

# Adaptación y optimización de un método de lectura por fluorometría en el modelo farmacológico *in vitro* de cultivo de *Plasmodium falciparum*

María Helena Arias Marciales<sup>1</sup>, Yinneth Victoria Rodríguez Novoa<sup>1</sup>, Giovanni Garavito Cárdenas<sup>1\*</sup>.

<sup>1</sup> Universidad Nacional de Colombia, Sede Bogotá, Facultad de Ciencias, Departamento de Farmacia (DFUNC), Grupo de Investigación FaMeTra (Farmacología de la Medicina Tradicional y Popular), Carrera 30 N.º 45-03, Bogotá D.C. Colombia.

\* Correo electrónico: ggaravitoc@unal.edu.co

Recibido para evaluación: 13 de septiembre de 2015.

Aceptado para publicación: 16 de febrero de 2016.

## RESUMEN

El modelo farmacológico de cultivo *in vitro* de *P. falciparum* es crucial en el tamizaje inicial de sustancias o extractos de plantas con posible actividad antiplasmodial. La densidad parasitaria puede determinarse mediante variadas metodologías, sin embargo, se han descrito numerosas ventajas y desventajas asociadas a cada una de ellas.

Se evaluaron el tiempo de incubación necesario para la tinción y el uso de cultivos asincrónicos o sincrónicos en busca de valores óptimos; evidenciando un tiempo óptimo de 2 h, y límites de detección y cuantificación, menores en cultivos asincrónicos. Empleando las cepas FCR3 y FCB2 se evidenció un ruido de fondo de 12% y 38% respectivamente; la linealidad mostró una buena correlación,  $r^2$  de 0,9644 (FCR3) y 0,9841 (FCB2) y una pendiente de 1761,8 y 852,4 respectivamente. Además, se comprobó había concordancia entre los métodos, fluorométrico con SYBR Green I (SYBRG I) y microscópico con Giemsa, con diferencia media de 0,00002% y 0,09109% para FCR3 y FCB2 respectivamente. Los límites de detección y cuantificación fueron 0,5% y 1,5% de parasitemia. El factor Z con FCB2 fue 0,376, en tanto que con FCR3 alcanzó 0,702. La concentración inhibitoria 50 (CI<sub>50</sub>) frente a *P. falciparum* FCR3, generada por cloroquina (CQ) fue 0,37 mcg/mL por microscopía y 0,35 mcg/mL por fluorometría.

Nuestros hallazgos sugieren que el ensayo de fluorescencia con SYBRG I, empleando fluorómetros comúnmente disponibles en muchos laboratorios, es preciso, robusto, rápido y exacto; para la evaluación *in vitro* de sustancias o extractos con posible actividad antiplasmodial.

*Palabras clave:* Antimalaricos, *Plasmodium falciparum*, Sybr Green I, espectrometría de fluorescencia.

## SUMMARY

### Adaptation and optimization of a fluorometric reading method, in the *in vitro* pharmacological model of *Plasmodium falciparum* culture

The *in vitro* pharmacological model of *P. falciparum* culture is crucial in the initial screening for substances or plant extracts with possible antiplasmodial activity. The parasite density can be determined by varied methods, however have been described numerous advantages and disadvantages associated with each of them.

The incubation time required for staining and the use of synchronous or asynchronous cultures were assessed for optimal settings; showing optimal time of 2 h, and lower limits of detection and quantification in asynchronous cultures. Employing the FCB2 and FCR3 strains, was evidenced a background noise of 12% and 38% respectively; linearity showed a good correlation,  $r^2$  of 0.9644 (FCR3) and 0.9841 (FCB2) and a slope of 1761.8 and 852.4, respectively. It was evidenced agreement between the methods, fluorometric with SYBR Green I (SYBRG I) and microscopic with Giemsa, the mean difference was 0.00002% and 0.09109% respectively for FCR3 and FCB2, The limits of detection and quantification were 0.5% and 1.5% of parasitaemia. The Z factor was 0.376 with FCB2, whereas with FCR3 reached 0.702. The inhibitory concentration 50 ( $IC_{50}$ ) against *P. falciparum* FCR3, generated by chloroquine (CQ), was 0.37 mcg/mL by microscopy and 0.35 mcg/mL by fluorometry.

Our findings suggest that the SYBRG I fluorescence based assay, by using fluorometers commonly available in many laboratories, is precise, robust, fast and accurate; for the *in vitro* evaluation of substances or extracts with possible antiplasmodial activity.

*Keywords:* Antimalarials, *Plasmodium falciparum*, Sybr Green I, fluorescence spectrometry.

## INTRODUCCIÓN

Desde que Trager y Jensen [1] describieron un protocolo para el cultivo *in vitro* de las etapas eritrocíticas de *P. falciparum*, y Desjardins [2] 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 frente a la malaria. Este modelo permite emplear el mismo agente que parasita al hombre, además, es relativamente rápido y accesible a muchos laboratorios y no tiene las restricciones éticas que acompañen el trabajo en los modelos de animal integro. Sin embargo, presenta limitaciones de bioseguridad derivadas del empleo de un agente infeccioso que requiere para su crecimiento eritrocitos y plasma humanos.

El modelo requiere de un método de cuantificación de parasitemia asequible y confiable; el método más ampliamente utilizado para evaluar la sensibilidad del parásito a los medicamentos se basa en el examen microscópico de frotis de sangre teñidos con Giemsa, que permite además del conteo de los glóbulos rojos parasitados, la identificación de la morfología del microorganismo; sin embargo, es engorroso, requiere frotis de buena calidad y tiene implícito un sesgo subjetivo (pueden encontrarse diferencias significativas en la parasitemia estimada por diferentes microscopistas); adicionalmente, se han descrito resultados falsos positivos y negativos de más de 36% y 18%, respectivamente, haciéndolo inconveniente para la cuantificación rápida en el tamizaje primario de posibles candidatos a fármacos [3-6].

