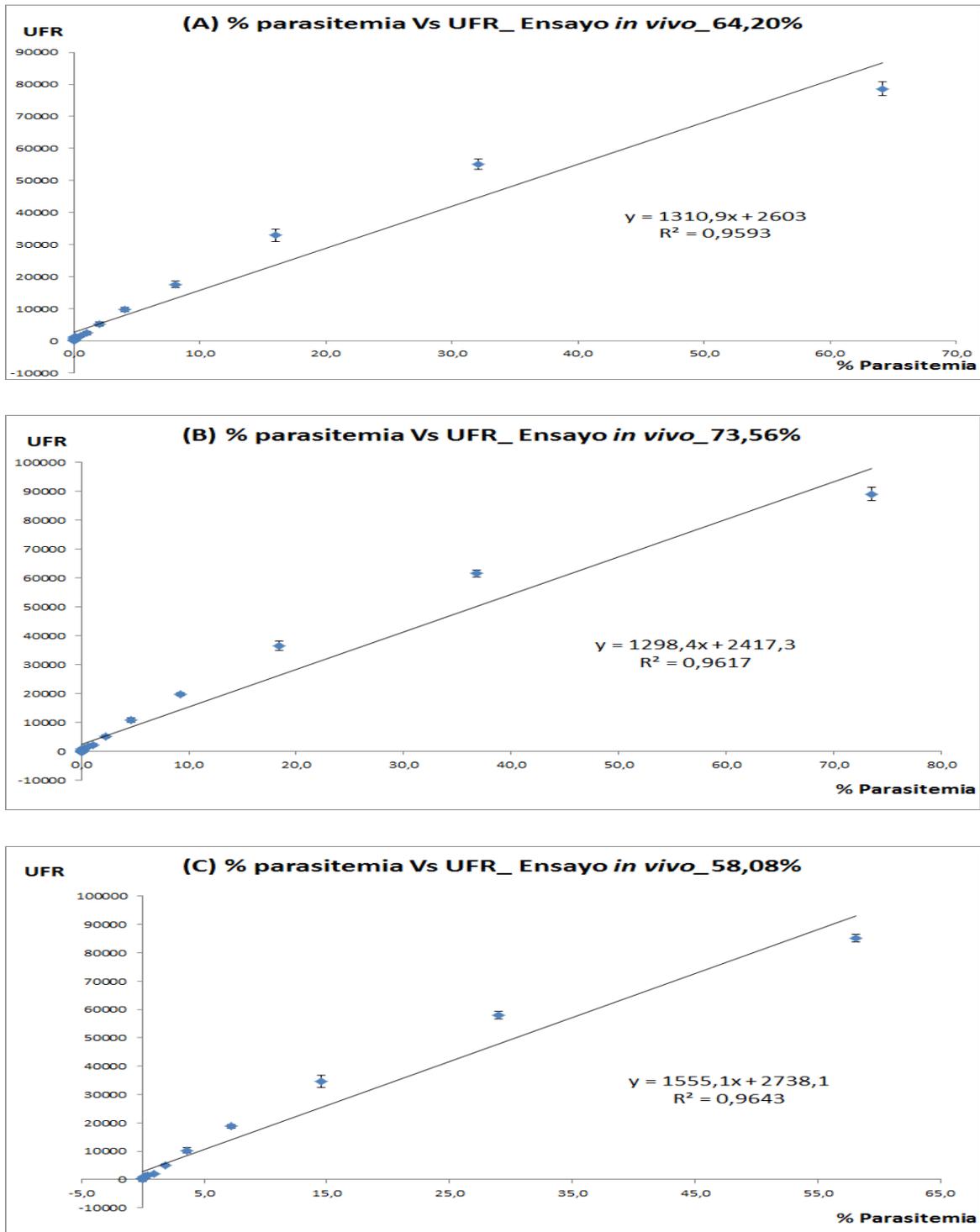


Figura. 28. Evaluación de la linealidad entre la respuesta fluorescente (RFU) y el porcentaje de parasitemia.

Todas las mediciones se realizaron en quintuplicado, se presentan resultados de tres muestras procesadas de forma independiente. Cada valor es procesado mediante sustracción de la fluorescencia de fondo.

Las líneas de regresión generadas dieron origen a una pendiente promedio de 1388,1 +/- 144,7, con un coeficiente de correlación promedio de 0,9618 +/- 0,0025 (r^2), Figura 29.

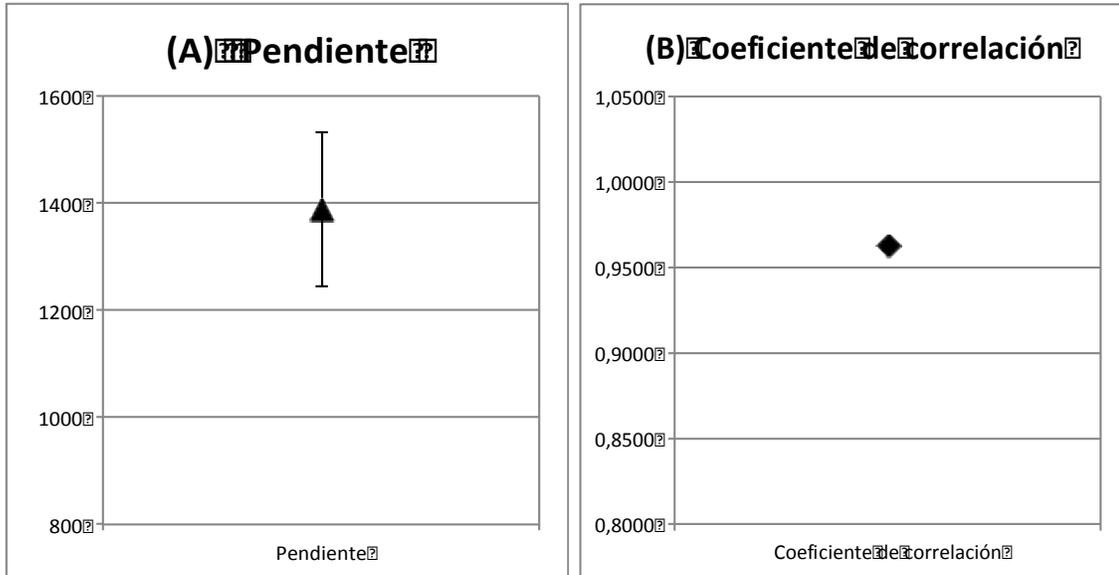


Figura 29. Evaluación de la linealidad entre la respuesta fluorescente (RFU) y el porcentaje de parasitemia; Pendiente (A) y coeficiente de correlación r^2 (B). Todas las mediciones se realizaron en quintuplicado, se presentan resultados de tres muestras procesadas de forma independiente. Cada valor es procesado mediante sustracción de la fluorescencia de fondo.

4.2.2 Exactitud del método fluorescente por SYBR Green I

La exactitud del método de fluorescencia empleando SGI, fue evaluada frente al recuento microscópico de extendidos de sangre teñidos con Giemsa, en muestras de sangre completa infectada por *P. berghei*. Se desarrolló el análisis bajo el proceso propuesto por Bland y Altman (1986). Los resultados evidencian concordancia entre los dos métodos con una diferencia media de 0,00016% +/- 3,37, Figura 30.

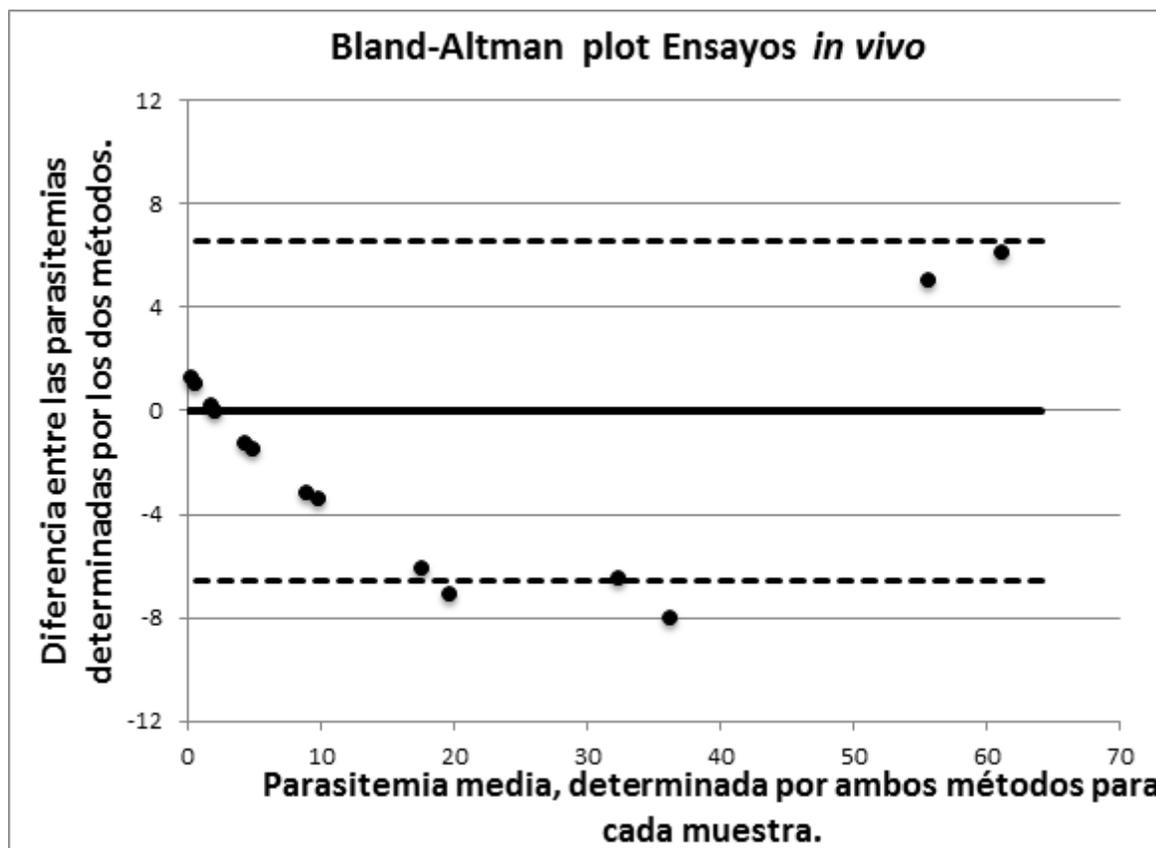


Figura 30. Representación gráfica de la diferencia entre el método de fluorescencia SGI y el método microscópico de valoración de extendidos de sangre coloreados con Giemsa, frente a sus valores medios. Muestras en matriz de sangre total infectada con *P. berghei* marcadas con SGI o coloreadas con Giemsa. Los datos se trazan para evaluar la concordancia entre los dos métodos de tinción. La línea continua indica la diferencia de medias entre los dos métodos. Las líneas punteadas indican los límites superiores e inferiores de concordancia.

Los métodos de cuantificación de parasitemia fueron comparados a lo largo del rango de valores de parasitemia comúnmente encontrados en el modelo farmacológico cuando es empleado en el tamizaje *in vivo* de sustancias o extractos con posible actividad antimalárica (1 a 50%); buscando conocer que tanto se corresponden los dos métodos de valoración de parasitemia.

El modelo farmacológico *in vivo* en su prueba de actividad antimalárica (*Test de Peters*), considera las diferencias de parasitemia de los animales control negativo (administrados con el vehículo de los tratamientos) frente a cada grupo tratado; normalmente las diferencias de parasitemia deben ser >50% para poder clasificar como activo un

tratamiento; luego aun si los dos métodos muestran en sus resultados que difieren hasta en un 5%, podríamos reemplazarlos entre si dado que esta diferencia no afectaría a las decisiones sobre tamizaje de actividad y en cada ensayo el grupo control activo monitorea internamente el desempeño de la prueba. A la luz de lo anterior y teniendo en cuenta que nuestro estudio muestra que el ensayo de fluorescencia con SGI puede arrojar resultados que están tan solo $0,00016 \pm 3,37\%$, por debajo o por encima de los arrojados por el método microscópico con Giemsa, es plausible el uso del nuevo método para los fines de tamizaje *in vivo* de actividad antimalárica. La gráfica generada no muestra tendencia direccional o heteroscedasticidad.

4.2.3 Sensibilidad del método fluorescente con SYBR Green I

Los límites de detección (LD) y de cuantificación (LC), permiten valorar la sensibilidad del método basado en fluorescencia de SGI, Figura 31.

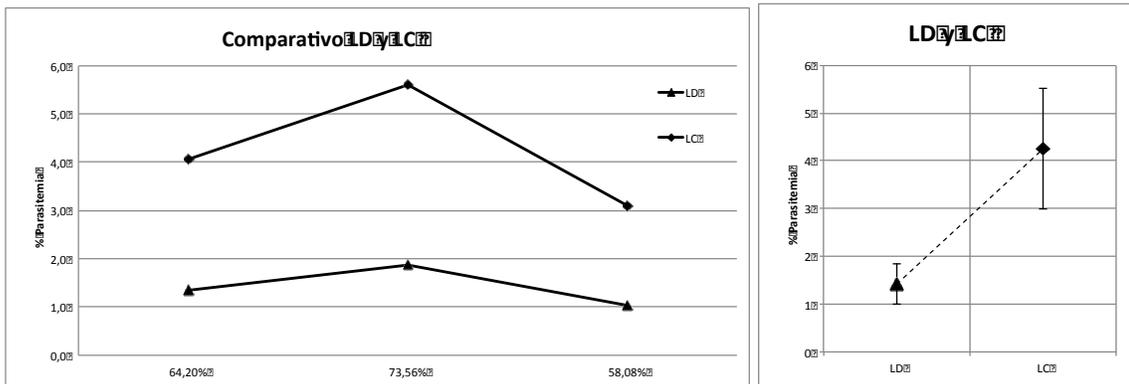


Figura 31. Modelo *in vivo*, evaluación de la sensibilidad del método fluorométrico con SGI; límite de detección (LD) y límite de cuantificación (LC). Todas las mediciones se realizaron en quintuplicado, se presentan resultados de tres muestras procesadas de forma independiente.

