



Universidad de los Andes
Facultad de Farmacia y Bioanálisis
Escuela de Bioanálisis
Instituto de Investigaciones
Sección Biotecnología
Mérida Estado Mérida

**Aplicación del método mejorado de procesamiento de imágenes
de Biospeckle a ensayos con *Trypanosoma cruzi* diferentes
condiciones: Método de Imagen de Diferencias Acumuladas de
Base Variable**

Autor:

Griffin O. Karla C.

C.I.:20544614

Tutora: Profesora Cristina Grassi.

Mérida, Noviembre del 2015



Universidad de los Andes
Facultad de Farmacia y Bioanálisis
Escuela de Bioanálisis
Instituto de Investigaciones
Sección Biotecnología
Mérida Estado Mérida

Aplicación del método mejorado de procesamiento de imágenes de Biospeckle a ensayos con *Trypanosoma cruzi* diferentes condiciones: Método de Imagen de Diferencias Acumuladas de Base Variable

(Trabajo de Grado presentado como requisito obligatorio para optar al Título de Licenciado en Bioanálisis)

Autor:

Griffin O. Karla C.

C.I:20544614

karlacarolinagriffinortega@gmail.com

Tutora: Profesora Cristina Grassi.

Mérida, Noviembre del 2015

Índice

	Pág.
Agradecimientos	v
Dedicatoria	vi
Resumen	vii
Introducción	1
Capítulo I	3
1. Problema de la investigación	3
1.1 Planteamiento del problema	3
1.2 Objetivo de la investigación	4
1.2.1 Objetivo general	4
1.3 Justificación de la investigación	4
Capítulo II	5
2. Marco teórico	5
2.1 Antecedentes de la investigación	5
2.2 Antecedentes históricos	9
2.3 Bases teóricas	9
2.3.1 Triatominos	9
2.3.2 Enfermedad de chagas	9
2.3.3 Transmisión y manifestaciones clínicas	10
2.3.4 Celebrex	10
2.3.5 Dipirona	10
2.4 Hipótesis	11
Capítulo III	12
3. Marco metodológico	12
3.1 Materiales y métodos	12
3.1.1 Videos	12
3.1.2 Parásitos	13
3.1.3 Condiciones de láser y cámara	13
3.1.4 Método de imagen de diferencias acumuladas de base variable	13
Capítulo IV	14
4. Resultados y discusión	14
4.1.1 Figura 12 (tiempo 0)	19
4.1.2 Figura 14 (tiempo 1) 30 minutos	19
4.1.3 Figura 16 (tiempo 2) 60 minutos	19
4.1.4 Figura 18 (tiempo 3) 90 minutos	20
4.1.5 Figura 20 (tiempo 4) 120 minutos	20
Capítulo V	23
5. Conclusiones	23
Referencias bibliográficas	25

Índice de Figuras

	Pág.
Figura 11	14
Figura 12	14
Figura 13	15
Figura 14	15
Figura 15	16
Figura 16	16
Figura 17	17
Figura 18	17
Figura 19	18
Figura 20	18
Figura 21	21
Figura 22	21

bdigital.ula.ve



DOCUMENTO DE PROTECCIÓN DE LA INFORMACIÓN

El presente trabajo contiene información de ideas, de procedimientos, de organismos, de materiales químicos y biológicos, etc. Clasificados como protegibles y confidenciales, para los efectos de divulgación, reproducción y uso por personas e instituciones que no sean los autores, los tutores/ asesores y los colaboradores y que no sean las empresas/ instituciones implicadas y la Sección Biotecnología del Instituto de Investigaciones de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Los Andes, respectivamente

Este trabajo se debe citar de la siguiente manera:

GRIFFIN-ORTEGA, KARLA C. (2015). Aplicación del método mejorado de procesamiento de imágenes de Biospeckle a ensayos con *Trypanosoma cruzi* bajo diferentes condiciones: Método de Imagen de Diferencias Acumuladas de Base Variable. Tutora: Profesora Cristina Grassi. Sección de Biotecnología, Instituto de Investigaciones. Escuela de Bioanálisis. Facultad de Farmacia y Bioanálisis, Universidad de los Andes. Mérida, Venezuela.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco primeramente a Dios por haberme permitido lograr esta meta tan anhelada.

A la ilustre Universidad de los Andes. Por ser tan maravillosa y crear excelentes profesionales.

A mi tutora Cristina Grassi, su esposo el profesor Efrén Andrades y al profesor Juan Dávila por tanta dedicación. Mil Gracias.

A Betania Parra por ser mi compañera de estudio de toda la vida.

Al Sr. Oliden Tovar por tanta ayuda ofrecida durante mi carrera.

A mi novio Ronny Pacheco y su mamá Ana Zerpa por tenderme su mano y darme apoyo en este largo trayecto.

bdigital.ula.ve

DEDICATORIA

Dedico mi tesis a mi padre Roberto Griffin y mi madre María Jacinta Ortega por haber estado siempre ahí firmemente confiando en mí, apoyándome sin dudar en ningún momento que si lo lograría y dándome ánimos cada vez que quería doblegar. Gracias, son mi todo. Los amo.

A mi tío Carlos Griffin que aunque ya no esté presente físicamente, en vida siempre estuvo pendiente de mí a pesar de la distancia.

A mis sobrinos Edgardo Silva y Walezka Silva por ser parte de mi motivación para lograr esta meta.

A mi hermano Carlos Silva por de una u otra manera estar ahí para mí.

bdigital.ula.ve

UNIVERSIDAD DE LOS ANDES
FACULTAD DE FARMACIA Y BIOANALISIS
ESCUELA DE BIOANALISIS
AREA: BIOTECNOLOGIA – IIFFB

**Aplicación del método mejorado de procesamiento de imágenes de
Biospeckle a ensayos con *Trypanosoma cruzi* diferentes condiciones:
Método de Imagen de Diferencias Acumuladas de Base Variable**

Tesista: Griffin O. Karla C.