Otros métodos comúnmente empleados para determinar la densidad parasitaria son: el método de incorporación de la hipoxantina tritiada (“estándar de oro”); los ensayos de ELISA, que usan anticuerpos monoclonales de *Plasmodium spp.*, lactato deshidrogenasa pLDH y HRPII. Si bien estos métodos son precisos y fáciles de usar tienen como inconveniente la realización de un protocolo de múltiples pasos y su elevado costo los hace poco útiles para su uso rutinario [4-5].

Desde el 2004, numerosos autores han reportado el uso de sondas fluorescentes para la determinación del crecimiento y la propagación de *Plasmodium*, pero se ha generado controversia sobre la capacidad del método para medir la susceptibilidad *in vitro* en muestras en sangre entera, dado que estos métodos se basan en la detección de ADN parasitario en glóbulos rojos infectados y los colorantes empleados no son específicos para el ADN de *Plasmodium*; por ejemplo, SYBRG I se une a cualquier ADN de doble cadena, resultando en un considerable ruido de fondo cuando se utiliza en presencia de otras células propias de la sangre entera [5, 7].

En la evaluación comparativa de los métodos SYBRG I y HRP-2 ELISA, para medir la susceptibilidad *in vitro* de las cepas de *P. falciparum* de referencia, se encontró similitudes en el límite de detección de muestras en sangre entera y las tradicionales muestras del cultivo; la sensibilidad del ensayo SYBRG I fue menor en muestras enriquecidas con sangre entera (mayor fluorescencia de fondo y aumento en la variabilidad de los resultados), probablemente como consecuencia de la unión de SYBRG I al ADN de otras células presentes en la sangre completa, 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 [8, 9]).

El método de cuantificación de parasitemia debe ajustarse y responder a las necesidades propias del modelo farmacológico específico en que va a ser empleado; en el caso del tamizaje de actividad antiparasitaria de sustancias o extractos de origen vegetal, el porcentaje de parasitemia empleado típicamente corresponde a niveles más altos que hacen pertinente y conveniente el empleo del método en estas particulares condiciones.

Las evaluaciones reportadas sobre el uso de sondas fluorescentes en citometría de flujo para determinar la parasitemia y las concentraciones inhibitorias 50 (IC<sub>50</sub>) de sustancias antimaláricas, empleando colorantes de ácidos nucleicos tales como YOYO-1<sup>®</sup>, naranja de acridina, yoduro de propidio y SYTO-16<sup>®</sup>, requieren la disponibilidad de un citómetro y de personal técnico altamente especializado para mantenerlo operativo, los cuales no siempre están disponibles en todos los laboratorios [3, 10]. La cuantificación fluorométrica de ADN parasitario es simple, sensible y suficientemente específica, porque el SYBRG I 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.

Un estudio que comparó muestras de sangre hemolizada y no hemolizada mostró que para la sangre no hemolizada hay una mayor relación señal-ruido y un manejo más práctico; la concentración de fluorocromo óptima para que SYBRG I discrimine los glóbulos rojos parasitados (GRP) fue establecida en 4X, y respecto al pH óptimo para la tinción se reportaron resultados similares a pH neutro (7,4) y a pH básico (8,8), sin afectar el tiempo de tinción [10].

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 de lectura 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 [11, 12]. Algunos indicadores de las capacidades

del método se pueden utilizar como medidas para la evaluación de robustez frente a cambios en la metodología o para determinar las condiciones metodológicas óptimas para la cuantificación.

Reportes previos relacionados con evaluación fluorométrica mediante citometría de flujo, en modelos *in vitro* de actividad frente a Plasmodium y Babesia, sugieren que el método fluorométrico podría ser adaptado a la lectura en un fluorómetro común [11].

## METODOLOGÍA

### Reactivos

SYBRG I a concentración 10.000X en DMSO, para tinción de ácidos nucleicos y qPCR, fue adquirido a INVITROGEN®, se preparó solución madre en DMSO a concentración 100X que se almacenó a  $-20^{\circ}\text{C}$  protegida de la luz y se descongeló inmediatamente antes de su uso. El tampón 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]), el cual se preparó previamente, se ajustó a pH 7,5 y se almacenó a  $4^{\circ}\text{C}$ . Cloroquina difosfato se adquirió a Sigma y se preparó una solución madre a 10 mM. Las cepas FCB2 y FCR3 de *P. falciparum* se obtuvieron del Instituto Nacional de Salud y de la Universidad de Antioquía; los glóbulos rojos humanos y el suero fueron gentilmente donados por Hemocentro Distrital de Bogotá D.C.

### *Modelo farmacológico de cultivo de P. falciparum*

Las cepas se mantuvieron en cultivo continuo en el laboratorio de acuerdo con la técnica descrita por Trager y Jensen [1]. 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 mL de sangre parasitada (hematocrito = 2%). La parasitemia se mantuvo entre 0,7 y 3% (alrededor de 2%). Los ajustes se hicieron con glóbulos rojos sanos (GRS). Los cultivos se incubaron a  $37^{\circ}\text{C}$  en atmósfera 5% de  $\text{CO}_2$ , y una humedad de alrededor del 90%. El medio fue renovado todos los días y se llevó a cabo un control microscópico (100X) de la parasitemia mediante la realización de un frotis de sangre fijado con metanol, y coloreado con Giemsa [13-18]. La sincronización del cultivo se hizo con sorbitol 5%.

### Recuento de parasitemia por el método basado en fluorescencia

En general, en un tubo falcon® de 15 mL se adicionó 30  $\mu\text{L}$  de GRP más 1.470  $\mu\text{L}$  de PBS (hematocito del 2%); posteriormente, se realizaron diluciones seriadas tomando

735  $\mu\text{L}$  de la muestra inicial que se adicionaron a un nuevo falcon<sup>®</sup> conteniendo 15  $\mu\text{L}$  GRS y 735  $\mu\text{L}$  de PBS, este procedimiento se realizó cuantas veces fue necesario hasta lograr una parasitemia de 0,01%. Al finalizar las diluciones seriadas de parasitemia, 100  $\mu\text{L}$  de cada suspensión de células se transfirieron a una microplaca de 96 pozos por quintuplicado, se adicionó 100  $\mu\text{L}$  de solución de SYBRG I/tampón de lisis a concentración 2X y la placa se incubó a 37 °C en la oscuridad.