El límite de detección determinado para el método es $1,4 \pm 0,4\%$ de parasitemia y el límite de cuantificación $4,3 \pm 1,3\%$ de parasitemia; el LD es significativamente inferior al LC. La correlación lineal entre el porcentaje de parasitemia y la respuesta fluorescente correspondiente se mantiene hasta niveles tan bajos como $0,1\%$.

4.2.4 Calidad del método (Factor Z)

La calidad y robustez del ensayo se valoró mediante el uso del factor Z; en condiciones optimizadas (matriz de sangre total, lisis y 2h tinción), el factor Z logró valores promedio de $0,5866 \pm 0,0432$, a una parasitemia promedio de $4,1 \pm 0,5\%$, Figura 32. Los modelos farmacológicos que muestran un factor Z mayor de 0.5 ($1 > Z > 0,5$) denotan un muy buen método, con gran separación de banda, considerándose excelente para cribado de alto rendimiento (HTS, por sus siglas en inglés) (Johnson et al., 2007).

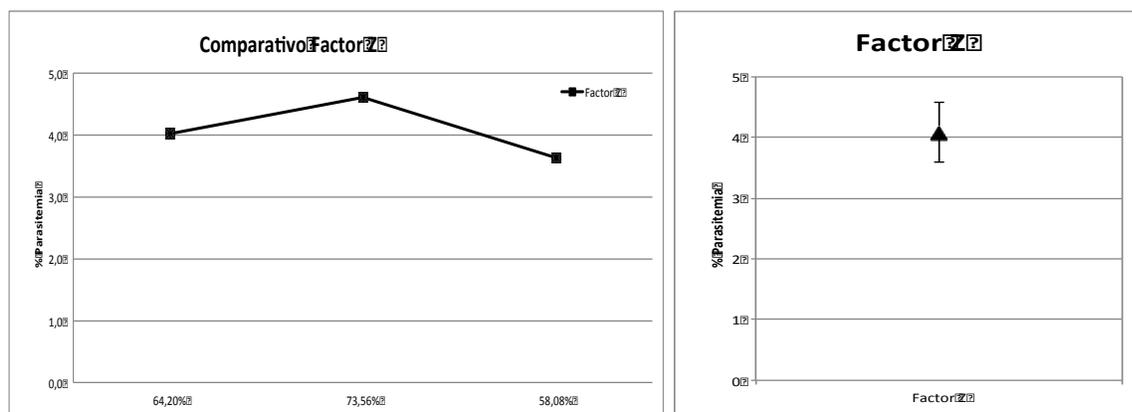


Figura 32. Evaluación de la calidad del método fluorométrico con SGI; Factor Z. Todas las mediciones se realizaron en quintuplicado, se presentan resultados de tres muestras procesadas de forma independiente.

A una dosis de 3 mg /Kg de cloroquina (CQ), y bajo las condiciones de nuestra prueba *Test de Peters*, la determinación del porcentaje de inhibición de la parasitemia fue de $81.3 \pm 8.9\%$, para el método fluorométrico y $83 \pm 15\%$ para el método microscópico, respectivamente.

En conclusión, el presente capítulo reporta la adaptación y optimización de un ensayo, alternativo a la citometría de flujo, que utilizando fluorómetros comúnmente disponibles en muchos laboratorios es: preciso, robusto, accesible y rápido para detectar agentes antipalúdicos en un modelo *in vivo* de malaria por *Plasmodium berghei*. Las condiciones óptimas para el método son muestras en matriz de sangre completa, lisis simple y dos horas de tinción; bajo estas condiciones el método detecta con precisión parasitemias superiores a 1,4%. Este protocolo fue desafiado, comparativamente con el método microscopio, en una prueba de supresión de 4 días y los resultados fueron comparables.

5. Conclusiones y recomendaciones

5.1 Conclusiones

El método de lectura por fluorimetría con SYBR Green I, es preciso, robusto, accesible y rápido para el tamizaje de sustancias o extractos con potencial actividad antiplasmodial en el modelo farmacológico de cultivo de *P falciparum*.

Las condiciones óptimas para el desarrollo de la valoración mediante fluorescencia con SGI, en el modelo *in vitro* son: cultivos asincrónicos, y dos horas de tiempo de tinción; bajo estas condiciones de ensayo detecta con precisión la parasitemias por encima de 1,5%.

El método de lectura por fluorimetría con SYBR Green I, es preciso, robusto, accesible y rápido para detectar agentes antipalúdicos en un modelo *in vivo* de malaria por *Plasmodium berghei*.

Las condiciones óptimas para el método, en el modelo *in vivo* son: muestras en matriz de sangre completa, lisis simple y dos horas de tinción; bajo estas condiciones el método detecta con precisión parasitemias superiores a 1,4%. Este protocolo fue desafiado, comparativamente con el método microscópico, en una prueba de supresión de 4 días y los resultados fueron comparables.

El método fluorométrico permite determinar de forma rápida, segura y confiable la densidad parasitaria en ambos modelos farmacológicos permitiendo superar las dificultades reconocidas del método microscópico, puede ser usado de forma rutinaria en muchos laboratorios, especialmente en regiones donde no se puede tener acceso a métodos tales como hipoxantina tritriada u otros métodos que requieren reactivos y equipos con un elevado costo.

5.2 Recomendaciones

Debido a las inconsistencias en el comportamiento de la cepa de *P. falciparum* FCB2, se recomienda hacer la valoración del método fluorométrico con una cepa diferente en estudios *in vitro*.

A. Anexo: Protocolo de fluorimetría con SYBR Green I para el modelo farmacológico *in vitro* de *P. falciparum*.

ADAPTACIÓN Y OPTIMIZACIÓN DEL MÉTODO

1. Obtención de las muestras para la realización del ensayo de fluorimetría

El día del ensayo, realice un extendido del cultivo y la tinción con Giemsa; bajo el microscopio usando el objetivo 100X determine el porcentaje de parasitemia.

En un tubo eppendorf tome 1 mL de muestra de cultivo, centrifúguela a 1600 rpm por 5 minutos, retire el sobrenadante y conserve la muestra de glóbulos rojos parasitados (GRP), para la realización del ensayo de fluorimetría. PARA REALIZAR EL ENSAYO DE FLUOROMETRÍA REALICE LOS CÁLCULOS EN LA HOJA DE EXCEL ANEXA A ESTE PROTOCOLO.

2. Determinación de las Unidades de Fluorescencia Relativa (UFR) de las muestras

2.1. Para cada una de las muestras prepare suspensiones de la muestra partiendo de la parasitemia inicial y llévela a la mitad adicionando Glóbulos rojos no parasitados (GRNP) hasta lograr una parasitemia igual a 0,006 % con un hematocrito al 2% en RPMI 1640.

2.2 En una placa de 96 pozos siembre por quintuplicado 100µL de cada una de las suspensiones, adicione en cada uno de los pozos 100 µL del SYBR Green I (2X) en buffer de lisis (prepárelo inmediatamente antes de adicionarlo a la placa), cubra la placa e incúbela en la oscuridad, realice la lectura de las URF, a las dos horas post-incubación

2.3 En la hoja de Excel® anexa a este protocolo, consigne los datos y realice el análisis de los mismos por regresión lineal.

- 74 Estandarización de un método fluorométrico para la determinación de la densidad parasitaria por Plasmodium en modelos farmacológicos de malaria *in vivo* e *in vitro*.
-

PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS, PREPARACIÓN DE REACTIVOS Y MONTAJE DE LA PLACA

PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS

Suspensión de glóbulos rojos

1. Prepare cuantas suspensiones sean necesarias para lograr una parasitemia del 0,006%.
2. Cada suspensión debe corresponder al 50% de la parasitemia de la suspensión inmediatamente anterior.
3. Todas las suspensiones deben ser preparadas con una concentración de hematocrito al 2%.
4. Realice los cálculos programados en la **orden de trabajo**: hoja de Microsoft Excel[®] anexa a este procedimiento.

PREPARACIÓN DE REACTIVOS

MEDIO INCOMPLETO:

Para preparar 1L

1. Reactivos:
 - Glucosa: 10 gramos
 - Hepes: 5,940 gramos
 - Hipoxantina: 0,026 miligramos
 - RPMI un frasco
2. Adicione 900mL de agua destilada
3. Mezcle con agitador magnético hasta que todos los reactivos estén completamente disueltos, aproximadamente por una hora o más.
4. Filtre con membrana de 0,22 μm y almacenar a 4°C

Nota: después de la preparación del reactivo tome una muestra y realice la prueba de esterilidad incubando la muestra a 37°C y leer a las 24, 48 y 72 horas, (para usar el reactivo la prueba a las 72 horas debe ser negativa).

SOLUCIÓN DE PBS 10X (1L)

1. Pese:

| | |
|----------------------------------|--------|
| KCl | 2g |
| NaCl | 80g |
| Na ₂ HPO ₄ | 11.5 g |
| KH ₂ PO ₄ | 2g |

2. Lleve hasta 1000 mL con agua destilada
3. Mida el pH (7.1 - 7.4)

SOLUCIÓN DE PBS 1X

Para preparar 500 mL de PBS 1X

1. Tome 50 mL de PBS 10X y adicione 450 mL de agua destilada
2. Almacene la solución a 4°C

BUFFER DE LISIS (20mM de Tris (pH 7.5), 5mM EDTA, 0,008% saponina, 0,08% Tritón X-100). Para preparar 100 mL.

| | |
|--------------|----------|
| Tris | 0,242 g |
| EDTA | 0,1461 g |
| Saponina | 0,008 g |
| Tritón X-100 | 80 µL |

1. Pese cada uno de los reactivos y suspenda en 100 mL de agua destilada
2. Mezcle con agitador magnético hasta que todos los reactivos estén completamente disueltos, aproximadamente por una hora o más.

1. En la placa siembre por 5 réplicas de 100 μ L, de cada una de las soluciones y del control negativo como se muestra en la imagen.
2. Adicione en cada pozo 100 μ L de la solución de SGI (2X) y mezcle cuidadosamente.
3. Cubra la placa e incube en la oscuridad a temperatura ambiente, durante dos horas.
4. Agite durante 60 segundos en el fluorometro, y realice la con ondas de excitación 485 nm y emisión 535 nm.

ANÁLISIS DE RESULTADOS

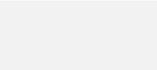
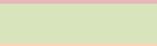
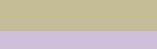
1. Los resultados del equipo se dan en unidades de fluorescencia relativa (URF), estas son directamente proporcionales a la parasitemia de cada una de las muestras.
2. Para el análisis de los datos obtenga el promedio de las URF de los cinco pozos de cada una de las suspensiones globulares y se reste el promedio de los cinco pozos del control negativo.
3. Grafique los resultados usando el promedio de las URF (eje Y) **Vs** porcentaje de parasitemia (eje X) y realice el análisis de los datos. Para graficar y analizar los datos use el archivo de **análisis de resultados**: hoja de Microsoft Excel ® anexa a este procedimiento.

PROCEDIMIENTO OPERACIONAL PARA EL DESARROLLO DE LA ACTIVIDAD ANTIMALÁRICA *IN VITRO*

Para la determinación de la IC₅₀ de cada extracto o sustancia se necesitan mínimo tres puntos de diferentes concentraciones (sembrar por triplicado), el presente protocolo permite la evaluación de 1 muestra en cada placa de 96 pozos, teniendo pozos para determinación por microscopia y fluorometría de manera simultánea.

1. Distribución de la placa de 96 pozos

| RESULTADOS EN UNIDADES RELATIVAS DE FLUORESCENCIA (URF) | | | | | | | | | | | | |
|---|---|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------|----|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
| A | | | | | | | | | | | | |
| B | | Dilución 1 | Dilución 3 | Dilución 5 | Dilución 7 | Dilución 1 | Dilución 3 | Dilución 5 | Dilución 7 | Contro Cto | GRNP | |
| C | | Dilución 1 | Dilución 3 | Dilución 5 | Dilución 7 | Dilución 1 | Dilución 3 | Dilución 5 | Dilución 7 | Contro Cto | GRNP | |
| D | | Dilución 1 | Dilución 3 | Dilución 5 | Dilución 7 | Dilución 1 | Dilución 3 | Dilución 5 | Dilución 7 | Contro Cto | GRNP | |
| E | | Dilución 2 | Dilución 4 | Dilución 6 | Dilución 8 | Dilución 2 | Dilución 4 | Dilución 6 | Dilución 8 | Contro Cto | CQ | |
| F | | Dilución 2 | Dilución 4 | Dilución 6 | Dilución 8 | Dilución 2 | Dilución 4 | Dilución 6 | Dilución 8 | Contro Cto | CQ | |
| G | | Dilución 2 | Dilución 4 | Dilución 6 | Dilución 8 | Dilución 2 | Dilución 4 | Dilución 6 | Dilución 8 | Contro Cto | CQ | |
| H | | | | | | | | | | | | |

| | |
|---|--|
|  | Muestra a diferentes concentraciones; pozos lectura microscopía |
|  | Muestra a diferentes concentraciones; pozos lectura fluorometría |
|  | Control de crecimiento en placa; lectura por microscopía |
|  | Control de crecimiento en placa; lectura por fluorometría |
|  | Glóbulos rojos no parasitados (GRNP) |
|  | Cloroquina (CQ) |
|  | Borde de agua |

2. Procedimiento

2.1 Preparación de las soluciones de trabajo

Las concentraciones a ensayar se obtienen por dilución seriada las cuales pueden ser preparadas en eppendorf estériles.