Tutor: Prof: Cristina Grassi

Resumen

El objetivo de este trabajo es aplicar el método mejorado de procesamiento de imágenes para obtener datos cualitativos y cuantitativos de las experiencias realizadas con *Trypanosoma cruzi*, bajo diferentes condiciones y tomando el video de la placa completa. En este sentido, considerando que se tienen experiencias ya realizadas con *T. cruzi* bajo diferentes condiciones, en videos de placa completa, que visualmente se observan como adecuados, se propone que se podrían aplicar métodos de procesamiento de imágenes para extraer los datos de una manera cuantitativa. Por otra parte metodológicamente, para realizar el ensayo se contó con cinco (5) videos obtenidos en experiencias previamente realizadas, los cuales se corresponden con cinco (5) tiempos (t_0 , t_1 , t_2 , t_3 , t_4) tomados cada media hora, en una misma placa de VDRL. El cultivo original de parásitos fue de una densidad de $7,5 \times 10^6$ parásitos/mL y el láser utilizado es de color rojo de 35 mW ubicado a una distancia aproximadamente 60° , la cámara se encontraba ubicada de manera perpendicular a la placa, a una distancia de 60 cm y a un ángulo de 45° . Para realizar este análisis se usó el procesamiento por el método de imagen de diferencias acumuladas de base variable. Finalmente como conclusión se obtuvo que el Celebex y el EDTA resultaron ser los más activos en cuanto a la disminución de la intensidad media procesada por este método, que el Dimetilsulfoxido es un buen disolvente de los extractos en estos ensayos, porque su presencia no disminuye la actividad de los parásitos. Se debe destacar que la Dipirona tiene una actividad medida como intensidad media, mayor que el Dimetilsulfoxido, mayor que el control y mayor que cualquiera de los otros ensayos. Con respecto a los extractos utilizados (extracto Randia Etanol y extracto 1992), el extracto Randia Etanol afecta más la movilidad y el extracto 1992 afecta más la densidad o la forma del parásito.

Introducción

Un patrón de Speckle es un patrón de intensidad producido por la interferencia mutua de un conjunto de fuentes distribuidas en la superficie. Estos patrones se analizan mayoritariamente cuando una superficie es iluminada, con un haz láser, pudiendo analizar deformaciones o desplazamientos en la superficie de la muestra respecto del observador, que en este caso sería la cámara, ya que un observador humano siempre presenta un movimiento que, aunque mínimo, no permite que este fenómeno sea apreciado correctamente (Cianci M. y col., 2014).

Con la aparición de los primeros láseres comerciales en la década de 1.960, se observó posteriormente un nuevo fenómeno, que se trataba de que cuando la luz era reflejada en una superficie estática con cierta rugosidad, se podía observar a simple vista un patrón granular estático, de puntos claros y oscuros (Rabal H., 2009).

El reflejo de la luz es recogida en una pantalla, la cual creará un patrón de interferencia que no solo depende de las características espaciales sino también de las temporales; por lo tanto, para que un análisis exclusivamente temporal sea válido, las características espaciales del patrón no deben cambiar (Draiger M., 2009).

Con el transcurrir del tiempo este tipo de granularidad recibió el nombre de speckle y se la puede encontrar en otros campos donde exista radiación transmitida o reflejada desde objetos que presentan ciertos grados de rugosidad o granularidad, dependiendo directamente de la longitud de onda de la luz láser incidente (Rabal H., 2009).

El Speckle dinámico es el resultado de la evolución en el tiempo de un diagrama de Speckle, en el que las variaciones en los elementos dispersores que forman la figura de interferencia en la situación estática, son las causantes de los cambios producidos en la misma. El aspecto visual del diagrama de Speckle dinámico es

similar al de un líquido que hierve, donde los granos de Speckle (puntos) varían su intensidad y forma. Esto ocurre cuando la muestra cambia sus características debido al movimiento de los centros de la dispersión, que cambia en el camino óptico debido a las variaciones del índice de refracción, por los cambios de configuración o a la combinación de estas situaciones, hasta que la actividad de la muestra analizada culmina (Cianci M. y col., 2014).

El speckle láser dinámico es una herramienta rápida y eficaz para confirmar respuestas quimiotácticas. El mismo se lleva a cabo a través de las etapas de: generar un espectro de speckle haciendo incidir sobre las placas y a través de un difusor, un láser cuya longitud de onda es menor que el tamaño de los microorganismos; se registra la secuencia de imágenes de transmisión del speckle, a diferentes intervalos de tiempo y se analiza la respuesta dinámica a fin de detectar movimientos quimiotácticos (Aramburu M. y Díaz M., 2007).

Este procedimiento permite el análisis de muestras biológicas que contiene un gran número de dispersores móviles, los cuales ocasionan dificultad en la identificación y aislamiento de estos fenómenos. También permite la caracterización de las actividades de los tejidos biológicos para evaluar por ejemplo el flujo sanguíneo en el cerebro, estudios en semillas, frutos y otros elementos macroscópicos. También se puede evaluar elementos microscópicos tales como semen, así como también para determinar la respuesta quimiotáctica de algunos parásitos, hongos, bacterias y virus (Rabal H., 2009). Es por eso que en este trabajo se realizó la determinación de parásitos con la aplicación de dicha técnica.

Capítulo I

1. Problema de la investigación

1.1 Planteamiento del Problema

La capacidad del laboratorio para realizar el diagnóstico y el control de las enfermedades parasitarias se encuentra limitada por factores como la calidad de la muestra recogida en el paciente, el medio de transporte de la muestra al laboratorio y las técnicas utilizadas para demostrar la presencia del microorganismo, los parásitos son los microorganismos con mayor grado de complejidad. La mayoría de las pruebas diagnósticas se basa en la capacidad de evolución del microorganismo y las condiciones del transporte han de asegurar su viabilidad e integridad (Murray P. y col., 2005).

El mal de Chagas es una importante zoonosis en América del sur y en menor grado en Centro América y México, por una parte el diagnóstico se basa en la presencia de picaduras de triatóminos en los animales domésticos o en el hombre y la identificación morfológica del parásito en fluidos y tejidos corporales (Quiroz H., 2005).

Esta enfermedad es causada por el protozoario *Trypanosoma cruzi*, el cual es transmitido por un insecto del grupo de los *Triatomíinos* mejor conocido como chipo (Hooft K., 2004). Por lo tanto es necesaria la intervención de especialistas para la clasificación específica así como para determinar si son o no portadores de dicho parásito (Quiroz H., 2005).