### **Concentración Inhibitoria 50 (CI<sub>50</sub>) de Cloroquina (CQ)**

A partir de una solución madre de CQ en RPMI de 1.000 mcg/mL se realizaron diluciones hasta obtener las siguientes concentraciones en placa 1; 0,5; 0,25; 0,125; 0,063 y 0,031 mcg/mL; a una parasitemia de 2% y hematocrito 2,5%. Se incubo por 48 h a 37 °C y 5% de CO<sub>2</sub>, luego se valoraron las parasitemias correspondientes a cada dilución por microscopía y por fluorometría y se determinó la CI<sub>50</sub> mediante modelo de regresión.

### **Optimización del método**

Ensayos preliminares nos permitieron establecer la concentración de fluorocromo en (2X) SYBR I/PBS; una vez adaptado el método a nuestras condiciones se procedió a su optimización; el tiempo de incubación con SYBRG I y el efecto de trabajar con cultivos sincrónicos o asincrónicos fueron las variables estudiadas para establecer sus condiciones óptimas buscando velocidad, eficiencia 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.

### **Estudio de las capacidades del método**

Para estudiar el comportamiento de la fluorescencia generada en unidades de fluorescencia relativa (UFR) por diferentes porcentajes de parasitemia, GRP infectados por *P. falciparum* se diluyeron en serie con GRS o en cultivo fueron sometidos a diferentes concentraciones de cloroquina, con el fin de ajustar las parasitemias en un rango aproximado entre 0,01-5,00% para la cepa FCB2 y 0,3-10,0% para la cepa FCR3. GRS fueron empleados como control negativo (C-). En cada pozo de una placa de 96 pozos fueron adicionados 100  $\mu\text{L}$  de solución colorante (2X) SYBRG I/PBS a 100  $\mu\text{L}$  de cada dilución de GRP, en quintuplicado y se incubó la placa en la oscuridad a temperatura ambiente durante 2 h. Posteriormente, se determinaron los valores de fluorescencia, utilizando un lector de placas (Twinkle LB 90. BERTHOLD\_Technologies<sup>®</sup>) a 485 nm y 535 nm, longitudes de onda de excitación y emisión respectivamente.

Las UFR, después de la sustracción del ruido de fondo (UFR de GRS) y los porcentajes de parasitemia, fueron graficadas y analizadas por regresión lineal. Un extendido de

cultivo se coloreó con Giemsa para comprobar la parasitemia por microscopía. Todas las determinaciones se realizaron en quintuplicado en tres muestras procesadas independientemente. 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 (C-) y la pendiente según lo indicado por las guías de la conferencia internacional de armonización [13, 16], 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%,  $\sigma$  es la desviación estándar del blanco y S es la pendiente de la curva de calibración [13].

### Determinación de la calidad del método (Factor Z)

Zhang *et al.* [12] reportaron una prueba estadística útil para determinar la calidad de los ensayos: el factor Z, el cual se calcula de la siguiente manera:

$$Z = 1 - [(3\sigma(C+) + 3\sigma(C-)) / \mu(C+) - \mu(C-)]$$

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

## RESULTADOS Y DISCUSION

### Adaptación y optimización del método fluorométrico

La revisión de los hallazgos publicados previamente alrededor de esta metodología llevo a seleccionar el fluorocromo, su concentración y el pH, se realizaron algunos ensayos preliminares que fijaron (2X) SYBRG I/tampón de lisis.

El tiempo de incubación con SYBRG I, para lograr la tinción con la mejor respuesta fluorescente, fue sometido a optimización a los niveles de variable 5 y 30 min; 1, 2, 4, 6, 24 y 48 h; empleando como indicadores de desempeño los parámetros de la metodología. Las curvas de concentración parasitaria *vs* respuesta fluorescente evidencian que en general se mantiene la linealidad y la proporcionalidad en los diferentes tiempos de tinción evaluados, sin embargo, los tiempos de tinción de 24 y 48 h generan curvas diferentes, en las cuales parece perderse un poco la proporcionalidad en la respuesta ante diferentes niveles de concentración parasitaria.

La pendiente promedio de las curvas generadas, en los diferentes tiempos de incubación, muestra una marcada disminución después de las 6 h, la variabilidad en los datos

es más alta en los tiempos de tinción de 5 y 30 min; frente a la pendiente generada, el tiempo de tinción es robusto entre 1 y 6 h (ver figura 1(A)). El coeficiente de correlación promedio de las curvas, en los diferentes tiempos de tinción, evidencia una marcada disminución después de las 6 h, con una alta variabilidad a las 24 h; frente al coeficiente de correlación el tiempo de tinción es robusto entre 5 min y 6 h (ver figura 1(B)).

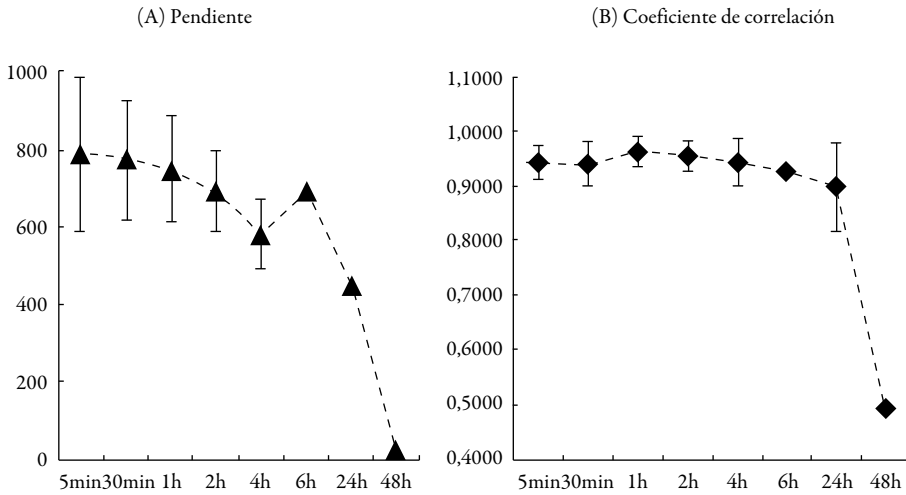


Figura 1. Optimización del tiempo de tinción, pendiente (A) y coeficiente de correlación (B), cepa FCB2. (Todas las mediciones se realizaron en quintuplicado, se presentan resultados de tres muestras procesadas de forma independiente, los valores de 6 h y 48 h provienen de un solo ensayo. Cada valor es procesado mediante sustracción de la fluorescencia de fondo).