1. Marque 3 tubos falcón de 15 mil. (A, B, C)
2. **Tubo A:** Pesar 20mg de extracto y diluir en 1mL de vehículo (bRPMI). (concentración final 20000µg/ml). Filtrar bajo flujo laminar con poro 0.22.
3. **Tubo B.** Adicione 900 µl de bRPMI y agregue 100 µl de la solución anterior, homogenice (2000µg/ml)
4. **Tubo C.** Adicione 1800µl de cRPMI y agregue 200µl de la solución anterior, homogenice (200 µg/ml).

5. Rotular ocho tubos cónicos de 1.5ml como sigue:

Tubo N° 1: 200µg/ml (Solución madre)

Tubo N° 2: 100µg/ml

Tubo N° 3: 50µg/ml

Tubo N° 4: 25µg/ml

Tubo N° 5: 12,5µg/ml

Tubo N° 6: 6,25µg/ml

Tubo N° 7: 3,125µg/ml

Tubo N°8: 1,56 µg/ml

| |
|--|
| La concentración en placa queda ajustada a la mitad de lo rotulado en el tubo. |
|--|

6. Del tubo C transfiera 1500 µl al **tubo N°1** (solución madre)
7. A cada uno de los tubos desde el **N°2** hasta el **N°8** adicione 750 µl de cRPMI.
8. Realizar diluciones seriadas a partir del **tubo N°1**, tomando en cada caso 750 µl del tubo anterior homogenizando con el cRPMI agregado anteriormente. (cambie de punta cada vez que sirva).

2.2 Preparación de Patrón (Cloroquina)

2.2.1 Solución inicial: Preparar en agua destilada una solución 1 mg/mL (Pesar 10 mg y disolver en 10 mL), Solución A.

2.2.2 En cabina de flujo realizar las siguientes diluciones:

Tomar 100 µL de solución A y disolver en 900 µL de cRPMI (Solución B).

Tomar 10 µL de solución B y disolver en 990 µL de cRPMI (Solución C).

Transfiera 100µl de la solución C, a la placa de 96 pozos según corresponda.

3. Preparación de la placa para evaluación de extractos vegetales

- 3.1 Colocar 100 µl de cada una de las diluciones en todos los pozos de las letras B a G del número 2 al 9 según distribución en placa.
- 3.2 Colocar 100 µl de la suspensión de glóbulos rojos parasitados (GRP), ajustada al 2% de hematocrito, en todos los pozos de las letras B a G del número 2 al 9.
- 3.3 Colocar 100 µl de cRPMI + 100 µl de la suspensión de GRP en todos los pozos de la columna 10 como control de crecimiento.
- 3.4 Adicionar 100 µl de glóbulos rojos no parasitados (GRNP), con hematocrito al 2% + 100 µl de cRPMI en los pozos B a D de la columna 11.
- 3.5 Adicionar 100 µl de glóbulos rojos parasitados (GRP), con hematocrito al 2% + 100 µl de CQ 0.039 µg/mL en los pozos E a G de la columna 11.
- 3.6 Homogenizar toda la placa por agitación durante 60 segundos.
- 3.7 Tapar las placas, colocarlas en un recipiente adecuado, gasear con mezcla de gases (5% CO₂, 5% O₂, 90% Nitrógeno) por 5 minutos o colocar directamente en incubadora de CO₂.
- 3.8 Incubar a 37°C por 48 horas.

4. Determinación del porcentaje de parasitemia por microscopia

- 4.1. Retirar cuidadosamente de uno de los pozos control de crecimiento (B10 a G10) el medio sobrenadante.
- 4.2. Realizar el frotis del pellet, evaluar la parasitemia y los estadios del cultivo
- 4.3. Verificar que el cultivo se encuentra en estadios jóvenes y la parasitemia es considerablemente superior a la inicial.
- 4.4. Realizar los frotis de los pozos destinados a determinación por microscopia.
- 4.5. Fijar el frotis con metanol
- 4.6. Realizar coloración de Giemsa

- 4.7. Realizar conteo de glóbulos rojos parasitados y no parasitados por el método visual (1000 glóbulos rojos totales)
- 4.8. Realizar cálculo de parasitemia y porcentaje de inhibición de acuerdo a las ecuaciones

$$\% \text{ Parasitemia} = \frac{\text{Glóbulos rojos parasitados}}{\text{glóbulos rojos totales}} * 100$$

$$\% \text{ de Inhibición} = \frac{\text{Parasitemia del blanco} - \text{Parasitemia de la muestra}}{\text{Parasitemia de blanco}} * 100$$

5. Determinación del porcentaje de parasitemia por fluorimetría

- 5.1. Centrifugar la placa de 96 pozos a 2000rpm x 5 minutos
- 5.2. Descartar el sobrenadante y re suspender el pellet en 150µl de PBS 1X
- 5.3. Repita pasos 5.1 y 5.2
- 5.4. Transferir 100µl de cada pozo a una placa de 96 pozos negra.
- 5.5. Agregar 100µl de SGI (2X) en buffer de lisis, mezclar cuidadosamente
- 5.6. Incubar a temperatura ambiente por 2 horas en la oscuridad
- 5.7. Leer en el fluorometro con ondas de excitación y emisión de 485nm y 535nm, respectivamente.

6. Análisis de resultados

Los resultados del equipo se dan en unidades de fluorescencia relativa (UFR), estas son directamente proporcionales a la parasitemia de cada pozo.

- 6.1. Para el análisis de los datos obtenga el promedio de las URF de los tres pozos de cada una de las suspensiones globulares y se reste el promedio de los pozos del control negativo.
- 6.2. Grafique resultados usando el promedio de las URF (eje Y) **Vs** porcentaje de parasitemia (eje X). Para graficar y analizar los datos use el archivo de **análisis de resultados**: hoja de Microsoft Excel ® anexa a este procedimiento.

APENDICE 1

CULTIVO DE *PLASMODIUM FALCIPARUM*

Obtención de glóbulos rojos parasitados

a. Preparación de medio de cultivo

Para un litro:

- Disuelva 2 g de glucosa en 50 mL de agua destilada
- Disuelva 5.92 g de HEPES en 50 mL de agua destilada
- Disuelva 10 mg de Hipoxantina en 75 mL de agua destilada CALIENTE
- Disuelva 1 frasco de RPMI en 400 mL de agua destilada
- Adicione las preparaciones anteriores en una probeta y adicione agua destilada hasta alcanzar un volumen de 900 mL
- Filtre en sistema con membrana de 0.22 µm
- Realice prueba de esterilidad colocando 5 mL de medio preparado en tubo falcón y lleve a incubación por 72 horas
- A las 72 horas verifique que el medio sea claro y que no haya presencia de partículas

b. Obtención de GR para el cultivo

- i. Tomar en un tubo de tapa azul con citrato como anticoagulante, 10 mL de sangre de un voluntario sano que no haya consumido ningún medicamento durante 4 semanas previas a la toma de la muestra.
- ii. Centrifugar la muestra durante 10 minutos a 800 – 1000g
- iii. Marcar el tubo hasta el nivel del sobrenadante y descartar el sobrenadante (plasma y células blancas)
- iv. Adicionar medio de cultivo al nivel donde estaba el plasma
- v. Centrifugar 5 minutos a 500g (3000 r.p.m.) y descartar sobrenadante
- vi. Repetir paso 4 y 5
- vii. Descartar sobrenadante

- viii. Volver a centrifugar para retirar todo el medio de cultivo y dejar solo los GR empaquetados

c. Descongelación del cultivo

- i. Tomar un criovial del tanque de nitrógeno líquido y sostenerlo en la mano por 1 minuto o hasta que se descongele completamente y alcance una temperatura de 37°C. aproximadamente.
- ii. En cabina de flujo laminar adicionar gota a gota en el criovial 100 µL de **NaCl 12%**, mezclar suavemente cada vez que se adicione una gota, siempre sosteniendo el tubo en la mano para mantener la temperatura.
- iii. Mantener el criovial en la mano por 5 minutos en reposo total.
- iv. Pasar el contenido a un tubo falcón® de 15 mL y adicionar 5 mL de **NaCl 1.6%** estéril gota a gota y agitando suavemente.
- v. Centrifugar a 500g (3000 r.p.m.) por 10 minutos y retirar sobrenadante con pipeta Pasteur de vidrio.
- vi. Adicionar 5 mL de **NaCl 0.9%/dextrosa 0.2%** estéril gota a gota agitando suavemente mientras permanece en la mano.
- vii. Centrifugar a 500g (3000 r.p.m.) por 10 minutos y retirar sobrenadante con pipeta Pasteur de vidrio.
- viii. Adicionar 5 mL de medio **RPMI** y agitar suavemente
- ix. Centrifugar a 500g (3000 r.p.m.) por 5 minutos y retirar sobrenadante con pipeta Pasteur de vidrio.
- x. Adicionar 200 µL de GRN y 10 mL de medio **RPMI completo**
- xi. Pasar a una caja de cultivo de 25 mL cerrar la caja y llevar a incubadora a 37°C con CO₂ 5% y una vez en la incubadora destapar un poco la caja.
- xii. Dejar por dos días sin medir la parasitemia.

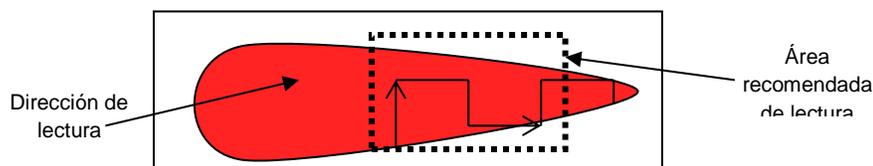
Preparación de las soluciones de NaCl 12%, 1.6% y NaCl 0.9%/ dextrosa 0.2%

- i. Para preparar la solución de **NaCl 12%**: Pesar 12 g de NaCl y disolver en 100 mL de agua destilada

- ii. Para preparar la solución de **NaCl 1.6%**: Pesar 1.6 g de NaCl y disolver en 100 mL de agua destilada
- iii. Para preparar la solución de **NaCl 0.9%/dextrosa 0.2%**: Pesar 0.9 g de NaCl +0.2 g de dextrosa (glucosa) y disolver en 100 mL de agua destilada.

d. Coloración de los frotis

- i. Fijar el extendido con metanol (adicionar tantas gotas como sean necesarias para cubrir todo el frotis), descartar el metanol y secar la lámina con secador hasta que esté completamente seca.
- ii. Preparar la solución de Giemsa 1:9 (1 μ l de colorante por 9 μ l de buffer o agua)
- iii. Adicionar la solución de Giemsa sobre la placa y dejar por 10 minutos
- iv. Lavar con agua potable
- v. Secar
- vi. Observar al microscopio con objetivo de inmersión leyendo los campos necesarios (que contengan c/u entre 30 y 300 glóbulos rojos de manera homogénea y no superpuestos) para un recuento de 1.000 glóbulos rojos totales, leer la lámina como en la figura



- vii. Calcular el porcentaje de parasitemia

e. Mantenimiento del cultivo

- i. Atemperar el medio de cultivo, al igual que los GR y el suero colocándolo en incubadora a 37°C
- ii. Transferir cuidadosamente la caja de cultivo a cabina de flujo laminar.
- iii. Agitar suavemente la caja para desprender los GR sedimentados de la parte inferior.

- iv. Destapar la caja y cuidadosamente retirar con pipeta 500 μ L.
- v. Centrifugar por 2 minutos a 500g (3000 r.p.m.)
- vi. Del pellet tomar 5 μ L para realizar el frotis.
 1. Realizar coloración Giemsa (**apéndice 7.4**)
 2. Observar estadios y calcular parasitemia
 3. **Sincronizar (apéndice 7.8)**, con una parasitemia mayor a 4% en estadio de anillos y un pellet cercano de 0.5 mL.
- vii. Dejar sedimentar los GR para posteriormente descartar el medio de cultivo que está en la parte superior
- viii. Adicionar medio **RPMI completo** de acuerdo a si va a cambiar el medio o ampliar el cultivo, cantidad necesaria para una caja de 25 mL
- ix. Homogenizar y dependiendo de la parasitemia y hematocrito adicionar **GRN** y/o dividir el cultivo.

f. Cambio de medio de cultivo

- i. Atemperar el medio de cultivo, los GR y el suero colocándolos en incubadora a 37°C
- ii. Tomar la caja de cultivo de la incubadora cuidadosamente sin agitarla y colocarla en la cabina de seguridad biológica. Si la caja se agita durante este proceso debe dejarse estabilizar por 30 minutos.
- iii. En la cabina, retirar con pipeta Pasteur de vidrio el medio sobrenadante del cultivo
- iv. Reemplazar el medio retirado por igual cantidad de medio completo nuevo
- v. Agitar suavemente
- vi. Llevar a incubadora de CO₂, si no tiene poner la caja de cultivo dentro de una cámara de incubación, encender una vela, aflojar la tapa y cerrar esperando hasta que la llama se extinga y llevar a incubadora 37°C.

g. Ampliación de cultivo

- i. Atemperar el medio de cultivo, los GR y el suero colocándolo en incubadora a 37°C

- ii. Tomar la caja de cultivo de la incubadora cuidadosamente y colocarla en la cabina de seguridad biológica.
- iii. Agitar suavemente la caja para desprender los GR sedimentados de la parte inferior de la caja.
- iv. Destapar la caja, retirar con mucho cuidado 500 µL con pipeta y transferirlos a un tubo eppendorf estéril.
- v. Deje la caja reposar durante al menos 30 minutos, para que los glóbulos rojos se sedimenten nuevamente.
- vi. Centrifugar la muestra tomada en el tubo eppendorf por 2 minutos a 500g (3000 r.p.m).
- vii. Del pellet tomar 5 µL para realizar el frotis.
 1. Realizar coloración Giemsa (**apéndice 7.4**)
 2. Observar estadios y calcular parasitemia
- viii. De acuerdo a la parasitemia sacar cálculos utilizando la fórmula $V_1 \cdot C_1 = V_2 \cdot C_2$ esto dependiendo la concentración a la cual desee y necesite dejar el cultivo
- ix. Tomar la cantidad de cultivo anterior que necesite y adicionar 10 mL de medio de cultivo el mismo volumen de GR sanos que el hematocrito que estaba presente en el cultivo
- x. Agitar suavemente
- xi. Llevar a incubadora de CO₂, si no tiene o poner la caja de cultivo dentro de una cámara de incubación, encender una vela, aflojar la tapa y cerrar esperando hasta que la llamase extinga y llevar a incubadora 37°C.

h. Sincronización del cultivo

- i. Transferir cuidadosamente la caja de cultivo a cabina de flujo laminar.
- ii. Agite cuidadosamente la caja para desprender los glóbulos rojos sedimentados
- iii. Transferir el cultivo a un tubo falcón estéril de 15 mL
- iv. Centrifugar a 500G (3000r.p.m.) por 5 minutos y retirar sobrenadante con pipeta.