Unos de los problemas diagnósticos en la enfermedad de chagas es la visualización del parásito etiológico, ya que si bien se trata de un organismo visible al microscopio y muy móvil se presenta en concentraciones muy bajas (100 organismos/ ml o menor). Lo cual impide generalmente la detección por microscopía óptica, por esto se procura obtener un método de detección en

profundidad de campo, lo cual no es posible lograr con microscopio (Lanis E. y col., 1991).

1.2 Objetivo de la investigación

1.2.1 Objetivo general

Aplicar el método mejorado de procesamiento de imágenes para obtener datos cualitativos y cuantitativos de las experiencias realizadas con *Trypanosoma cruzi* bajo diferentes condiciones y tomando el video de la placa completa.

1.3 Justificación de la investigación

El fenómeno Speckle aprovechado como herramienta ha demostrado su utilidad para extraer información relacionada con diferentes tipos de actividades; en campos de aplicación tan diversos como la medicina y la industria.

En la sección de biotecnología los ensayos de Biospeckle se han estandarizados en placas de VDRL y tomando videos individuales de cada pozo. Sin embargo también se han realizado experiencias tomadas de la placa completa en un solo video. Esta modalidad tiene la ventaja de tomar simultáneamente todos los pozos de la placa de VDRL conservando las mismas condición tales como: iluminación, tiempo transcurrido, efectos ambientales, para todos ellos y reduciendo el número de videos que se deben tomar, esto permitió hacer procesamientos en función del tiempo tomando un solo resultado cada media hora.

Sin embargo el procesamiento de esas imágenes no ha sido realizado debido a las complicaciones que introducen el hecho de tener doce (12) condiciones diferentes en un solo video.

Capítulo II

2. Marco Teórico

2.1 Antecedentes de la investigación

En la Sección Biotecnología de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Los Andes, se ha empleado la técnica de Biospeckle en diversos trabajos.

Padilla (1998) logró determinar que la Dipirona tiene actividad tóxica.

Vargas (1999) encontró que la Dipirona inhibe el crecimiento de *Trypanosoma cruzi* in vitro.

Ramírez (2000) también encontró que la Dipirona inhibe a *Trypanosoma cruzi* en condiciones in vitro sobre epimastigotas, semi-in vitro y disminuye la infección en ratones homocigotos in vivo sobre tripomastigotas.

Contreras (2003) se produce un efecto in vivo en modelos animales de ratones homocigotos y heterocigotos, con presencia de pocos nidos de amastigotas en comparación con un control no tratado.

Agelvis (2004) encontró que la Dipirona mejora la condición de pacientes humanos con Chagas.

García (2011) estandarizó el uso del speckle dinámico para detectar la presencia de parásitos, para ello realizó el ensayo en una placa de V.D.R.L. y efectuó grabaciones de cada pozo realizando videos de 60 s. Esos videos se procesaron con un programa diseñado, elaborado y ejecutado por Andrades (2011), usando el método de las Diferencias Temporales. Los resultados indican que los parásitos en presencia de los diversos fármacos ensayados alcanzan un valor de Media arrojado por el programa de Andrades (2011), mayor que en ausencia de fármacos, estimulándose el patrón de speckle bajo estas condiciones, asimismo, esta relación es dependiente de la concentración del fármaco. Finalmente,

demonstró que esta técnica puede sustituir los ensayos *in vitro*, ya que es más rápida y se evita la contaminación del medio.

Simultáneamente en 2011, Lobo corroboró este planteamiento, utilizando el biospeckle para medir la actividad de diversos fármacos sobre *T. cruzi*, de esta manera se puede hacer una predicción rápida del efecto a corto plazo de los fármacos sobre los parásitos, produciéndose un efecto instantáneo cuando se emplea Tofranil y Tryptanol. En este trabajo no solamente se utilizaron nuevas propuestas de fármacos (antidepresivos tricíclicos) como trypanocidas, sino que también se evaluó el valor predictivo del biospeckle al comparar los resultados con experiencias desarrolladas *in vitro* e *in vivo*.

Belandría en 2011, diseñó experiencias de biospeckle tomando en cuenta los resultados de otros investigadores, García (2011) y Lobo (2011), pero aplicadas a *Escherichia coli*. El diseño consistió en evaluar tanto el efecto de la concentración de antibiótico sobre la bacteria, como el tiempo de acción del mismo, tratando de encontrar tanto la concentración óptima como el tiempo mínimo para la detección por Biospeckle. Para ello desarrolló el Biospeckle con medio de cultivo, medio más bacterias, medio más bacterias más antibiótico y medio más antibiótico, inicialmente se observó que la presencia de bacterias aumenta el patrón de speckle, además se decidió esperar un tiempo prudencial de 15 min, y así evitar los efectos por movimiento, mezcla y difusión. Los resultados demuestran que el biospeckle es más eficiente con respecto a tiempo que técnicas tradicionales como macrodilución y difusión en agar, por tanto representa un método que tiene un valor predictivo para obtener concentración mínima inhibitoria de un antibiótico.

En estos tres trabajos, los videos se procesaron por el Programa de Andrades (2011), el cual fue diseñado por el método de las diferencias temporales tomadas de Pomarico y DiRocco (2004). Este programa hace la resta de las matrices de fotogramas consecutivos, y luego calcula la media de cada matriz de diferencia y la media de las medias de diferencia, obteniendo un solo valor de Intensidad Media final. Este método tiene la particularidad de “normalizar” y disminuir las

diferencias. En los trabajos sucesivos se ha cambiado el análisis hacia un sistema de autocorrelación comparando cada matriz con una matriz constante y tomando el cambio que ocurre en función del tiempo o pendiente, lo que ha mejorado las diferencias entre videos. Este método ha sido denominado por nosotros como comparación de base constante.

En un estudio similar, realizado por Díaz y Gallego en 2013, se utilizó biospeckle para medir el efecto de ciprofloxacina sobre *Escherichia coli*, los resultados permiten inferir que se puede distinguir materia viva de materia muerta, además se encontró una posible correlación entre la pendiente de la tendencia lineal, la concentración bacteriana y la concentración del antibiótico, tendiendo a ser mayor la pendiente cuando aumenta la concentración de bacterias, mientras que disminuye cuando aumenta el antibiótico. En este trabajo los videos también se procesaron manualmente por el método de comparación con base constante.