Los límites promedio de detección y de cuantificación presentaron alta variabilidad a los 5 min; se mantuvieron relativamente constantes entre 1 y 6 h y posterior a ello se presenta aumento en la variabilidad y en los valores promedio de estos indicadores, a la luz de ello el tiempo de tinción es robusto entre 1 y 4 h (ver figura 2).

El promedio de concentración parasitaria mínima a la cual se logra calcular factor Z se mantiene relativamente constante entre 1 y 4 h; en cuanto al factor Z el tiempo de tinción es robusto entre 1 y 4 h (ver figura 3).

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

El efecto de trabajar con cultivos sincrónicos o asincrónicos fue evaluado 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), situación que no se presenta en el cultivo asincrónico donde se logra acreditar fluorescencia en bajas concentraciones parasitarias.

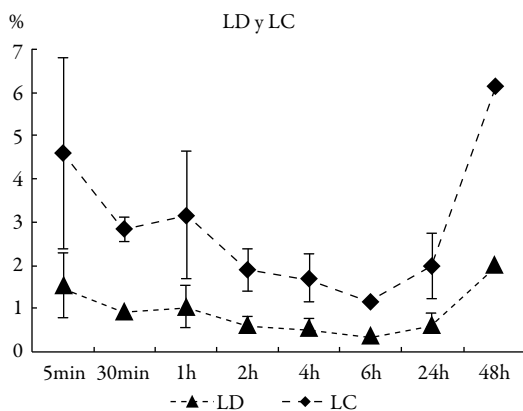


Figura 2. Optimización del tiempo de tinción, límite de detección (LD) y límite de cuantificación (LQ), cepa FCB2. (Todas las mediciones se realizaron en quintuplicado, se presentan resultados de tres muestras procesadas de forma independiente, los valores de 6 h y 48 h provienen de un solo ensayo. Cada valor es procesado mediante sustracción de la fluorescencia de fondo).

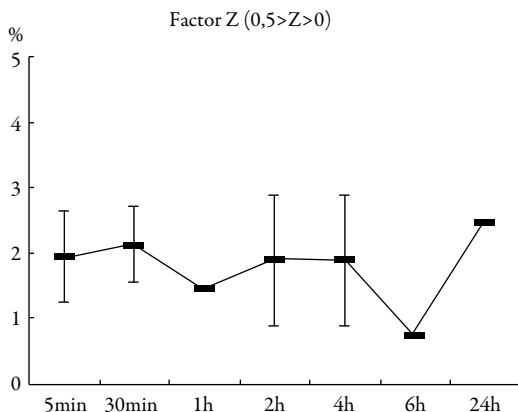


Figura 3. Optimización del tiempo de tinción, concentración parasitaria mínima a la que se logra calcular el factor Z, cepa FCB2. (Todas las mediciones se realizaron en quintuplicado, se presentan resultados de tres muestras procesadas de forma independiente, los valores de 1 h y 6 h provienen de un solo ensayo. Cada valor es procesado mediante sustracción de la fluorescencia de fondo).

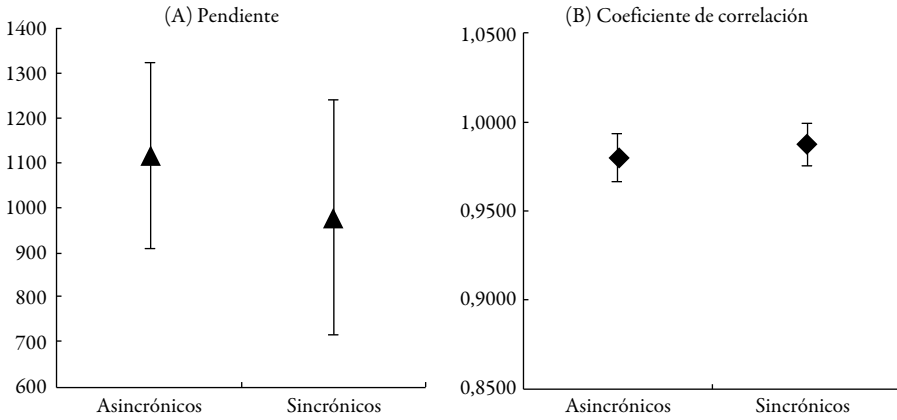


Figura 4. Optimización del tipo de cultivo asincrónico o aincrónico, pendiente (A) y coeficiente de correlación (B), cepa FCB2. (Todas las mediciones se realizaron en quintuplicado, se presentan resultados de tres muestras procesadas de forma independiente. Cada valor es procesado mediante sustracción de la fluorescencia de fondo).

En cuanto a la pendiente y el coeficiente de correlación no son evidentes diferencias derivadas del uso de cultivos sincrónicos o asincrónicos (ver figura 4). 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 (ver figura 5).

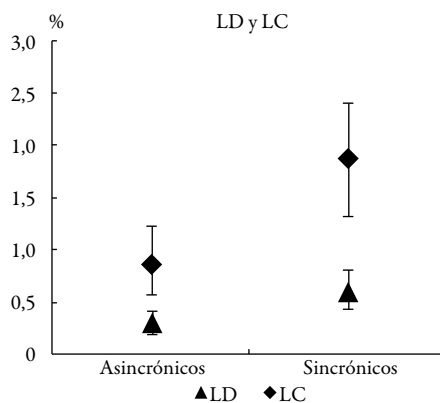


Figura 5. Optimización del tipo de cultivo asincrónico o sincrónico, límite de detección (LD) y límite de cuantificación (LC), cepa FCB2. (Todas las mediciones se realizaron en quintuplicado, se presentan resultados de tres muestras procesadas de forma independiente. Cada valor es procesado mediante sustracción de la fluorescencia de fondo).