- v. Adicionar 9 partes de **sorbitol 5%**, homogenizar e incubar a 37°C por 10 minutos.
- vi. Centrifugar a 500g (3000r.p.m.) por 5 minutos y retirar sobrenadante con pipeta Pasteur de vidrio.
- vii. Adicionar 5 mL de **RPMI** y homogenizar.
- viii. Centrifugar a 500g (3000 r.p.m.) por 5 minutos y retirar sobrenadante con pipeta.
- ix. Adicionar medio **RPMI completo** suficiente para que el hematocrito quede a 5%.
- x. Pasar a una caja de cultivo de 25 mL cerrar la caja y llevar a incubadora a 37°C con CO₂ 5% y una vez en la incubadora destapar un poco la caja.
- xi. Revisar a las 48 horas.

Preparación de la solución de sorbitol al 5%

Para preparar la solución de sorbitol al 5%: pesar 5g de sorbitol y diluirlos en 100 mL de agua destilada estéril, y filtrar con pirinola de 0.22 µm.

i. Congelación del cultivo

Si se tiene el cultivo con predominio en estadio de anillo y con una parasitemia superior al 4%.

Transferir cuidadosamente la caja de cultivo a cabina de flujo laminar.

- i. Transferir el cultivo a un tubo falcón estéril de 15 mL
- ii. Centrifugar a 500g (3000 r.p.m.) por 5 minutos y retirar sobrenadante con pipeta
- iii. Retirar cuidadosamente la capa superior de GR (apariencia oscura)
- iv. De acuerdo a la parasitemia adicionar GR para disminuir la parasitemia a la mitad.
- v. Adicionar solución criopreservante 1:4 (1 de pellet : 4 de criopreservante)

- vi. Adicionar la solución gota a gota, agitando suavemente
- vii. Servir de 700 µL en tubos de criopreservación estériles
- viii. Llevar a -70°C por 24 horas
- ix. Pasar a Nitrógeno líquido por el resto de conservación

Preparación de la solución criopreservante:

Mezclar 28 mL de glicerol+ 3.024 g de sorbitol + 0.65 g de cloruro de sodio + 72 mL de agua destilada y filtrar en pirinola de 0.22 µm

j. Preparación de suspensión de Glóbulos rojos parasitados

- i. Realizar un frotis de GRP y confirmar la parasitemia y el estadio de anillos.
- ii. Alistar 7.5 mL de RPMI completo por placa previamente preparados.
- iii. Centrifugar la suspensión de GRP y de acuerdo al % de parasitemia adicionar GRN para lograr una parasitemia al 2%.
- iv. Adicionar medio suficiente para alcanzar un hematocrito al 5% (en placa el hematocrito se reduce a 2.5%).
- v. Colocar cada pozo de la fila B a la G 100 µL de suspensión de GRP.
- vi. Tapar la placa.
- vii. Incubar a 37°C con atmósfera adecuada por 48 horas.

B. Anexo: Protocolo de adaptación y optimización del método fluorométrico con SYBR Green I para el modelo farmacológico *in vivo* de *P. berghei*.

ADAPTACIÓN Y OPTIMIZACIÓN DEL MÉTODO

1. Obtención de las muestras para la realización del ensayo de fluorometría

El día cuatro posterior a la infección de los animales evalué la parasitemia de los ratones donadores infectados mediante extensión y coloración, de manera que se obtenga el porcentaje de parasitemia (**Apéndice 7**).

Para los ensayos de determinación de la linealidad y el método de lisado, obtenga por punción retroorbital una muestra de sangre de los animales infectados y de los donadores sanos (aproximadamente 80µL).

Para los ensayos de comparación del tipo de muestra, obtenga por punción cardíaca aproximadamente entre 500 a 1000µL de muestra (Apéndice 8).

2. Determinación de las Unidades de Fluorescencia Relativa (UFR) de las muestras

2.1. Para cada una de las muestras prepare suspensiones de la muestra partiendo de la parasitemia inicial y llévela a la mitad adicionando glóbulos rojos no parasitados (GRNP), hasta lograr una parasitemia igual a 0,006 % con un hematocrito al 2% en RPMI 1640.

2.2 En una placa de 96 pozos siembre por quintuplicado 100µL de cada una de las suspensiones celulares, adicione a cada uno de los pozos 100 µL del SGI (2X) en buffer de lisis (prepárelo inmediatamente antes de adicionarlo a la placa), cubra la placa e incúbela en la oscuridad, realice la lectura de las URF, dos horas post-incubación.

2.3 En la hoja de Excel ® anexa a este protocolo, consigne los datos y realice el análisis de los mismos por regresión lineal.

PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS, PREPARACIÓN DE REACTIVOS Y MONTAJE DE LA PLACA

PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS

Suspensión de glóbulos rojos

1. Prepare cuantas suspensiones sean necesarias para lograr una parasitemia del 0,006%.
2. Cada suspensión debe corresponder al 50% de la parasitemia de la suspensión inmediatamente anterior.
3. Todas las suspensiones deben ser preparadas con una concentración de hematocrito al 2%.
4. Realice los cálculos programados en la **orden de trabajo**: hoja de Microsoft Excel ® anexa a este procedimiento.

PREPARACIÓN DE REACTIVOS

MEDIO INCOMPLETO:

Para preparar 1L

Reactivos:

- Glucosa: 10 gramos
- Hepes: 5,940 gramos
- Hipoxantina: 0,026 miligramos
- RPMI un frasco

1. Adicione 900mL de agua destilada
2. Mezcle con agitador magnético hasta que todos los reactivos estén completamente disueltos, aproximadamente por una hora o más.
3. Filtre con membrana de 0,22 μm y almacenar a 4°C

Nota: después de la preparación del reactivo tome una muestra y realice la prueba de esterilidad incubando la muestra a 37°C y leer a las 24, 48 y 72 horas, (para usar el reactivo la prueba a las 72 horas debe ser negativa).

SOLUCIÓN DE PBS 10X (1L)

1. Pese:

| | |
|----------------------------------|--------|
| KCl | 2g |
| NaCl | 80g |
| Na ₂ HPO ₄ | 11.5 g |
| KH ₂ PO ₄ | 2g |

2. Lleve hasta 1000 mL con agua destilada
3. Mida el pH (7.1 - 7.4)

SOLUCIÓN DE PBS 1X

Para preparar 500 mL de PBS 1X

1. Tome 50 mL de PBS 10X y adicione 450 mL de agua destilada
2. Almacene la solución a 4°C

BUFFER DE LISIS (20mM de Tris (pH 7.5), 5mM EDTA, 0,008% saponina, 0,08% Tritón X-100). Para preparar 100 mL.

| | |
|------|---------|
| Tris | 0,242 g |
| EDTA | 0,1461 |

| | |
|--------------|---------|
| | g |
| Saponina | 0,008 g |
| Tritón X-100 | 80 µL |

1. Pese cada uno de los reactivos y suspenda en 100 mL de agua destilada.
2. Mezcle con agitador magnético hasta que todos los reactivos estén completamente disueltos, aproximadamente por una hora o más.
3. Mida el pH (7.5).
4. Almacene a temperatura ambiente.

SYBR Green I (100X)

1. Prepare una solución de 100X en DMSO partiendo de la solución de 10.000X, utilizando la fórmula $C1 \cdot V1 = C2 \cdot V2$.
2. Almacene la solución protegida de la luz a -20°C.

SYBR Green I (2X)

A partir de la solución 100X prepare la solución 2X en Buffer de lisis, (para calcular la cantidad de SGI 100X y Buffer de lisis necesarios para preparar la solución 2X realice los cálculos programados en la **orden de trabajo**: hoja de Microsoft Excel ® anexa a este procedimiento (la solución debe prepararse inmediatamente antes de la lectura del ensayo y **NO DEBE ALMACENARSE**).

2. MONTAJE DE LA PLACA

Se utilizan placas negras de 96 pozos de fondo plano.

Distribución de la placa de 96 pozos

| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
|---|---|--------------------------------------|--------------------------------------|--------------------------------------|--------------------------------------|--------------------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|----|
| A | | | | | | | | | | | | |
| B | | Suspensión 1 (100 µL) | Suspensión 7 (100 µL) | Suspensión 7 (100 µL) | Suspensión 7 (100 µL) | Suspensión 7 (100 µL) | Suspensión 7 (100 µL) | |
| C | | Suspensión 2 (100 µL) | Suspensión 8 (100 µL) | Suspensión 8 (100 µL) | Suspensión 8 (100 µL) | Suspensión 8 (100 µL) | Suspensión 8 (100 µL) | |
| D | | Suspensión 3 (100 µL) | Suspensión 9 (100 µL) | Suspensión 9 (100 µL) | Suspensión 9 (100 µL) | Suspensión 9 (100 µL) | Suspensión 9 (100 µL) | |
| E | | Suspensión 4 (100 µL) | Suspensión 10 (100 µL) | Suspensión 10 (100 µL) | Suspensión 10 (100 µL) | Suspensión 10 (100 µL) | Suspensión 10 (100 µL) | |
| F | | Suspensión 5 (100 µL) | Control negativo | Control negativo | Control negativo | Control negativo | Control negativo | |
| G | | Suspensión globular G (100 µL) | Pozo vacío | |
| H | | | | | | | | | | | | |

- En la placa siembre por 5 réplicas de 100 µL, de cada una de las soluciones y del control negativo como se muestra en la imagen.
- Adicione en cada pozo 100µL de la solución de SGI (2X) y mezcle cuidadosamente.
- Cubra la placa.
- Incube en la oscuridad a temperatura ambiente, durante dos horas.
- Agite durante 60 segundos en el fluorómetro, y realice la con ondas de excitación 485 nm y emisión 535 nm.

ANÁLISIS DE RESULTADOS

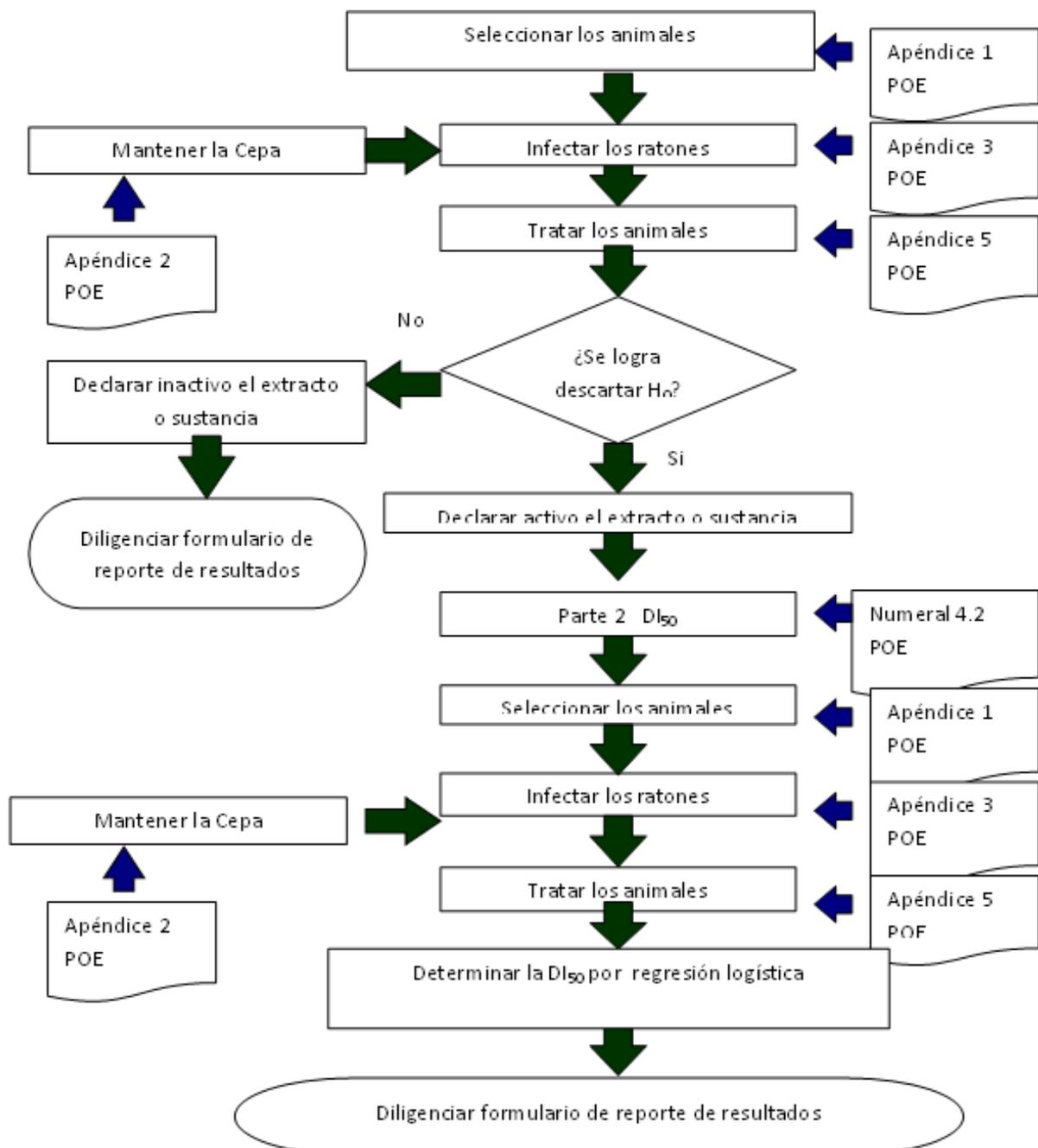
- Los resultados del equipo se dan en unidades de fluorescencia relativa (UFR), estas son directamente proporcionales a la parasitemia de cada una de las muestras.