En la actualidad se están desarrollando dos trabajos (Méndez 2015, Abche 2015) que han conducido al avance en el procesamiento de imágenes. Méndez (2015) examinó las ecuaciones y los algoritmos utilizados en el procesamiento y propuso un nuevo método, basado en los conceptos de flujo óptico, que denominamos método óptico IDABV. Abche (2015) tomó esa propuesta y reprocesó los videos obtenidos por Belandria (2011) y tomando en consideración el modo de acción de los antibióticos utilizados, contribuyó a constatar que ese nuevo procesamiento es más adecuado.

Todos los trabajos anteriores se llevaron a cabo con un ensamble manual de láser, cámara y porta muestras, que se armaba en un cuarto oscuro. A partir del año 2012 se comenzó a elaborar un prototipo de Biospeckle en el contexto del Proyecto de Innovación del Poder Popular para la Ciencia, la Tecnología y la Innovación, intitulado: “Producto y proceso para medir el efecto de antibióticos sobre microorganismos en un tiempo corto y utilizando biospeckle” Proyecto No. 2012001862.

Briceño y Ángel (2013), utilizando el Prototipo de Biospeckle en sus primeras etapas de fabricación, también aplicaron biospeckle en el estudio de bacterias, para ello emplearon métodos de atenuación del láser con el objetivo de detectar la presencia de las mismas, usando laser rojo, verde y azul con vidrio o filtros como atenuadores. Los resultados indican que el vidrio es buen atenuador cuando las bacterias están muy diluidas, sin embargo ocurre saturación de la imagen y afecta la cámara, por lo que recomienda usar filtros. Así mismo demostraron que empleando el láser verde se detecta solo efecto antibiótico cuando se usa vidrio como atenuador, mientras que si se usa un filtro se detectan solo las bacterias. En el caso del láser azul se obtienen resultados similares aunque es mucho más versátil para detectar bacterias concentradas y diluidas en presencia y ausencia de antibióticos si se atenúa con filtro. En este trabajo los videos se procesaron manualmente por el método de comparación con base constante.

Quintero. R (2013) concluyó que el Celebrex es un potente inhibidor de COX-2, produce inmovilidad de los parásitos y disminución metabólica sin afectar su forma en un tiempo mínimo de 24 horas. Esto sugiere que la inmovilidad y posiblemente muerte esta mediada por la inhibición de la prostaglandina sintasa semejante al COX-2. El efecto sobre la forma podría más bien ser ocasionado por la inhibición de prostaglandina sintasa semejante a COX-1. Por otra parte la dipirona es el único fármaco que presenta los dos efectos, inmovilidad y cambio de forma y coincide en que es capaz de inhibir tanto COX-1 como a COX-2.

En este momento se está culminando otro trabajo (Moreno, 2015) que está reuniendo las experiencias anteriores para mejorar los datos de Biospeckle. Para ello se ha evaluado el efecto del antibiótico Ampicilina – Sulbactam sobre *Escherichia coli*, por Biospeckle, usando láser verde en el prototipo construido. El procesamiento de videos se ha realizado por el método de comparación con base constante y por el método óptico IDABV. En ese contexto se ha logrado poner a punto una metodología de “Antibiograma por Biospeckle” y se ha evaluado la presencia de sistemas particulados para aumentar las diferencias entre muestras vivas y aquellas afectadas por el antibiótico.

2.2 Antecedentes históricos

En 1907, Carlos Chagas descubrió, lo que llamo formas de criticidias en el intestino de una especie triatomino del estado de minas Gerais en Brasil. Poco después, Oswaldo Cruz logró comprobar que los flagelados encontrados por su discípulo, podrían ser trasmitido a monos (*Callithrix penicillata*) luego de la picadura y posterior defecación de los insectos infectados. Observó que estos tripanosomas podían verse en la sangre de esos animales aún después de 10-30 días. 1909, Carlos Chagas notó que los triatominos también podían trasmitir tripanosomas al hombre y producir un síndrome. En honor a estos hombres se le dio el nombre de *Trypanosoma cruzi* al agente productor y enfermedad de chagas, cuando la infección se desarrolla en el hombre. Posteriormente, Vianna (1911) describe acertadamente la patología de la forma aguda de la enfermedad.

2.3 Bases teóricas

2.3.1 Triatominos:

Los triatominos son una subfamilia de insectos perteneciente a la familia Reduviidae del orden Hemiptera, conocidos a través de diversos nombres en diferentes regiones: vinchuca, chipo, pito y barbeiro, entre otros. Estas chinches permanecen escondidas durante el día, generalmente en grietas de las casas viejas o de baja calidad (generalmente, zonas rurales) y de noche se alimentan de sangre humana, mediante una picadura. Se las conoce como *chinches besuconas* porque uno de los lugares más frecuentes para encontrar la picadura es en la zona que rodea a la boca, aunque pueden picar en cualquier área de piel expuesta.

2.3.2 Enfermedad de Chagas:

La enfermedad de Chagas es el nombre común para la parasitosis producida por *Trypanosoma cruzi*. Se trata, por lo tanto, de una tripanosomiasis, que al darse principalmente en la zona de América Latina, recibe el apellido de 'americana'. De

esta manera, tripanosomiasis americana y enfermedad de Chagas hacen referencia a la misma infección. *T. cruzi* es un parásito protozoo, que se transmite por la picadura de una chinche del género *Triatoma*. Es una enfermedad potencialmente mortal y puede ser muy grave, pero si se trata a la persona con los antiparasitarios adecuados, puede recuperarse totalmente (García S., 2015).

2.3.3 Transmisión y manifestaciones clínicas

Las formas más tradicionales de contagio de la enfermedad de Chagas son la vectorial, la transfusional, la transplacentaria, los trasplantes de órganos infectados y los accidentes de laboratorio. La transmisión vectorial es causada por las deyecciones de triatominos infectados por *Trypanosoma cruzi* en la piel de mamíferos, en el momento de alimentarse. Otras formas de contagio han tomado importancia; una de ellas es la transmisión por vía oral debido al consumo de alimentos infectados. Estos pacientes pueden evolucionar a un estado crónico indeterminado, asintomático, o a manifestaciones clínicas tales como cardiopatías, megaformaciones o ambos. Lo más común es que se presenten miocarditis asociadas a arritmias y cardiomiopatías dilatadas. A su vez, pacientes con anormalidades digestivas pueden cursar cuadros de megaesófago o megacolon.