Aun cuando es viable trabajar con un cultivo sincrónico, el cultivo asincrónico presenta mayor sensibilidad siendo esta la condición óptima de desarrollo del método. La sincronía es el comportamiento biológico normal de *P. falciparum* en el hospedero humano, in vitro generalmente, la sincronización ayuda a una mejor valoración microscópica del parásito en estadio de anillos al final del ensayo de actividad antiplasmodial (48 h después del inicio del tratamiento), el método fluorométrico permitiría superar esta limitante.

### Parámetros de la metodología

La fluorescencia generada por los GRS al contacto con el SYBRG I es estable como ruido de fondo; bajo condiciones optimizadas, el control positivo (GRP) generó en promedio una respuesta de  $14.920 \pm 1.735$  UFR y  $4.918 \pm 570$  UFR, en tanto que el control negativo (GRS) en promedio presentó una fluorescencia de  $1.792 \pm 377$  UFR y  $1.876 \pm 217$  UFR, cepas FCR3 y FCB2 respectivamente. En relación a la señal generada por el control C+, los GRS originan una lectura de fluorimetría que corresponde al 12% (95% CI: 11-13%, n = 9) y 38% (95% CI: 36-41%, n = 10), cepas FCR3 y FCB2 respectivamente; la lectura significativamente superior del C-, en el caso de la cepa FCB2, derivó de un comportamiento atípico del lote específico de material biológico, posiblemente, esto fue consecuencia del alto número de repiques consecutivos, dicho comportamiento fue también evidente en controles del ensayo de actividad antiplasmodial (parasitemia de grupo testigo y grupo control) (ver figura 6).

### 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, encontrándose una correlación lineal positiva y proporcional. La pendiente promedio de las líneas de regresión generadas fue  $1.761,8 \pm 238,5$  y  $852,4 \pm 227,0$ ; con coeficientes de correlación ( $r^2$ ) promedio de  $0,9644 \pm 0,0169$  y  $0,9841 \pm 0,0049$ , cepas FCR3 y FCB2 respectivamente (ver figura 7).

El método tiene una adecuada relación linear entre la densidad parasitaria y la respuesta en UFR a lo largo del rango de concentraciones parasitarias cuantificadas en el modelo farmacológico.

### Exactitud del método fluorescente por SYBR Green I

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 hacerlo frente a la cantidad verdadera; si el nuevo método concuerda bien con el antiguo, este último puede ser remplazado; el método de fluorescencia, 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 SYBRG I 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 [14, 15]. Los resultados evidencian concordancia entre los dos métodos con una diferencia media de 0,00002% y 0,09109%, cepas FCR3 y FCB2 respectivamente (ver figura 8).

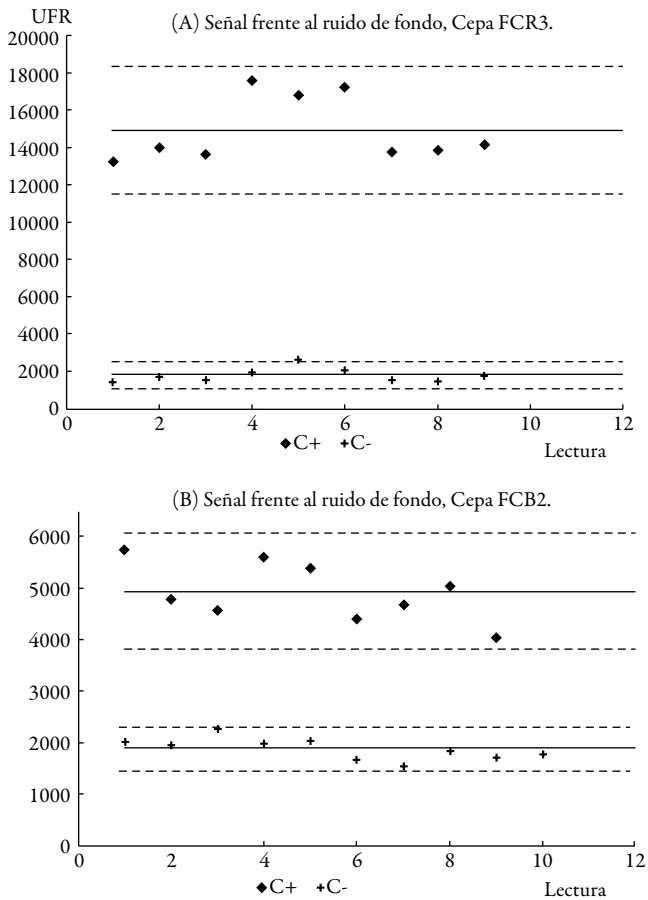


Figura 6. Respuesta fluorescente generada por los controles positivo (C+) y negativo(C-) en el método de fluorescencia SYBRG I, bajo condiciones optimizadas. (Las líneas horizontales continuas representan el promedio de respuesta, las líneas punteadas delimitan el intervalo de confianza del 95% de cada conjunto de datos). UFR (unidades de fluorescencia relativa), C+ (control positivo), C- (ruido de fondo, glóbulos rojos no parasitados).

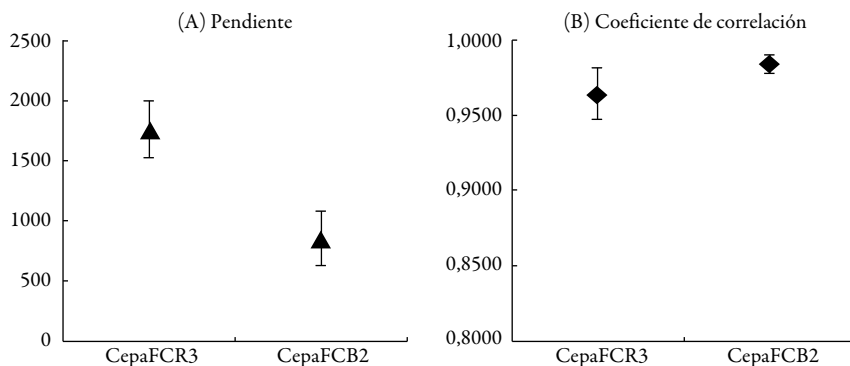


Figura 7. Evaluación de la linealidad entre la respuesta fluorescente (UFR) y el porcentaje de parasitemia; pendiente (A) y coeficiente de correlación  $r^2$  (B). (Todas las mediciones se realizaron en quintuplicado, se presentan resultados de hasta tres muestras procesadas de forma independiente. Cada valor es procesado mediante sustracción de la fluorescencia de fondo).