2. Para el análisis de los datos obtenga el promedio de las URF de los cinco pozos de cada una de las suspensiones globulares y se reste el promedio de los cinco pozos del control negativo.

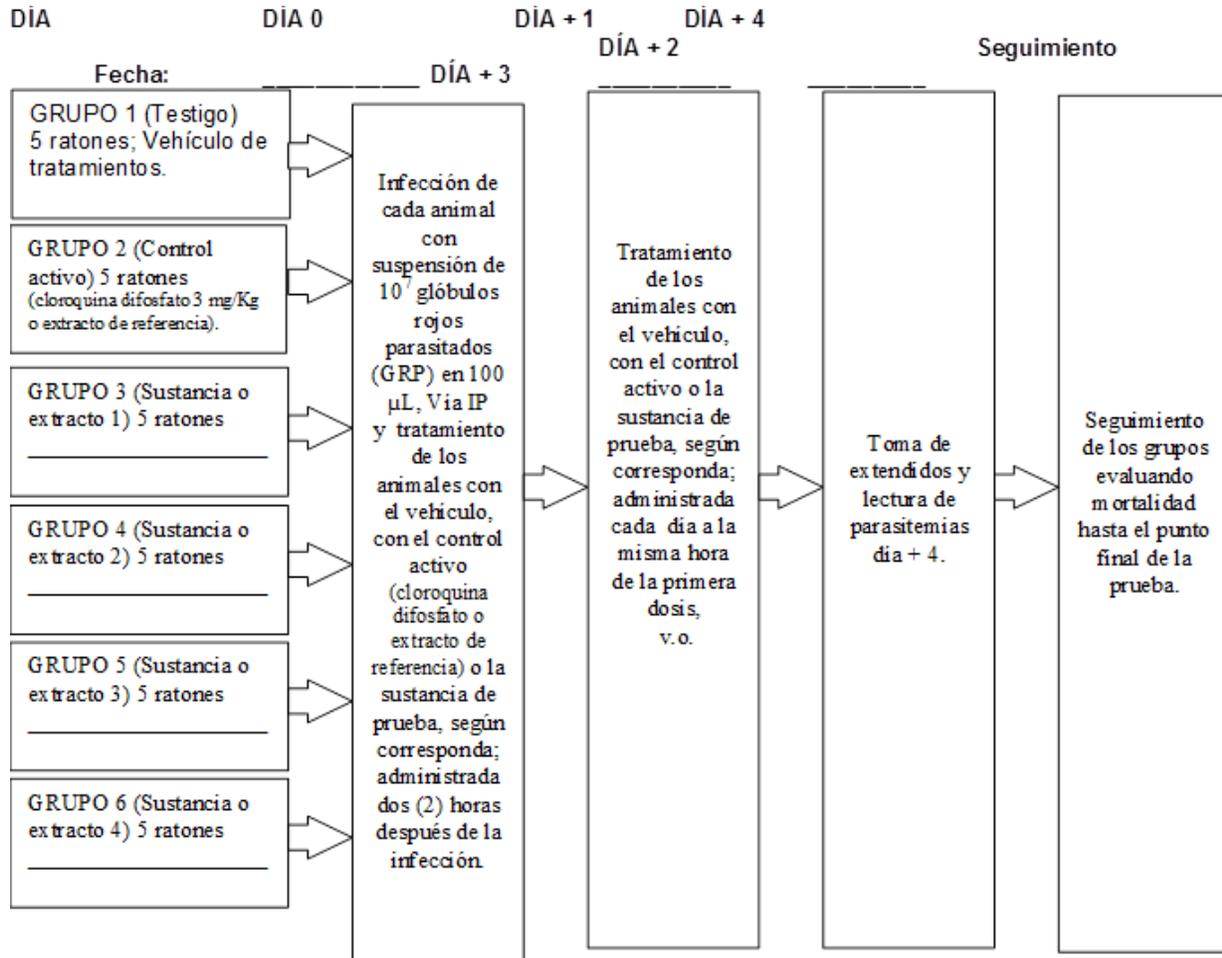
3. Grafique los resultados usando el promedio de las URF (eje Y) **Vs** porcentaje de parasitemia (eje X) y realice el análisis de los datos. Para graficar y analizar los datos use el archivo de **análisis de resultados**: hoja de Microsoft Excel® anexa a este procedimiento.

Procedimiento operacional para la determinación de la actividad antimalárica *in vivo*: Prueba supresiva de 4 días (test de Peters) de actividad antimalárica.

DIAGRAMA DE FLUJO



El ensayo estándar, de acuerdo con la capacidad instalada, comprende la evaluación de cuatro sustancias o extractos, un grupo testigo con el vehículo de las sustancias y un grupo control tratado con cloroquina difosfato según el siguiente diseño.



- Los tratamientos son asignados al azar a cada grupo de 5 ratones
- Los ratones son mantenidos en cajas (5 animales por caja) (Apéndice 1) y permanecen durante la prueba con agua y alimento *ad libitum*.

1. Determinación del porcentaje de inhibición por microscopia

1.1 El día 4 post-infección tome una gota de sangre de la cola de cada animal, realice un extendido en una lámina portaobjetos y fíjelo con metanol (Apéndice 7).

1.2 Realizar coloración de Giemsa.

1.3 Realizar conteo de glóbulos rojos parasitados y no parasitados por el método visual (1000 glóbulos rojos totales).

1.4 Realizar cálculo de parasitemia y porcentaje de inhibición de acuerdo a las ecuaciones.

$$\% \text{ Parasitemia} = \frac{\text{Glóbulos rojos parasitados}}{\text{glóbulos rojos totales}} * 100$$

$$\% \text{ de Inhibición} = \frac{\text{Parasitemia del blanco} - \text{Parasitemia de la muestra}}{\text{Parasitemia de blanco}} * 100$$

2. Determinación del porcentaje de inhibición por fluorometría

El presente protocolo permite la evaluación de 1 muestra en cada placa de 96 pozos.

2.1 El día 4 post-infección por punción retroorbital obtenga aproximadamente 80 µL de cada animal y deposítela en un tubo eppendorf prelavado con heparina.

2.2 Centrifugue la muestra por dos minutos a 1600rpm.

2.3 Descartar el sobrenadante y re suspender el pellet para lograr una suspensión celular al 2% de hematocrito en PBS 1X.

2.4 Transferir 100µl de cada pozo a una placa de 96 pozos negra.

2.5 Agregar 100µl de SGI (2X) en buffer de lisis, mezclar cuidadosamente.

2.6 Incubar a temperatura ambiente por 2 horas en la oscuridad.

2.7 Leer en el fluorometro con ondas de excitación y emisión de 485nm y 535nm, respectivamente.

Distribución de la placa de 96 pozos

| RESULTADOS EN UNIDADES RELATIVAS DE FLORESCENCIA (URF) | | | | | | | | | | | | |
|--|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
| A | Vehículo Animal 1 | Vehículo Animal 1 | Vehículo Animal 1 | Vehículo Animal 2 | Vehículo Animal 2 | Vehículo Animal 2 | Vehículo Animal 3 | Vehículo Animal 3 | Vehículo Animal 3 | Vehículo Animal 4 | Vehículo Animal 4 | Vehículo Animal 4 |
| B | Vehículo Animal 5 | Vehículo Animal 5 | Vehículo Animal 5 | Control activo Animal 1 | Control activo Animal 1 | Control activo Animal 1 | Control activo Animal 2 | Control activo Animal 2 | Control activo Animal 2 | Control activo Animal 3 | Control activo Animal 3 | Control activo Animal 3 |
| C | Control activo Animal 4 | Control activo Animal 4 | Control activo Animal 4 | Control activo Animal 5 | Control activo Animal 5 | Control activo Animal 5 | TTo 1 Animal 1 | TTo 1 Animal 1 | TTo 1 Animal 1 | TTo 1 Animal 2 | TTo 1 Animal 2 | TTo 1 Animal 2 |
| D | TTo 1 Animal 3 | TTo 1 Animal 3 | TTo 1 Animal 3 | TTo 1 Animal 4 | TTo 1 Animal 4 | TTo 1 Animal 4 | TTo 1 Animal 5 | TTo 1 Animal 5 | TTo 1 Animal 5 | TTo 2 Animal 1 | TTo 2 Animal 1 | TTo 2 Animal 1 |
| E | TTo 2 Animal 2 | TTo 2 Animal 2 | TTo 2 Animal 2 | TTo 2 Animal 3 | TTo 2 Animal 3 | TTo 2 Animal 3 | TTo 2 Animal 4 | TTo 2 Animal 4 | TTo 2 Animal 4 | TTo 2 Animal 5 | TTo 2 Animal 5 | TTo 2 Animal 5 |
| F | TTo 3 Animal 1 | TTo 3 Animal 1 | TTo 3 Animal 1 | TTo 3 Animal 2 | TTo 3 Animal 2 | TTo 3 Animal 2 | TTo 3 Animal 3 | TTo 3 Animal 3 | TTo 3 Animal 3 | TTo 3 Animal 4 | TTo 3 Animal 4 | TTo 3 Animal 4 |
| G | TTo 3 Animal 5 | TTo 3 Animal 5 | TTo 3 Animal 5 | TTo 4 Animal 1 | TTo 4 Animal 1 | TTo 4 Animal 1 | TTo 4 Animal 2 | TTo 4 Animal 2 | TTo 4 Animal 2 | TTo 4 Animal 3 | TTo 4 Animal 3 | TTo 4 Animal 3 |
| H | TTo 4 Animal 4 | TTo 4 Animal 4 | TTo 4 Animal 4 | TTo 4 Animal 5 | TTo 4 Animal 5 | TTo 4 Animal 5 | Control negativo | Control negativo | Control negativo | Control negativo | Control negativo | Control negativo |

| | |
|--|------------------------------|
| | Vehículo |
| | Control activo (CQ) |
| | Tratamiento 1 (TTo 1) |
| | Tratamiento 2 (TTo 2) |
| | Tratamiento 3 (TTo 3) |
| | Tratamiento 4 (TTo 4) |
| | Control negativo |

3. Análisis de resultados

Los resultados del equipo se dan en UFR, estas son directamente proporcionales a la parasitemia de cada pozo.

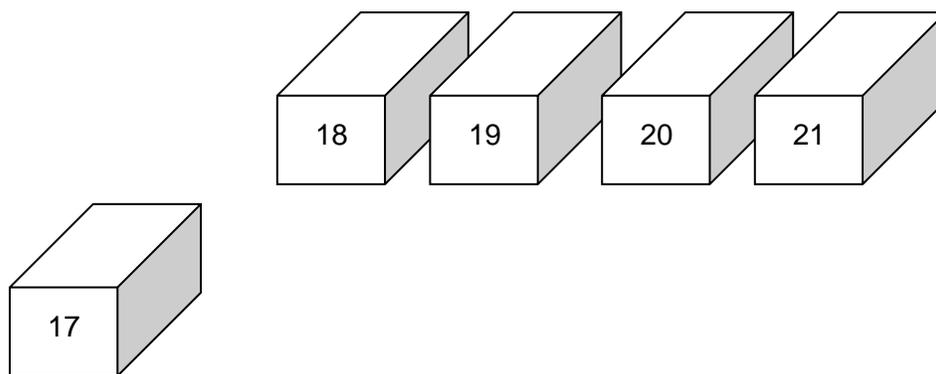
3.1 Para el análisis de los datos obtenga el promedio de las URF de los tres pozos de cada una de las suspensiones globulares y se reste el promedio de los pozos del control negativo.

3.2 Grafique resultados usando el promedio de las URF (eje Y) **Vs** porcentaje de parasitemia (eje X). Para graficar y analizar los datos use el

archivo de **análisis de resultados**: hoja de Microsoft Excel® anexa a este
procedimiento.

APENDICE 1**PROCEDIMIENTO PARA LA PESADA Y ASIGNACIÓN DE LOS ANIMALES A LOS GRUPOS DE TRATAMIENTO**

1. Seleccione ratones del mismo género, sanos, tipo ICR, de 4 semanas de edad, peso 20 ± 2 g. Se deben seleccionar 5 animales por dosis de sustancia o extracto a evaluar (se utiliza este número de ratones, para realizar una adecuada interpretación de resultados, puesto que debe ser impar el número de ratones y dando la opción de que si alguno fallece por efecto del tratamiento se pueda contar con otros animales evitando pérdida total de los datos por tratamiento y adicionalmente dos grupos de 5 ratones que recibirán el tratamiento activo (Cloroquina) y el tratamiento testigo vehículo de las sustancias o extractos (DMSO < 10%), en total 30 animales.
2. Clasifique los animales de acuerdo a su peso de la siguiente manera:
 - Prepare cinco cajas e identifíquelas como sigue:



Cada animal es pesado y de acuerdo con su peso, asignado a una de las cajas (Ej. un animal que pese 20,8 g es asignado a la caja 20).

Los animales de menos de 17 g o más de 22 g son excluidos del experimento.

Los animales de peso entre 17 y 18 g son colocados en la caja 17 y de ser necesario empleados para completar grupos de peso cercano.