2.3.4 Celebrex

Medicamento cuyo componente activo es el Celocoxib, indicado para el alivio sintomático de la osteoporosis y la artritis reumatoide en pacientes sin antecedentes, factores de riesgo o presencia de enfermedad cardiovascular. Se comercializa en una presentación de capsula con concentración de 200mg por unidad.

2.3.5 Dipirona

Fármaco cuyo elemento activo es la Dipirona la cual es utilizada como analgésico y antipirético. Lo comercializa laboratorios Spefar en presentación de ampollas.

2.4 Hipótesis

Teniendo en cuenta que se tienen experiencias ya realizadas con *Trypanosoma cruzi* bajo diferentes condiciones en videos de placa completa que visualmente se observan como adecuados, se propone que se podrían aplicar métodos de procesamiento de imágenes para extraer los datos de una manera cuantitativa.

bdigital.ula.ve

Capítulo III

3. Marco Metodológico

3.1 Materiales y Métodos

3.1.1 Videos:

Se contó con cinco (5) videos obtenidos en experiencias previas realizadas por Lobo, García, Grassi, Andrades, Cabrera y Martí (2009).

Los cinco videos corresponden a cinco tiempos (t₀, t₁, t₂, t₃, t₄) tomados cada media hora de una misma placa de VDRL que contenía las siguientes muestras:

Pozo	Denominación de la Muestra	Volumen de parásitos	Volumen de otros componentes	Cantidad de parásitos por pozo
1	Parásitos 100ul	100 ul	Medio de cultivo 0 ul	$7,5 \times 10^5$
2	Parásitos 75ul	75 ul	Medio de cultivo 25 ul	$5,6 \times 10^5$
3	Parásitos 50ul	50 ul	Medio de cultivo 50 ul	$3,75 \times 10^5$
4	Parásitos 0ul	0 ul	Medio de cultivo 100 ul	0
5	Parásitos 95 Dipirona 5	95 ul	Dipirona 5 ul	$7,125 \times 10^5$
6	Parásitos 95 DMSO 5	95 ul	DMSO 5 ul	$7,125 \times 10^5$
7	Parásitos 95 Medio 5	95 ul	Medio de cultivo 5 ul	$7,125 \times 10^5$
8	Parásitos 95 EDTA 0,1M 5ul	95 ul	EDTA 0,1M 5 ul	$7,125 \times 10^5$
9	Parásitos 95 <i>Randia</i> clor 5ul	95 ul	Extracto clorofórmico de <i>Randia</i> 5ul	$7,125 \times 10^5$
10	Parásitos 95 <i>Randia</i> etOH 5ul	95 ul	Extracto etanólico de <i>Randia</i> 5ul	$7,125 \times 10^5$
11	Parásitos 95 1992 clor 5ul	95 ul	Extracto clorofórmico del Extracto 1992 5ul	$7,125 \times 10^5$
12	Parásitos 95 Celebrex 5ul	95 ul	Celebrex 5 ul	$7,125 \times 10^5$

3.1.2 Parásitos: El cultivo original tenía una densidad de $7,5 \times 10^6$ parásitos/mL

3.1.3 Condiciones de láser y cámara:

El ensayo se realizó con un láser rojo de 35 mW ubicado a una distancia aproximadamente de 40 cm con un ángulo de aproximadamente 60° . La cámara se encontraba ubicada de manera perpendicular a la placa a una distancia de 60 cm, a un ángulo de 45° .

En el procesamiento de videos se siguió la metodología que fue estandarizada por Méndez (2015) y evaluada por Abche (2015). Este método se denominó “Diferencia y Suma” y a continuación se describe de una manera resumida.