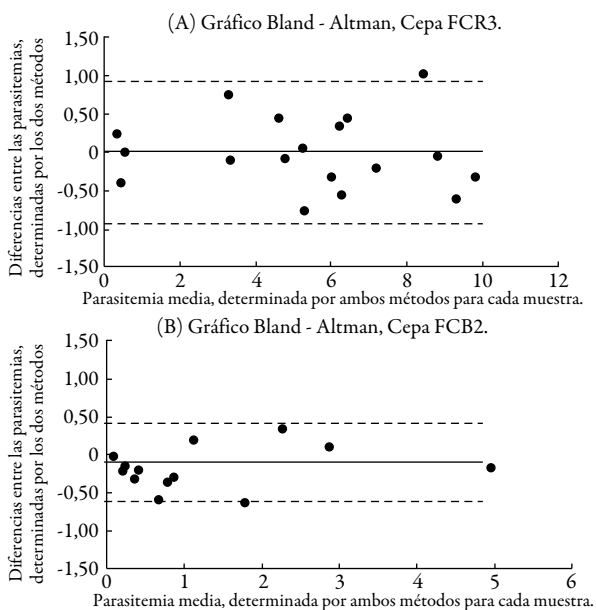


Figura 8. Representación gráfica de la diferencia entre el método de fluorescencia SYBRG I y el método de extendidos de sangre coloreados con Giemsa, frente a sus valores medios. (Muestras de cultivo de *P. falciparum* marcadas con SYBRG I o coloreadas con Giemsa y determinada su parasitemia. Los datos 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, confianza del 95%).

El rango depende de la aplicación prevista del método, siendo el intervalo de concentraciones parasitarias en el cual el método proporciona un grado aceptable de linealidad, exactitud y precisión [13]. 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 (1-10% cepa FCR3 y 0,5-5%, cepa FCB2), buscando conocer qué correspondencias hay entre 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 mayores de 50% para poder clasificar como activo un tratamiento; luego, aun si los dos métodos muestran lecturas que difieren hasta en un 0,5% de parasitemia, podríamos reemplazarlos entre sí dado que esta diferencia no afectaría a las decisiones sobre tamizaje de actividad. En cada ensayo, el grupo control positivo monitorea internamente la prueba.

A la luz de lo anterior, nuestro estudio muestra (con una confianza del 95%) que el ensayo de fluorescencia con SYBRG I arroja resultados tan solo 0,93% (FCR3) o 0,60% (FCB2) 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. Las gráficas generadas no muestran tendencia direccional o heterocedasticidad.

### **Sensibilidad del método fluorescente con SYBR Green I**

La sensibilidad fue valorada mediante la determinación del límite de detección (LD) y el límite de cuantificación (LC), entendiéndose el primero como el más bajo porcentaje de parasitemia que genera una señal fluorescente significativamente diferente de la generada por el control negativo (C-), y el segundo como el más bajo porcentaje de parasitemia que se puede cuantificar con exactitud y precisión aceptables [16] (ver figura 9(A)).

El límite de detección del método es  $0,3 \pm 0,01\%$  (FCR3) y  $0,5 \pm 0,2\%$  (FCB2), y el límite de cuantificación  $0,8 \pm 0,04\%$  (FCR3) y  $1,5 \pm 0,5\%$  (FCB2); en ambas cepas el LD es significativamente inferior al LC (95% confianza).

### **Calidad del método (Factor Z).**

El factor Z es un parámetro estadístico que representa la separación de las distribuciones generadas por las señales de los controles positivo y negativo [12]. Los modelos farmacológicos que muestran un factor  $Z \geq 0,5$  denotan un método excelente; un factor Z entre 0,5 y cero indica un método bueno o de doble respuesta; estos valores del factor Z se consideran adecuados para cribado de alto rendimiento (HTS) [19]. En condiciones optimizadas, el factor Z logró alcanzar valores superiores a 0,5

( $0,702 \pm 0,142$ ) para la cepa FCR3 y entre 0,5 y 0,0 ( $0,376 \pm 0,009$ ) para la cepa FCB2, a una parasitemia promedio de  $3,5 \pm 0,3\%$  y  $1,6 \pm 1,2\%$  respectivamente (ver figura 9(B)).

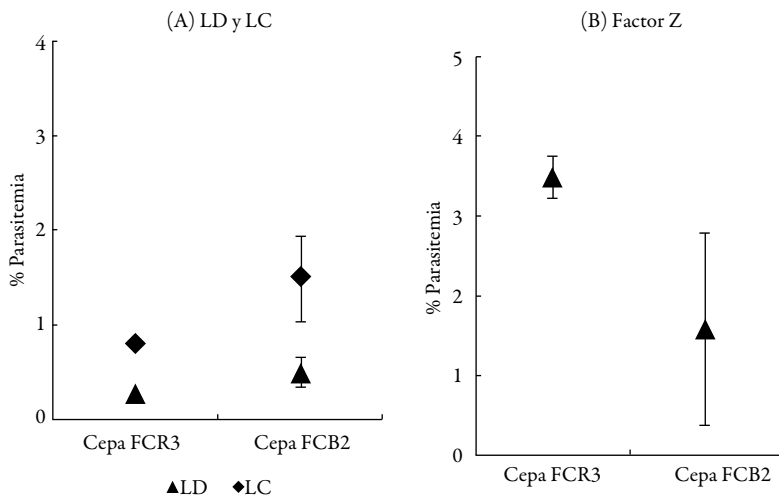


Figura 9. Evaluación de la sensibilidad y calidad del método fluorométrico con SYBRG I; (A) límite de detección (LD) y límite de cuantificación (LC), (B) porcentaje mínimo de parasitemia para el factor Z. (Todas las mediciones se realizaron en quintuplicado, se presentan resultados de hasta tres muestras procesadas de forma independiente).