Una vez que se tienen 5 animales en cualquiera de las cajas, se completa el grupo y esta es reemplazada por una nueva.

Cada uno de los grupos de animales tomados de esta manera es asignado al azar para recibir uno de los tratamientos.

APÉNDICE 2

MANTENIMIENTO Y PREPARACIÓN DE LA CEPA DE *Plasmodium berghei*

Para el desarrollo óptimo del ensayo la cepa de parásito debe ser mantenida mediante repiques sucesivos en grupos de tres ratones; en caso de no ser esto posible, se puede partir de la cepa congelada, después de realizar por lo menos dos repiques sucesivos.

Mantenimiento de la cepa en los ratones

Los repiques de mantenimiento de la cepa deben ser adelantados dos veces por semana, cada 4 días. En cada repique es infectado un grupo de tres ratones del mismo género, sanos, tipo ICR, de 4 semanas de edad, peso 20 ± 2 g.

Repique partiendo de un grupo de tres ratones infectados:

1. Realice un extendido (Apéndice 7) de una gota de sangre de cada uno de los animales y determine su parasitemia, seleccione el animal con la más alta parasitemia que será el ratón donador.
2. Seleccione los animales a ser infectados.
3. Mediante punción cardiaca (Apéndice 8) extraiga por lo menos 300 μ L de sangre del ratón donador.
4. Infecte a cada uno de los ratones por vía intraperitoneal (IP) con 100 μ L de sangre del ratón donador.
5. Deje los animales infectados en su jaula, perfectamente identificada y verifique a diario su supervivencia o la presencia de síntomas agudos de la enfermedad y que tengan adecuado suministro de agua y alimento.
6. Supervise diariamente los animales hasta la fecha del siguiente repique o congelación.

Descongelado de la cepa e infección de los ratones:

La cepa de *Plasmodium berghei* puede ser mantenida mediante congelación (Apéndice 7) por los siguientes periodos de tiempo:

- Mantenimiento a -80 °C, periodo recomendado 6 meses.
 - Mantenimiento a -196 °C (nitrógeno líquido), periodo recomendado 1 año.
-
1. Seleccione tres ratones del mismo género, sanos, tipo ICR, de 4 semanas de edad, peso 20±2 g.
 2. Retire del congelador un vial, del lote semilla, de la cepa y anote el retiro en el libro de congelación.
 3. Descongele el vial en la palma de la mano.
 4. Inocule los ratones por vía Intraperitoneal (IP) con 100 µL. de la suspensión de Glóbulos Rojos Parasitados (GRP) que acaba de descongelar.
 5. Deje los animales en su jaula, perfectamente identificada y verifique a diario su supervivencia o la presencia de síntomas agudos de la enfermedad y que tengan agua y alimento *ad libitum*.
 6. A los tres o cuatro días siguientes realice el repique de la cepa de acuerdo con el procedimiento presentado en la primera parte de este Apéndice.

Congelación de la cepa de *Plasmodium berghei*

Este es un procedimiento para la conservación de la cepa durante periodos prolongados, en general se recomienda un lapso de 6 meses de conservación a -80°C y un año en nitrógeno líquido. El procedimiento busca generar un lote semilla de congelación, el cual pueda ser descongelado según las necesidades.

1. Infecte 5 ratones de acuerdo con el procedimiento indicado en la primera parte del Apéndice 2 de este documento.
2. El cuarto día post-infección, evalúe la parasitemia de los ratones mediante el procedimiento expuesto en el Apéndice 7; si la parasitemia se encuentra sobre el 20% continúe, de lo contrario espere otro día.
3. Obtenga aproximadamente 1 mL de sangre de cada animal por punción cardiaca, de acuerdo a lo estipulado en el Apéndice 8 de este documento
4. En un tubo de ensayo de 15 mL descargue cuidadosamente la sangre extraída (después de quitarle la aguja a las jeringa) sobre una solución de glicerol al 10 % [1 mL de glicerol + 9 mL de SSN (NaCl al 0.9 %)], volumen por volumen (1:1).

5. Homogenice suavemente y distribuya la mezcla en tubos de congelación (0.7 mL por tubo).
6. Marque los tubos con el número de lote semilla, de acuerdo con el orden que presente el cuaderno de congelación, anote en el cuaderno de congelación la información correspondiente al lote semilla (Fecha, cepa y número).
7. Coloque a -80 °C o en nitrógeno líquido.

APÉNDICE 3

CÁLCULO PARA PREPARACIÓN DE SUSPENSIÓN DE GRP

Mida la parasitemia del ratón donador: 30% (por ejemplo) Considere (sin medirlo) que este ratón tiene: 5×10^6 glóbulos rojos por μL (valor establecido previamente) eso quiere decir 500×10^7 por mL (mil veces más).

Por lo tanto el número de parásitos por mL es de: $0.3 \times 500 \times 10^7 = 150 \times 10^7$ GRP / mL.

El procedimiento requiere hacer el ensayo sobre 6 grupos de 5 ratones, luego se va a preparar sangre para 35 ratones (20 % adicional para las pérdidas).

Cada ratón debe recibir 100 μL de una suspensión que contenga 10^7 parásitos. Entonces en total son: 35×10^7 parásitos.

$$\text{En } 35 \times 100 \mu\text{L} = \underline{\underline{3500 \mu\text{L} = 3.5 \text{ mL}}}$$

| | | | |
|---|-----|-------|-----|
| El volumen de sangre que se debe tomar del ratón donador son: | | | |
| 150×10^7 | GRP | ----- | 1mL |
| 35×10^7 | GRP | ----- | X |

$$X = \frac{35 \times 10^7 \text{GRP}}{150 \times 10^7 \text{GRP}} = 0.23 \text{ mL de sangre del ratón donador}$$

Se requiere un volumen global de 3.5 mL, luego se debe mezclar 0.23 mL de sangre con 3.27 mL ($3.5 \text{mL} - 0.23 \text{mL}$) de solución salina normal (SSN).

En la fórmula se debe remplazar la parasitemia por la parasitemia encontrada y hacer los cálculos.

FORMA TO CÁLCULO PARA PREPARACIÓN DE SUSPENSIÓN DE GRP

| | |
|--|--|
| % DE PARASITEMIA DEL RATÓN | |
| 1 DONADOR (extendido) | |
| 2 GRP Considerados (5×10^8 GRT/ μ L) | $\frac{5000000}{500 \times 10^7}$ GRT/ μ L |
| (500×10^7 GRT/mL) | 5000000000 GRT/mL |
| 3 Parásitos / mL en el animal | GRP / mL |
| (fracción porcentual * GRP considerados) | |
| 4 No. De grupos de 5 ratones | 6 Total 30 ratones |
| No. Ratones a infectar (agregue 20% al anterior) | 35 |
| 5 No. Total de parásitos (test supresivo 10^7) | 35×10^7 GRP |
| 6 Volumen total (100 μ L/animal) | 3500 μ L |
| | 3.5 mL |
| 7 Volumen de sangre del animal | mL |
| (numeral 5 / numeral 3) | |

ESTOS CALCULOS SE ENCUENTRAN PROGRAMADOS EN LA HOJA DE MICROSOFT EXCEL® ANEXA A ESTE PROCEDIMIENTO.

APÉNDICE 4

INFECCIÓN DE LOS RATONES QUE SERÁN EMPLEADOS LA DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMALÁRICA *IN VIVO*

1. Realice un extendido (Apéndice 5) de una gota de sangre de cada uno de los ratones del repique y determine su parasitemia, seleccione el animal con la parasitemia más alta que será el ratón donador.
2. Selecciones los animales a ser infectados (Apéndice 1).
3. Mediante punción cardíaca (Apéndice 8) extraiga por lo menos 400 μ L de sangre del ratón donador.
4. Infecte a cada uno de los ratones por vía intraperitoneal (IP), con 100 μ L de la solución de GRP preparada previamente (Apéndice 3), como se muestra en la imagen.



5. Dos horas después de la infección administre la primera dosis de tratamiento preparado previamente (Apéndice 6).
6. Ponga a los animales infectados en una caja perfectamente identificada y supervise diariamente la supervivencia o la presencia de síntomas agudos de la enfermedad, y el adecuado suministro de agua y alimento hasta la fecha del ensayo de fluorometría.

APÉNDICE 5

PREPARACIÓN DE LA FORMA FARMACÉUTICA DE ADMINISTRACIÓN DE LAS SUSTANCIAS O EXTRACTOS PARA EL TRATAMIENTO DE LOS RATONES INFECTADOS

Las sustancias o extractos a evaluar pueden ser disueltas de acuerdo con su solubilidad en DMSO (< 10%), tween o suero fisiológico. Se debe calcular siempre cantidad para un día suplementario virtual (4 DÍAS + 1) con el fin de reparar las pérdidas de producto que se puedan producir a lo largo de la manipulación. Para cada extracto o sustancia:

1. Volumen de solvente requerido

Vol. de solvente requerido = volumen administrado a cada ratón x N° de ratones x N° de días

Volumen de solvente requerido = 100 μ L x 5 ratones x 5 días = 2500 μ L = **2.5 mL**.

2. Cantidad de sustancia a pesar

(D) Para la evaluación preliminar de actividad antimalárica del extracto o sustancia se desarrolla la prueba a las siguientes dosis: Extractos crudos = 400 mg/Kg, Fracciones = 100 mg/Kg.

(d) Dosis calculada por ratón.

(P) Promedio del peso de los ratones.

D ----- 1000 g d = D x P

d ----- P 1000

Para este ejemplo la D = 400 mg/kg y P = 18.36 g

0.400 g ----- 1000 g

d ----- 18.36 g

d = 0.007344g = 7.344 mg

| |
|---|
| Cantidad a pesar = $d \times \# \text{ ratones} \times \# \text{ días de tratamiento} (+1)$ |
|---|

Ejemplo: $7.344 \text{ mg} \times 5 \text{ ratones} \times 5 \text{ días de tratamiento} = 183.6 \text{ mg}$ a pesar.

Disolver en el volumen requerido 2.5 mL.

Cálculos para una sustancia o extracto.

| | |
|---|--------|
| Volumen de solvente requerido | 2.5 mL |
| (D) Dosis por Kg. de la sustancia | _____ |
| (P) Promedio del peso de los ratones | _____ |
| (d) Dosis calculada por ratón ($d = D \times P / 1000$) | _____ |
| Cantidad a pesar | _____ |

Disolver la cantidad a pesar en el volumen requerido de vehículo (2.5 mL)

ESTOS CALCULOS SE ENCUENTRAN PROGRAMADOS EN LA HOJA DE MICROSOFT EXCEL[®] ANEXA A ESTE PROCEDIMIENTO.

APÉNDICE 6

TRATAMIENTO DE LOS ANIMALES EMPLEADOS PARA LA DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMALÁRICA *IN VIVO*

1. Tratamiento de los Animales

1.1 Cálculo para preparar la dosis de administración de las sustancias o extractos para el tratamiento de los ratones infectados.

Se deben preparar soluciones o suspensiones que vehiculicen las sustancias o extractos a evaluar, el cálculo debe permitir obtener la cantidad suficiente para la administración de 100 μ L cada día durante un periodo de cuatro días. Ver Apéndice 5. ESTOS CALCULOS SE ENCUENTRAN PROGRAMADOS EN LA ORDEN DE TRABAJO; HOJA DE MICROSOFT EXCEL[®] ANEXA A ESTE PROCEDIMIENTO.

3.2 Administración del tratamiento

Dos horas después de la infección administre la primera dosis del tratamiento preparado en 3.1 por vía oral (v.o.).

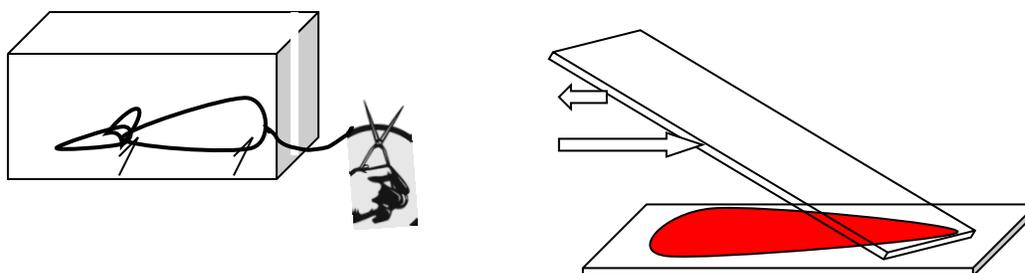
Administre durante tres días más la dosis del tratamiento a cada animal a la misma hora de la primera dosis.

APÉNDICE 7

TOMA DE MUESTRAS Y COLORACIÓN DE EXTENDIDOS

Toma de muestra de sangre para extendidos:

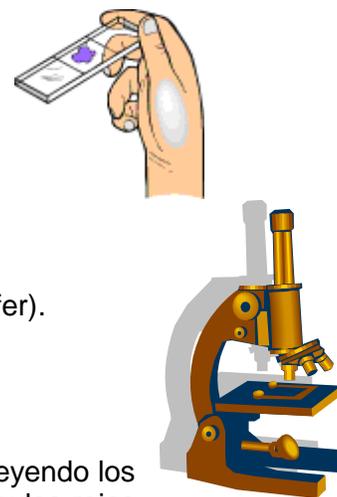
1. Coloque el animal en un inmovilizador de manera que la cola quede por fuera.



2. Con unas tijeras corte el extremo distal de la cola del animal.
3. Tome una gota de sangre sobre una lámina para microscopio.
4. Empleando el extremo de otra lámina, extienda la gota de manera uniforme sobre la lámina; primero hacia atrás hasta tocar la gota de sangre y luego a lo largo de la lámina para extenderla.
5. Inmediatamente seque la lámina mediante aire empleando un secador.