3.1.4 Método de Imagen de Diferencias Acumuladas de Base Variable:

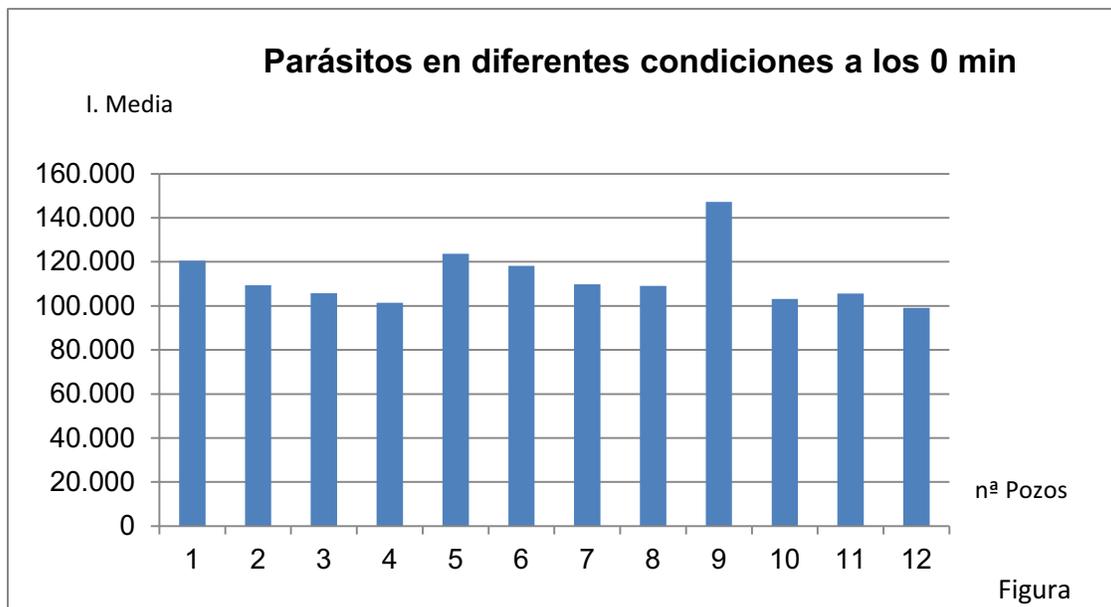
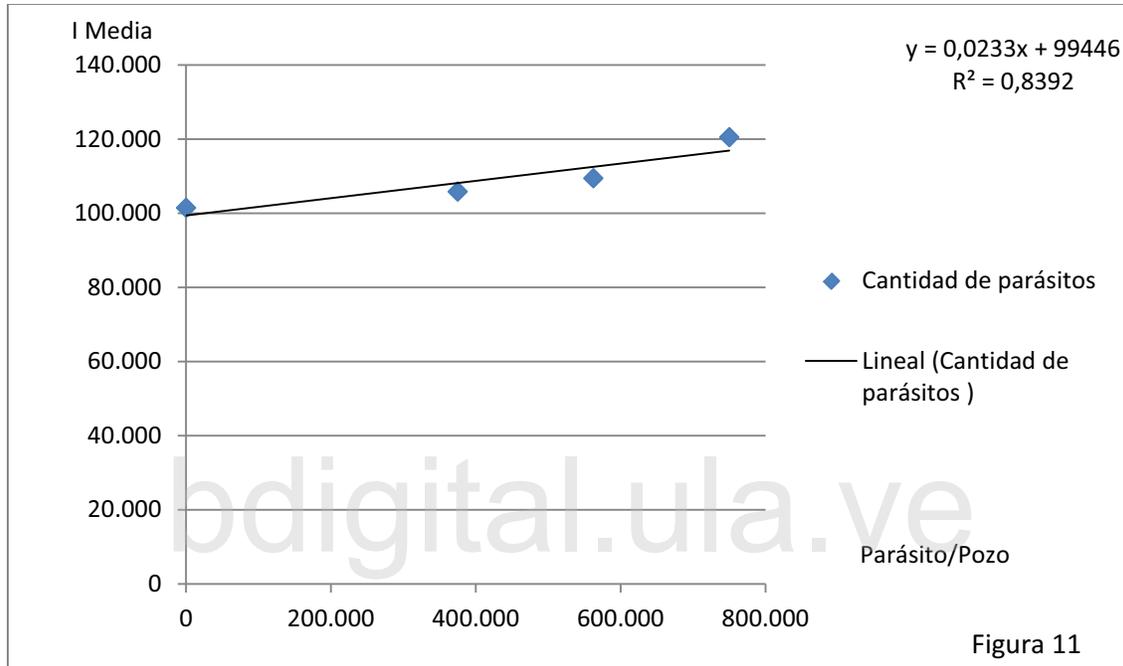
Utilizando la aplicación de DVD Video Soft Free Studio, se fragmentaron los videos en imágenes, luego se utilizó una segunda aplicación llamada Image J y se procedió a seleccionar treinta (30) fotogramas (fotogramas 100-131) a los cuales se les realizó la diferencia secuencial entre un fotograma y el consecutivo (denominada diferencia de base variable), generando matrices de diferencia, y luego se realizó la suma de las matrices de diferencia. Después de hacer todo este procedimiento, la última imagen que se denomina Imagen de Diferencias Acumuladas de Base Variable (IDABV) se procesó por la herramienta “Color>Split Channels” para separar las bandas de color y obtener la imagen de banda roja en escala de gris. Luego, a cada IDABV se le hizo el histograma de cada uno de los pozos de la placa, obteniendo la media de intensidad y seguidamente se realizaron los gráficos de la Media de la Intensidad en función de la concentración de parásitos para cada tiempo. También se realizó un gráfico de barras para observar el efecto de cada uno de los fármacos, solventes o extractos y un gráfico final de la media de la intensidad para una determinada concentración en función del tiempo. A todo esto se le llamó método de diferencia y suma.

Capítulo IV

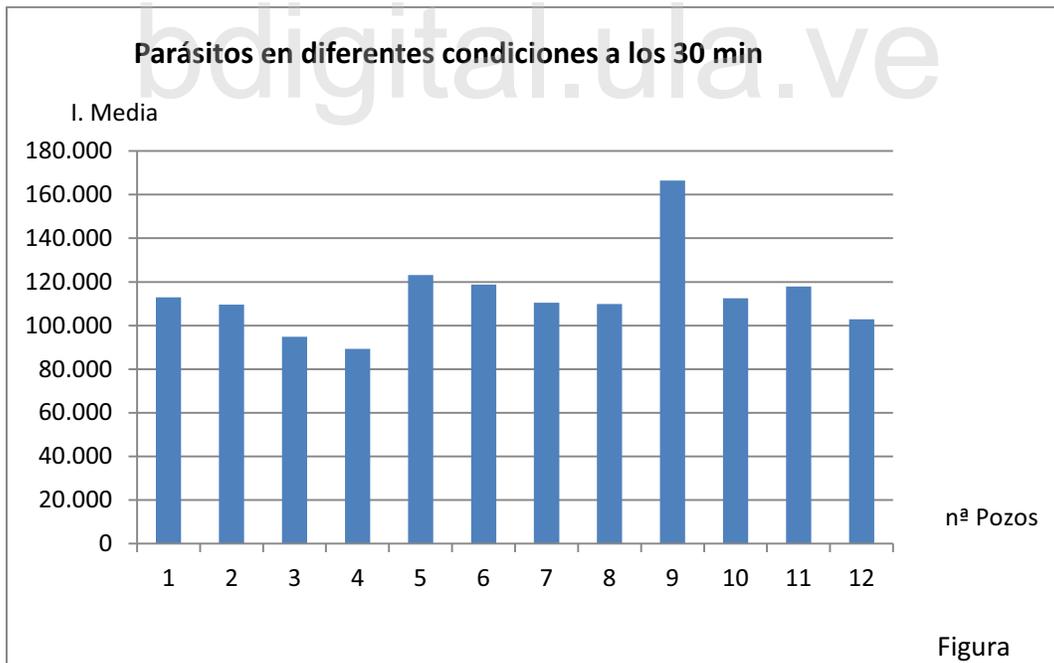
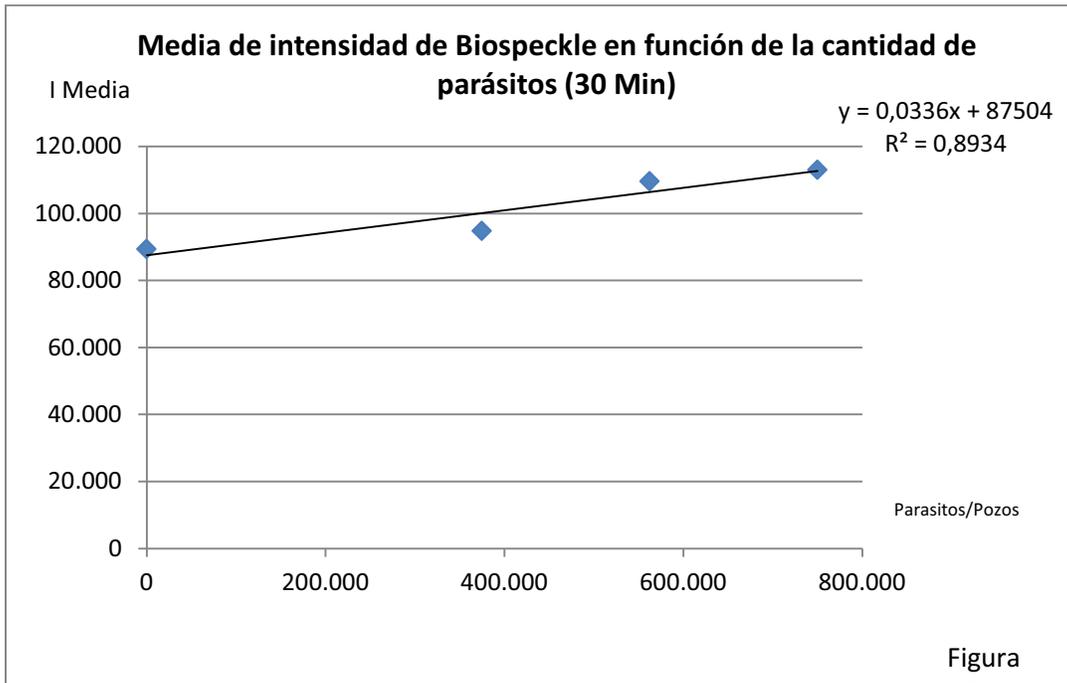
4. Resultados y Discusión