El presente 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 significativa ( $>50\%$ ) de la señal (respecto al grupo control vehículo de tratamientos) y con bajo consumo de reactivos. Se estudió la robustez frente al tiempo de tinción evidenciando que no se presentan diferencias importantes en los parámetros del método entre 1 y 4 h, desde 6 h 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 SYBRG I a (2X), en cultivos asincrónicos y con un tiempo de tinción óptimo de 2 h.

Frente a los parámetros del método Vossen *et al.* [8] se encontró un bajo ruido de fondo del 13,92% generado por RPMI frente al agua destilada; cuando se mezcló SYBRG I con medio RPMI se 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 nuestras manos bajo condiciones óptimas, el ruido de fondo generado por el C- (GRS) frente al C+ fue de 12% y 38% para las cepas FCR3 y FCB2. Bajo condiciones optimizadas se verificó la linealidad de fluorescencia del SYBRG I sobre un rango de parasitemia conocida (determinada mediante examen microscópico), en una gama que enmarca los niveles de parasitemia generalmente empleados en el modelo farmacológico.

Para escoger el método de cuantificación de parasitemia que pueda ser empleado en un modelo farmacológico, se debe tener en cuenta las particularidades de la prueba; según lo demostrado por Moneriz *et al.* [16], que el cálculo de concentración inhibitoria 50 (CI<sub>50</sub>) 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 para estimación de la CI<sub>50</sub>, la baja sensibilidad no es asunto crítico. Recientemente, varios autores informaron la utilidad del ensayo SYBRG I para valorar la sensibilidad de *P. falciparum* (aislados de campo de África y del Sudeste de Asia) a los medicamentos, evidenciando que el método basado en fluorescencia genera resultados de CI<sub>50</sub> comparables a los generados por los métodos tradicionales de incorporación de [3H]-hipoxantina o HRP-2 ELISA [6, 9, 19-21].

Los métodos micro-fluorométricos de alta sensibilidad son críticos en aplicaciones como el control de las infecciones submicroscópicas en las primeras etapas de la enfermedad o en el embarazo y en la estimación de la eficiencia de las vacunas; por ejemplo, para muestras clínicas no aclaradas de glóbulos blancos, el método HRP-2 ELISA ha demostrado ser superior al método SYBRG I, en la evaluación de campo de aislamientos frescos de *P. falciparum* con baja parasitemia (<0,2%), como los generalmente encontrados en el Sudeste asiático [9].

Para el tamizaje *in vitro* de agentes anti-babesia, en cultivos de *Babesia bovis*, el método basado en la fluorescencia de SYBRG I fue evaluado frente a la valoración microscópica clásica; los valores obtenidos de concentración inhibitoria (IC<sub>50</sub>) de 5 fármacos mostraron concordancia [11]. Igualmente, Somsak *et al.* [10] demostraron que la CI<sub>50</sub> de pirimetamina y CQ, determinados fluorométricamente por citometría de flujo y por microscopía, fueron comparables confirmando la aplicabilidad del método de marcaje con SYBRG I en el tamizaje rutinario de fármacos. En nuestras manos la CI<sub>50</sub> de Clo-roquina sobre la cepa FCR3 fue  $0,37 \pm 0,05$  mcg/mL ( $0,72 \pm 0,09$   $\mu$ M) determinada por microscopía, y  $0,35 \pm 0,02$  mcg/mL ( $0,68 \pm 0,03$   $\mu$ M) determinada por fluorometría (ver figura 11); estos valores son comparables con lo reportado por otros autores [22-25].



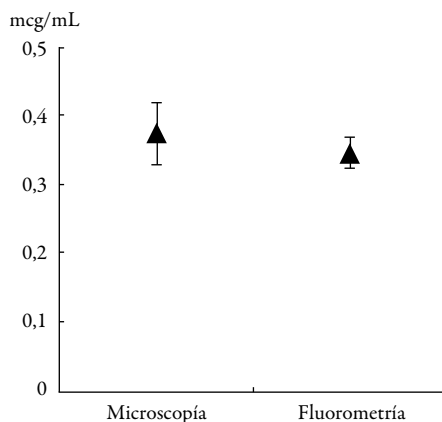


Figura 10. Concentración Inhibitoria 50 de Cloroquina valorada por los métodos microscópico y fluorométrico con SYBRG I. (Todas las mediciones se realizaron en triplicado, se presentan resultados de tres muestras procesadas de forma independiente).

Algunas desventajas asociadas con la cuantificación por microscopía de la parasitemia de *P. falciparum* pueden ser superadas por el método de fluorescencia SYBRG I. Por ejemplo, los resultados basados en microscopía pueden ser inconsistentes porque la exactitud de los valores de parasitemia quizá sean influenciados 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 SYBRG I son: cultivos asincrónicos y 2 h de tiempo de tinción; bajo estas condiciones de ensayo, se detecta con precisión la parasitemia por encima de 1,5%, y se presenta alta concordancia con la microscopía en la determinación de concentraciones inhibitorias 50.

## AGRADECIMIENTOS

M.H. Arias recibió apoyo financiero de Colciencias y el MAE francés a través del programa ECOSNORD, así como de la Vicedecanatura de Investigación, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia. Se agradece al Hemocentro Distrital de Bogotá D.C., al Instituto Nacional de Salud y a la Universidad de Antioquia por

el apoyo brindado con material biológico. El presente trabajo se adelantó dentro de las actividades del grupo de investigación: Farmacología de la Medicina Tradicional y Popular (FaMeTra), del Departamento de Farmacia, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia.