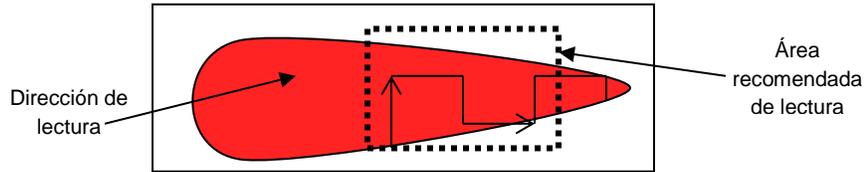
Coloración de los extendidos:

1. Aplicar metanol, dejar durante un (1) minuto.
2. Enjuagar con agua potable.
3. Secar.
4. Aplicar colorante Giemsa en Buffer de fosfato.
(1 mL de solución Stock de colorante por cada 9 mL de Buffer).
5. Dejar en contacto durante 25 minutos.
6. Lavar con agua potable.
7. Secar.
8. Observar al microscopio con objetivo de inmersión (100X) leyendo los campos necesarios (que contengan c/u entre 30 y 300 glóbulos rojos



de manera homogénea y no superpuestos) para un recuento de 1.000 glóbulos rojos totales, leer la lámina como en la figura.

9. Obtener el porcentaje de parasitemia.

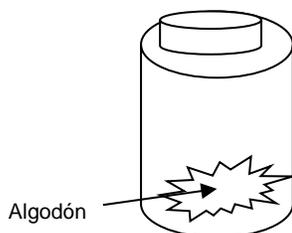


$$\% \text{ Parásitemia} = \left(\frac{\text{Glóbulos Rojos Parasitados}}{\text{Glóbulos Rojos Parasitados} + \text{Glóbulos Rojos Normales}} \right) \times 100$$

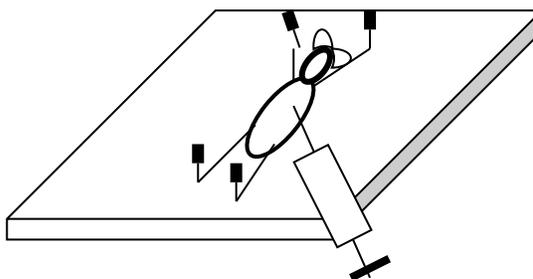
APÉNDICE 8

PROCEDIMIENTO PARA LA EXTRACCIÓN DE SANGRE POR PUNCIÓN CARDIACA

1. Sature una cámara de anestesia con éter o cloroformo, (adicionando una pequeña cantidad sobre un trozo de algodón dentro de la cámara).



2. Enjuague las paredes de una jeringa para insulina (1 mL) con solución de heparina.
25000 U / 5 mL o 5000 U / 5 mL.
3. Coloque el ratón dentro de la cámara y manténgala tapada; espere hasta que el animal pierda todos sus reflejos de movimiento.
4. Fije el animal por sus extremidades a una placa de icopor recubierta con papel aluminio, empleando agujas de jeringa de insulina (el ratón debe quedar bien estirado).



5. Localice el corazón del ratón y fije el lugar empleando el dedo índice.
6. Ingrese suavemente con la jeringa heparinizada y retire lentamente el embolo, tome la cantidad de sangre requerida.
7. Verifique la muerte del animal o de lo contrario aplique eutanasia y descarte el cadáver de acuerdo al procedimiento establecido en el bioterio.

APÉNDICE 9

EVALUACIÓN DE LA PRUEBA MEDIANTE EL MÉTODO MICROSCÓPICO PARA LA DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMALÁRICA *IN VIVO*

1. Evaluación de la prueba

1.1 Determinación del Porcentaje de Inhibición

El DÍA + 4, de desarrollo de la prueba se procede a la toma de extendidos de sangre, de cada uno de los ratones y coloración (ver Apéndice 3) para su posterior conteo óptico y obtención del porcentaje de inhibición, para cada sustancia o extracto, de acuerdo con la siguiente formula:

$$\% \text{ inhibición} = \frac{\text{Parasitemia Grupo Testigo (vehículo)} - \text{Parasitemia Grupo Control Activo}}{\text{Parasitemia Grupo Testigo (vehículo)}}$$

1.2 Punto final de la prueba y Evaluación de posible efecto curativo.

El punto final de la prueba establece en el momento de eutanasia, que se relaciona con la inhabilidad del animal para proveer más información dentro del estudio y con el fin de prevenir un mayor sufrimiento. Se hace observación, dos veces al día de los animales, posterior al DÍA + 4, estableciendo un balance, costo ético – beneficio para la prueba (entre síntomas de sufrimiento y el posible efecto curativo). Se programa inmediatamente la eutanasia de los ejemplares cuando estos evidencien síntomas indicativos de afección del SNC o cuando exista un marcado e irreversible deterioro del animal.

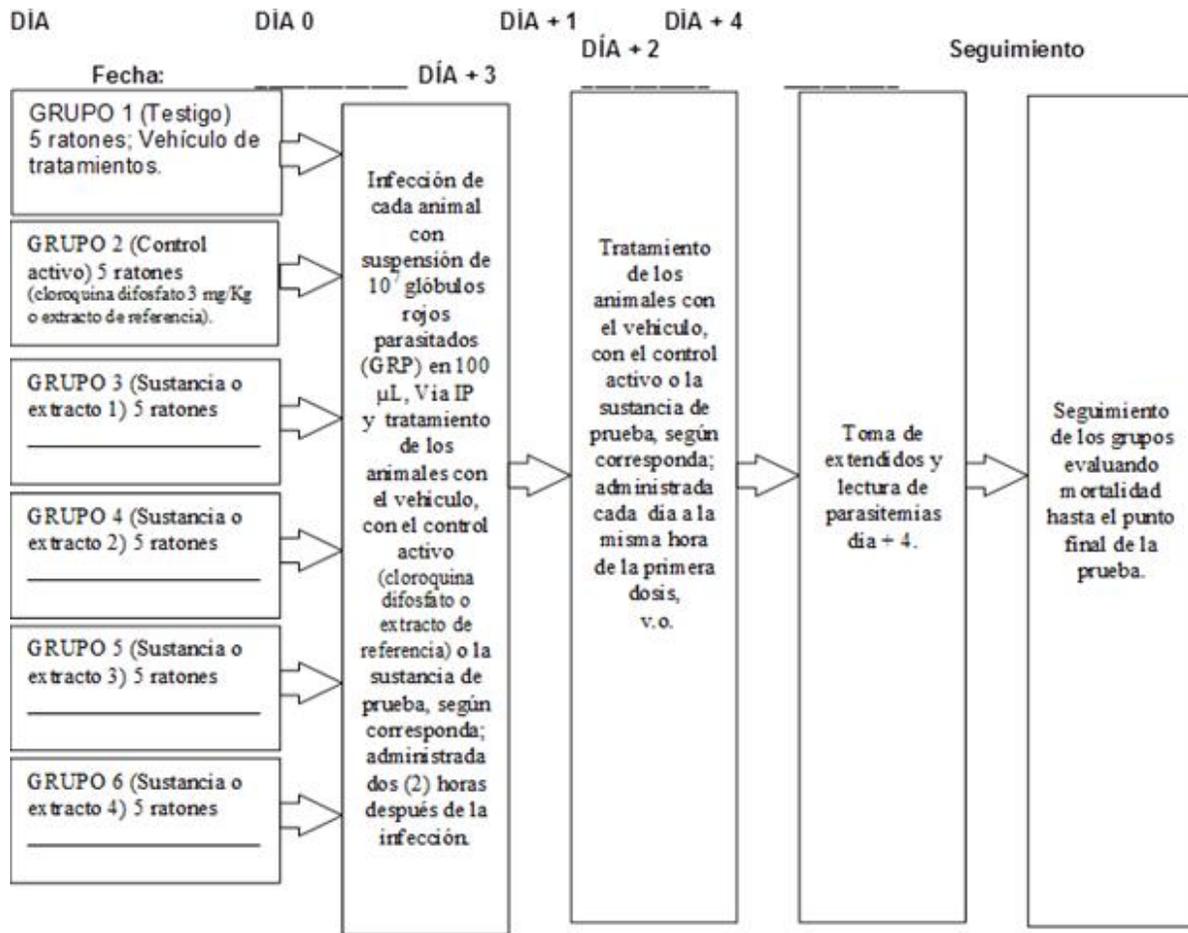
En ausencia de las condiciones anteriores se prosigue con el mantenimiento de los animales evaluando la supervivencia, considerando para aquellos animales que sobrevivan más de 35 días (con evaluaciones posteriores de parasitemia cada 7 días) hacer sangrado e infección de nuevos ratones con esa sangre; si los nuevos animales no desarrollan la enfermedad dentro de 21 días se considera un efecto curativo.

2. Riesgo Biológico

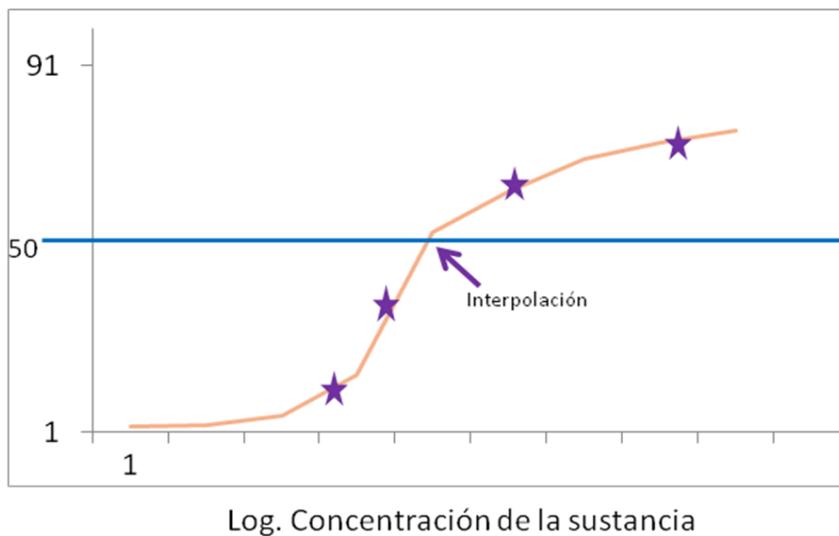
Se tendrán en cuenta las recomendaciones internacionales acerca del uso ético de animales así como lo establecido en la Resolución 008430 de 1993 del Ministerio de Salud, capítulo sexto, la cual hace referencia al uso de animales vivos en experimentos de investigación en Colombia y así como también el estatuto nacional de protección de los animales (ley 84 de 1989). De igual forma, se seguirán las normas establecidas por el Bioterio de Farmacia de la Universidad Nacional de Colombia en cuanto al manejo y disposición de material biológico. Los protocolos experimentales empleados en este proyecto cuentan con el aval del comité de ética de la Facultad de Ciencias. Se busca causar el mínimo sufrimiento posible a los animales teniendo en cuenta un punto final adecuado para los fines experimentales evitando al máximo el malestar generado inevitablemente por la infección así mismo se busca utilizar el menor número de animales por grupo de tratamiento.

3. Determinación de la DI_{50}

Esta determinación se hace solo para aquellos extractos o sustancias que presentan un porcentaje de inhibición de la parasitemia superior al 50 % (a una dosis de extractos crudos = 400 mg/Kg., fracciones = 100 mg/Kg) en el ensayo de evaluación inicial y por lo tanto requiere el desarrollo del protocolo pero con el siguiente diseño:



La DI_{50} de una sustancia o extracto se determina a través de un modelo de regresión logística dosis-respuesta.



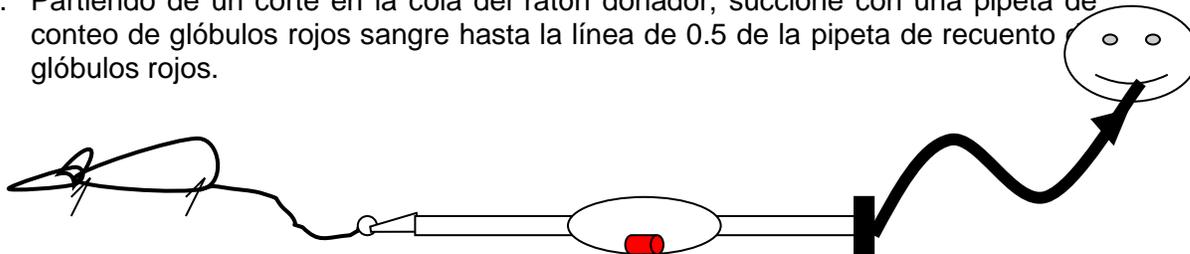
3.1 Parámetros de calidad de la Interpolación

Para la obtención de la DI_{50} de cada extracto o sustancia se deben obtener mínimo cuatro (4) puntos (ubicados entre el 20 y el 80 % de la respuesta) cada uno de los cuales representa el promedio de la respuesta del grupo tratado a una dosis dada.

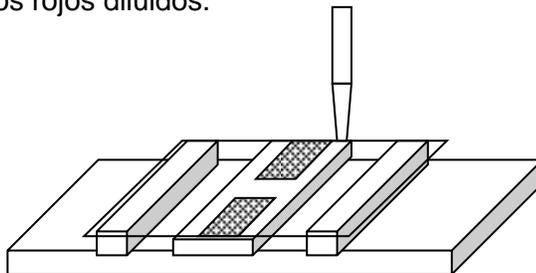
APENDICE 10

PROCEDIMIENTO PARA EL CONTEO DE GLOBULOS ROJOS

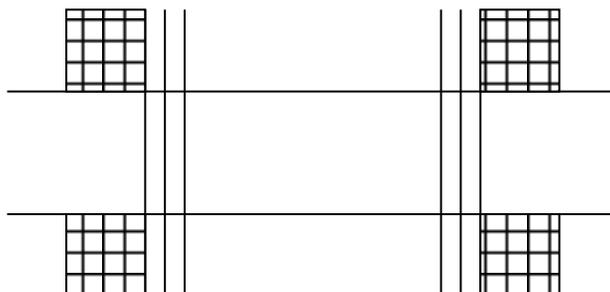
1. Partiendo de un corte en la cola del ratón donador, succione con una pipeta de conteo de glóbulos rojos sangre hasta la línea de 0.5 de la pipeta de recuento glóbulos rojos.