Método de Imagen de Diferencias Acumuladas de Base Variable:

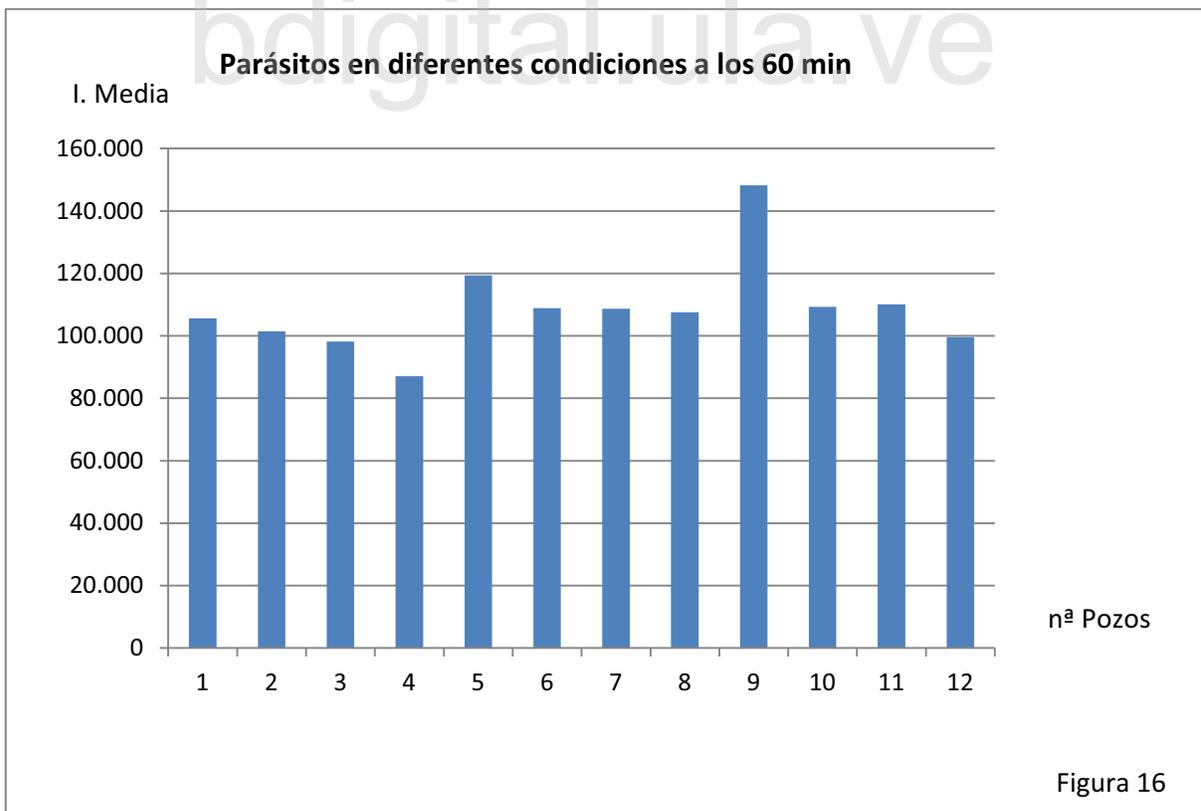
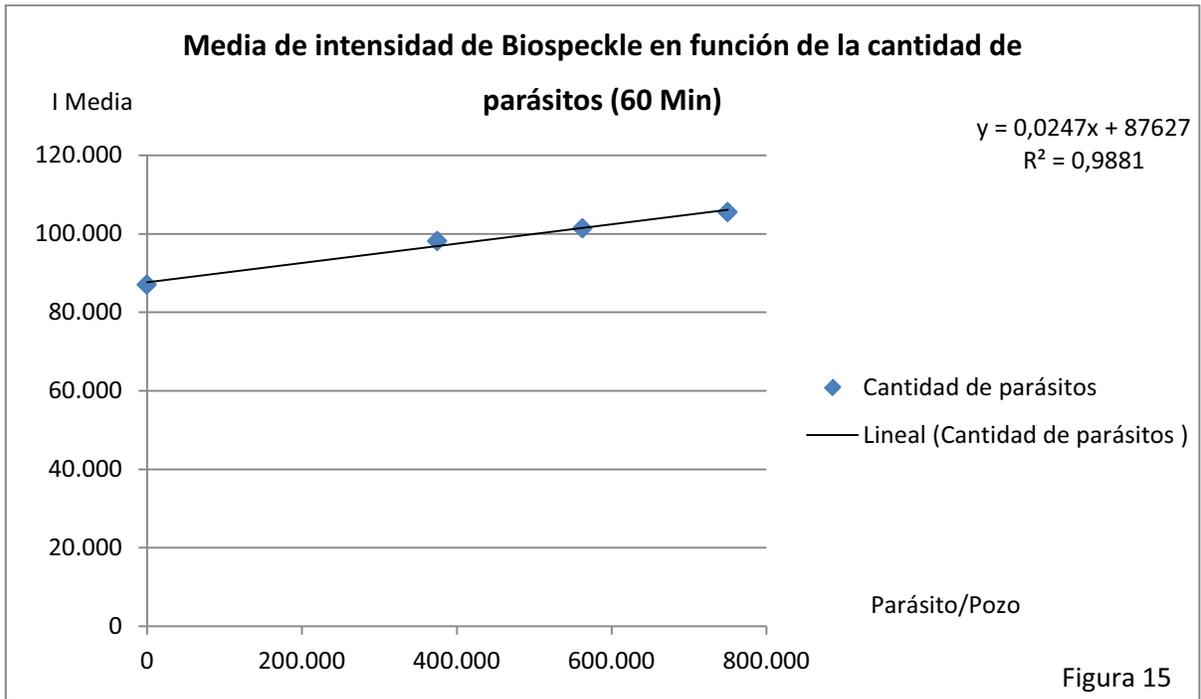
Tiempo 0 (0 Minutos)