## REFERENCIAS

1. W. Trager, J.B. Jensen, Human malaria in continuous culture, *Science*, **193**, 673-675 (1976).
2. R.E. Desjardins, C.J. Canfield, J.D. Haynes, J.D. Chulay, Quantitative assessment of antimalarial activity *in vitro* by a semiautomated microdilution technique, *Antimicrob. Agents Chemother.*, **16**(6), 710-718 (1979).
3. L.J.J.W. Smeijsters, N.M. Zijlstra, F.F.J. Franssen, J.P. Overdulve, Simple, fast, and accurate fluorometric method to determine drug susceptibility of *Plasmodium falciparum* in 24-well suspension cultures, *Antimicrob. Agents Chemother.*, **40**(4), 835-838 (1996).
4. T.N. Bennett, M. Paguio, B. Gligorijevic, C. Seudieu, A.D. Kosar, E. Davidson *et al.*, Novel, rapid, and inexpensive cell-based efficacy quantification of antimalarial drug, *Antimicrob. Agents Chemother.*, **48**(5), 1807-1810 (2004).
5. B.T. Grimberg, Methodology and application of flow cytometry for investigation of human malaria parasites, *J. Immunol. Methods*, **367**(1-2), 1-16 (2011).
6. D.J. Bacon, C. Latour, C. Lucas, O. Colina, P. Ringwald, S. Picot, 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 (2007).
7. M. Smilkstein, N. Sriwilajaroen, J.X. Kelly, P. Wilairat, M. Riscoe, Simple and inexpensive fluorescence-based technique for high-throughput antimalarial drug screening, *Antimicrob. Agents Chemother.*, **48**(5), 1803-1806 (2004).
8. M.G. Vossen, S. Pferschy, P. Chiba, H. Noedl, The SYBR green I malaria drug sensitivity assay: performance in low parasitemia samples, *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, **82**, 398-401 (2010).
9. S. Chaorattanakawee, S.D. Tyner, C. Lon, K. Yingyuen, W. Ruttvisutinunt, S. Sundrakes, P. Saignam, J.D. Johnson, D.S. Walsh, D.L. Saunders, C.A. Lanteri,

- 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, *Malar. J.*, **12**, 239 p. 1-11 (2013).
10. V. Somsak, S. Srichairatanakool, Y. Yuthavong, S. Kamchonwongpaisan, Ch. Uthaiipibull, Flow cytometric enumeration of *Plasmodium berghei*-infected red blood cells stained with SYBR Green I, *Acta Tropica*, **122**, 113-118 (2012).
  11. A. Guswanto, T. Sivakumar, M.A. Rizk, S.A.E. El sayed, M.A. Youssef, E.E.S. El Said, N. Yokoyama, I. Igarashi, Evaluation of a fluorescence-based method for antibabesial drug screening, *Antimicrob. Agents Chemother.*, **58**(8), 4713-4717 (2014).
  12. J.H. Zhang, T.D.Y. Chung, K.R. Oldenburg, A simple statistical parameter for use in evaluation and validation of high throughput screening assays, *J. Biomol. Screen.*, **4**(2), 67-73 (1999).
  13. The European Agency for the Evaluation of Medicinal Products, International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use, "Harmonised Tripartite Guideline: Validation of Analytical Procedures: Methodology", CPM/ICH/281/95, 1996, pp. 1-9.
  14. J.M. Bland, D.G. Altman, Statistical methods for assessing agreement between two methods of clinical measurement, *Lancet*, **1**, 307-310 (1986).
  15. J.M. Bland, D.G. Altman, Measuring agreement in method comparison studies, *Stat. Methods Med. Res.*, **8**, 135-160 (1999).
  16. C. Moneriz, P. Marín-García, J.M. Bautista, A. Diez, A. Puyet, Haemoglobin interference and increased sensitivity of fluorimetric assays for quantification of low-parasitaemia *Plasmodium* infected erythrocytes, *Malar. J.*, **8**, 279 p. 1-10 (2009).
  17. E. Deharo, P. Gautret, V. Muñoz, M. Sauvain, "Técnicas de laboratorio para la selección de sustancias antimaláricas", CYTED-IRD, La Paz, Bolivia, 2000.
  18. G. Garavito, "Etude pharmacologique expérimentale de l'activité antipaludique d'un composé de synthèse: le chlorure de methylthioninium", These Docteur, Université Toulouse III, 2007. URL: <http://tel.archives-ouvertes.fr/tel-00639025/fr/>, 2007.

19. J.D. Johnson, R.A. Dennull, L. Gerena, M. Lopez-Sanchez, N.E. Roncal, N.C. Waters, 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 (2007).
20. H.M. Akala, F.L. Eyase, A.C. Cheruiyot, A.A. Omondi, B.R. Ogutu, N.C. Waters, J.D. Johnson, M.E. Polhemus, D.C. Schnabel, D.S. Walsh, 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 (2011).
21. M.A. Rason, T. Randriantsoa, H. Andrianantenaina, A. Ratsimbasoa, D. Menard, 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 (2008).
22. L. Guetzoyan, F. Ramiandrasoa, H. Dorizon, C. Desprez, A. Bridoux, A. Rogier, *In vitro* efficiency of new acridyl derivatives against *Plasmodium falciparum*, *Bioorg. Med. Chem.*, **15**, 3278-3289 (2007).
23. B. Pradines, S. Alibert-Franco, C. Houdoin, J. Mosnier, C. Santelli-Rouvier, V. Papa, *In vitro* reversal of chloroquine resistance in *Plasmodium falciparum* with dihydroethanoanthracene derivatives, *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, **66**(6), 661-666 (2002).
24. C. Molyneaux, M. Krugliak, H. Ginsburg, K. Chibale, Arylpiperazines displaying preferential potency against chloroquine-resistant strains of the malaria parasite *Plasmodium falciparum*, *Biochem. Pharmacol.*, **71**, 61-68 (2005).
25. A. Mendoza, S. Pérez-Silanes, M. Quiliano, A. Pabón, S. Galiano, G. González, G. Garavito, M. Zimic, A. Vaisberg, I. Aldana, A. Monge, E. Deharo, Aryl piperazine and pyrrolidine as antimalarial agents. Synthesis and investigation of structure–activity relationships, *Exp. Parasitol.*, **128**(2), 97-103 (2011).