2. La sangre obtenida es luego diluida con SSN (a 10.1mL) y agitada dentro de la pipeta de glóbulos rojos hasta línea 101.
3. Deseche cuatro gotas de la pipeta y luego llene una cámara de *Thoma* con la suspensión de glóbulos rojos diluidos.



4. En el microscopio, empleando objetivo de 100X, cuente los glóbulos rojos, formas eclipsadas en las cuatro esquinas del área de recuento de la cámara.



5. De los valores obtenidos en el recuento de las cuatro esquinas saque promedio aritmético.
Ej. Valores obtenidos: 113, 135, 120, 120; promedio = 122 (conteo de glóbulos rojos).

Conteo de glóbulos rojos en cámara x 250 x 200 x 1000 = Glóbulos rojos / mL.

Bibliografía

- Abiodun, O. O, Gbotosho, G. O. Ajaiyeoba, E. O.; Happi, C. T.; Hofer, S.; Wittlin, S.; Sowunmi, A.; Brun, R.; Oduola, A. M. J. (2010). *Comparison of SYBR Green I, Pico Green, and [H]-hypoxantine-based assays for in vitro antimalarial screening of plants from Nigerian ethnomedicine*. Parasitol Res. 106, 933-939. doi: 10.1007/s00436-010-1743-z.
- Akala, H.M., Eyase, F.L., Cheruiyot, A.C., Omondi, A.A., Ogutu, B.R., Waters, N.C., Johnson, J.D., Polhemus, M.E., Schnabel, D.C., Walsh, D.S., (2011). Antimalarial drug sensitivity profile of western Kenya *Plasmodium falciparum* field isolates determined by a SYBR green I *in vitro* assay and molecular analysis. Am. J. Trop. Med. Hyg. 85, 34-41. Doi:10.4269/ajtmh.2011.10-0674.
- Bacon, D.J., Latour, C., Lucas, C., Colina, O., Ringwald, P., Picot, S., (2007). Comparison of a SYBR green I-based assay with a histidine-rich protein II enzyme-linked immunosorbent assay for *in vitro* antimalarial drug efficacy testing and application to clinical isolates. Antimicrob. Agents. Chemother. 51 (4), 1172-1178. doi: 10.1128/AAC.01313-06.
- Bei, A; DeSimone, T.; Badiane, A.; Ahouidi, A.; Dieye, T.; Ndiaye, D.; Sarr, O.; Ndir, O.; Mboup, S.; y Duraisingh, M. (2010). Am J Hematol. 2010 April ; 85(4): 234–237. doi:10.1002/ajh.21642.
- Bennett, T. N., Paguio, M., Gligorijevic, B., Seudieu, C., Kosar, A. D., Davidson, E., y otros. (2004). *Novel, Rapid, and Inexpensive Cell-Based Efficacy Quantification of Antimalarial Drug*. Antimicrob. Agents Chemotherapy, 48(5), 1807-10. Doi: 10.1128/AAC.48.5.1807-1810.2004.
- Bland, J.M., Altman, D.G., (1986). Statistical methods for assessing agreement between two methods of clinical measurement. Lancet. 1, 307–310.

- Bland, J.M., Altman, D.G., (1999). Measuring agreement in method comparison studies. *Stat. Methods Med. Res.* 8, 135-160.
- Botero, D. y Restrepo, M. (2003). Malaria (Paludismo). En Corporación para investigaciones biológicas (Ed), *Parasitosis Humanas* (p.p 162-209). Medellín, Colombia.
- Campuzano, G. y Blair, S. (2010). *Malaria: consideraciones sobre su diagnóstico*. *Medicina y Laboratorio.* 16 (7, 8), 311-354.
- Chaorattanakawee, S., Tyner, S.D., Lon, C., Yingyuen, K., Ruttvisutinunt, W., Sundrakes, S., Saignam, P., Johnson, J.D., Walsh, D.S., Saunders, D.L. and Lanteri, C.A. (2013). *Direct comparison of the histidine-rich protein-2 enzyme-linked immunosorbent assay (HRP-2 ELISA) and malaria SYBR green I fluorescence (MSF) drug sensitivity tests in Plasmodium falciparum reference clones and fresh ex vivo field isolates from Cambodia*. *Malaria Journal.* 12, 239.
- Concepts in animal welfare, euthanasia module 20, WSPA and Bristol University (2003).
- Desjardins RE, Canfield CJ, Haynes JD, Chulay JD. (1979). Quantitative assessment of antimalarial activity in vitro by a semiautomated microdilution technique. *Antimicrob. Agents Chemother.* 16(6): 710-18.
- Deharo, E., Gautret, P., Muñoz, V., & Sauvain, M. (2000). Técnicas de laboratorio para la selección de sustancias antimaláricas. La Paz, Bolivia. ISBN 99905-0-050-9.
- Garavito G., (2003). Estandarización de dos modelos de actividad Antimalárica como herramientas para la evaluación Farmacológica de sustancias o extractos de origen Vegetal (tesis de maestría). Universidad Nacional de Colombia.
- Garavito G., (2007). Etude pharmacologique expérimentale de l'activité antipaludique d'un composé de synthèse: le chlorure de methylthionium. (These Docteur). Université Toulouse III. <http://tel.archives-ouvertes.fr/tel-00639025/fr/>.

Gomez Marín, J. E. (2010). Plasmodium. En: Gomez Marín, J.E., *Protozoología Médica. Protozoos parásitos en el contexto Latinoamericano* (págs. 21-43). Colombia: Manual Moderno.

Grimberg, B. T. (2011). Methodology and Application of Flow Cytometry for Investigation of Human Malaria Parasites. *J Immunol Methods*, 367(1-2), 1-16. doi: 10.1016/j.jim.2011.01.015.

Guswanto, A., Sivakumar, T., Rizk, M.A., Elsayed, S.A.E., Youssef, M.A., ElSaid, E.E.S., Yokoyama, N., Igarashi I., (2014). Evaluation of a Fluorescence-Based Method for Antibabesial Drug Screening. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 58(8), 4713–4717.

Instituto Nacional de Salud (INS, 2013). Dirección de Vigilancia y Análisis del Riesgo en Salud Pública_ Sistema de Vigilancia en Salud Pública (SIVIGILA) _Boletín Epidemiológico Semanal (BES) _Semana epidemiológica número 51 de 2013 (15-21 de diciembre). Recuperado de <http://www.ins.gov.co/>.

Instituto Nacional de Salud (INS, 2014a). Malaria. En línea. Consultado: 25 de mayo de 2014. Disponible en: <http://www.ins.gov.co/temas-de-interes/paginas/malaria.aspx>.

Instituto Nacional de Salud (INS, 2014b). Dirección de Vigilancia y Análisis del Riesgo en Salud Pública_ Sistema de Vigilancia en Salud Pública (SIVIGILA) _Boletín epidemiológico semanal (BES) _Semana epidemiológica número 51 de 2014 (14-20 Diciembre). Recuperado de <http://www.ins.gov.co/>.

Instituto Nacional de Salud (INS, 2015). Dirección de Vigilancia y Análisis del Riesgo en Salud Pública_ Sistema de Vigilancia en Salud Pública (SIVIGILA) _Boletín epidemiológico semanal (BES) _Semana epidemiológica número 22 de 2015 (31 de mayo a 6 de junio). Recuperado de <http://www.ins.gov.co/>.

International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use (ICH, 1996). Harmonized Tripartite Guideline:

Validation of Analytical Procedures: Methodology. CPM/ICH/281/95: The European Agency for the Evaluation of Medicinal Products. 1-9.

Izumiyama, S.; Omura, M.; Takasaki, T.; Ohmae, H. and Asahi, H. (2009). *Plasmodium falciparum: Development and validation of a measure of intraerythrocytic growth using SYBR Green I in a flow cytometer*. Exp Parasitol. 121 (2009) 144–150. doi:10.1016/j.exppara.2008.10.008.

Johnson, J.D., Denuff, R.A., Gerena, L., Lopez-Sanchez, M., Roncal, N.E., and Waters, N.C., (2007). *Assessment and continued validation of the malaria SYBR green I-based fluorescence assay for use in malaria drug screening*. Antimicrob. Agents Chemother. 51 (6), 1926-1933. doi: 10.1128/AAC.01607-06.

Ministerio de Salud (1993). Resolución N° 008430 DE 1993. Recuperado de https://www.invima.gov.co/index.php?option=com_content&view=article&id=2977:resolucion-no-8430-del-4-de-octubre-de-1993&catid=147:resoluciones-medicamentos-&Itemid=203.

Ministerio de la Protección Social, Instituto Nacional de Salud y Organización Paramericana de la Salud (MPS, 2010) . Guía Para la Atención Clínica Integral del Paciente con Malaria. Bogotá, 2010. Recuperado de http://www.paho.org/...=doc_download&gid=1220&Itemid=.

Moneriz, C., Marín-García, P., Bautista, J.M., Diez, A. and Puyet, A., (2009). Haemoglobin interference and increased sensitivity of fluorimetric assays for quantification of low-parasitaemia *Plasmodium* infected erythrocytes. Malaria Journal. 8, 279. Doi: 10.1186/1475-2875-8-279.

Organización Mundial de la Salud (OMS, 2014a). Las diez principales causas de defunción en el mundo 2000-2012. (Mayo de 2014). En línea. Disponible en: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs310/es/>.

- Organización Mundial de la Salud (OMS, 2014b). Estadísticas Sanitarias Mundiales 2014. Recuperado de http://www.who.int/gho/publications/world_health_statistics/2014/es/.
- Organización de las Naciones Unidas (ONU, 2000). Objetivos de Desarrollo del Milenio. En línea. Disponible en: <http://www.undp.org/content/undp/es/home/mdgoverview.html.html>.
- Peters W. (1965). Drug resistance in *Plasmodium berghei* Vincke and Lips, 1948. I. Chloroquine resistance. *Exp Parasitol* 17(1): 80-89.
- Rason, M.A., Randriantsoa, T., Andrianantenaina, H., Ratsimbasoa, A., Menard, D., (2008). Performance and reliability of the SYBR green I based assay for the routine monitoring of susceptibility of *Plasmodium falciparum* clinical isolates. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 102, 346-351.
- Romero (2007). *Plasmodium*. En R. Romero (3ra. Ed.) *Microbiología y Parasitología Humana. Bases etiológicas de las enfermedades infecciosas y parasitarias* (p. 1440-1454). México: Editorial médica Panamericana.
- Sachs, J. and Malaney, P. (2002), The economic and social burden of malaria, *Nature*, 415, 680.
- Smeijsters, L.J.J.W., Zijlstra, N.M., Franssen, F.F.J., and Overdulve J.P., (1996). Simple, Fast, and Accurate Fluorometric Method to Determine Drug Susceptibility of *Plasmodium falciparum* in 24-Well Suspension Cultures. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 40(4), 835–838.
- Smilkstein, M., Sriwilaijaroen, N., Kelly, J. X., Wilairat, P., Riscoe, M., (2004). Simple and Inexpensive Fluorescence-Based Technique for High-Throughput Antimalarial Drug Screening. *Antimicrobial Agents Chemother*.48(5), 1803-1806. doi: 10.1128/AAC.48.5.1803-1806.2004.
- Somsak V., Srichairatanakool, S., Yuthavong, Y., Kamchonwongpaisan, S., Uthaipibull, Ch., (2012). Flow cytometric enumeration of *Plasmodium berghei*-infected red blood

cells stained with SYBR Green I. *Acta Tropica*. 122, 113-118. Doi: 10.1016/j.actatropica.2011.12.010.

Theron, M.; Hesketh, R.; Subramanian, S.; and Rayner (2010). An Adaptable Two-Color Flow Cytometric Assay to Quantitate the Invasion of Erythrocytes by Plasmodium falciparum Parasites. *Cytometry Part A* 77A: 1067, 1074, 2010. DOI:10.1002/cyto.a.20972.

Trager W, Jensen JB. (1976). Human malaria in continuous culture. *Science* 193: 673-75.

UNESCO, Declaración Universal de los Derechos de los Animales. (1978).

Vossen, M.G., Pferschy, S., Chiba, P., Noedl, H., (2010). The SYBR green I malaria drug sensitivity assay: performance in low parasitemia samples. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 82, 398–401. Doi: 10.4269/ajtmh.2010.09-0417.

W. Peters, BL. Robinson (1975). En: "Handbook of Animal Models of Infection", O. Zak & M. A. Sande. Ed. Academic Press, 1999, pp 757-773.

World Health Organization (WHO, 2003). Assessment and Monitoring of Antimalarial Drug Efficacy for the Treatment of Uncomplicated falciparum Malaria. Recuperado de <http://www.who.int/malaria/publications/atoz/whohtmrbm200350/en/>.

World Health Organization (WHO, 2010). *Guidelines for the treatment of malaria – 2nd edition*. Recuperado de <http://www.evidence4health.org/about-ehcrc/case-studies/who-guidelines-for-the-treatment-of-malaria-2nd-edition/>.

World Health Organization (WHO, 2013). Global Malaria Programme 2013. *World Malaria Report 2013*. Recuperado de http://www.who.int/malaria/publications/world_malaria_report_2013/report/en/.

World Health Organization (WHO, 2014). Global Malaria Programme. 2014. *World Malaria Report 2014*. Recuperado de http://www.who.int/malaria/publications/world_malaria_report_2014/en/.

Zhang J.H., Chung T.D.Y. and Oldenburg K.R., (1999). A simple statistical parameter for use in evaluation and validation of high throughput screening assays. *Journal of Biomolecular screening*. 4(2), 67-73.