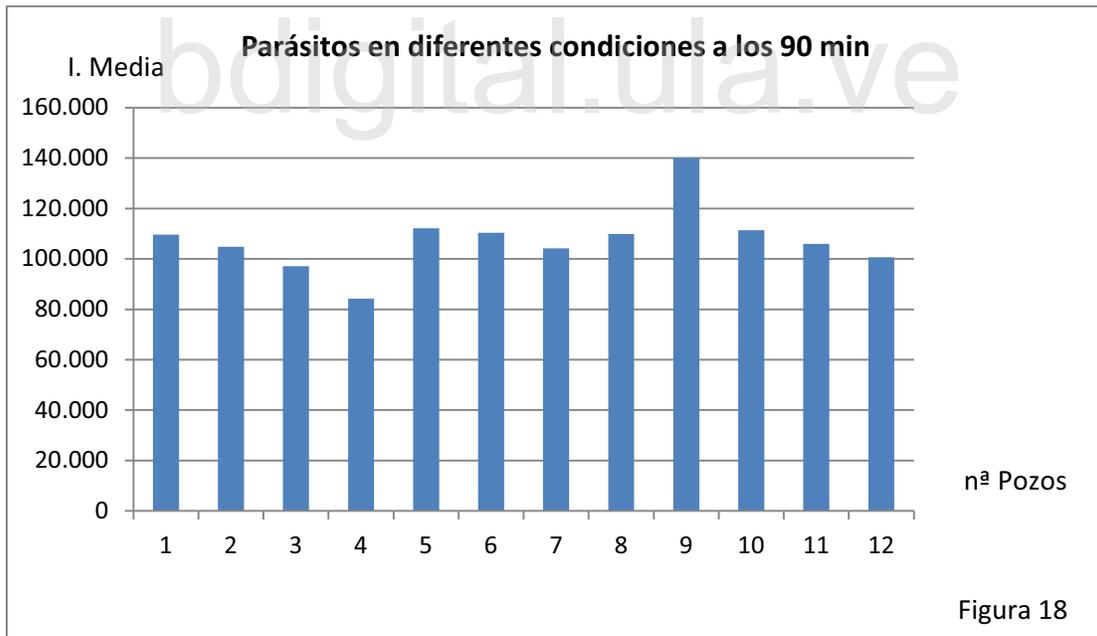
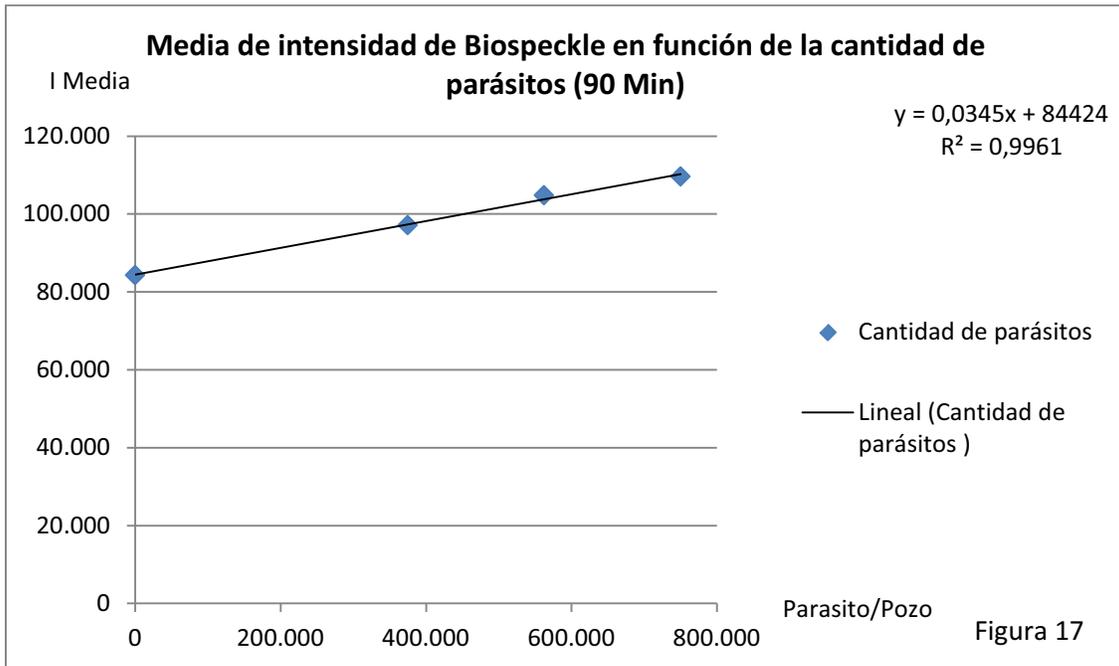
Tiempo 1 (30 Minutos)



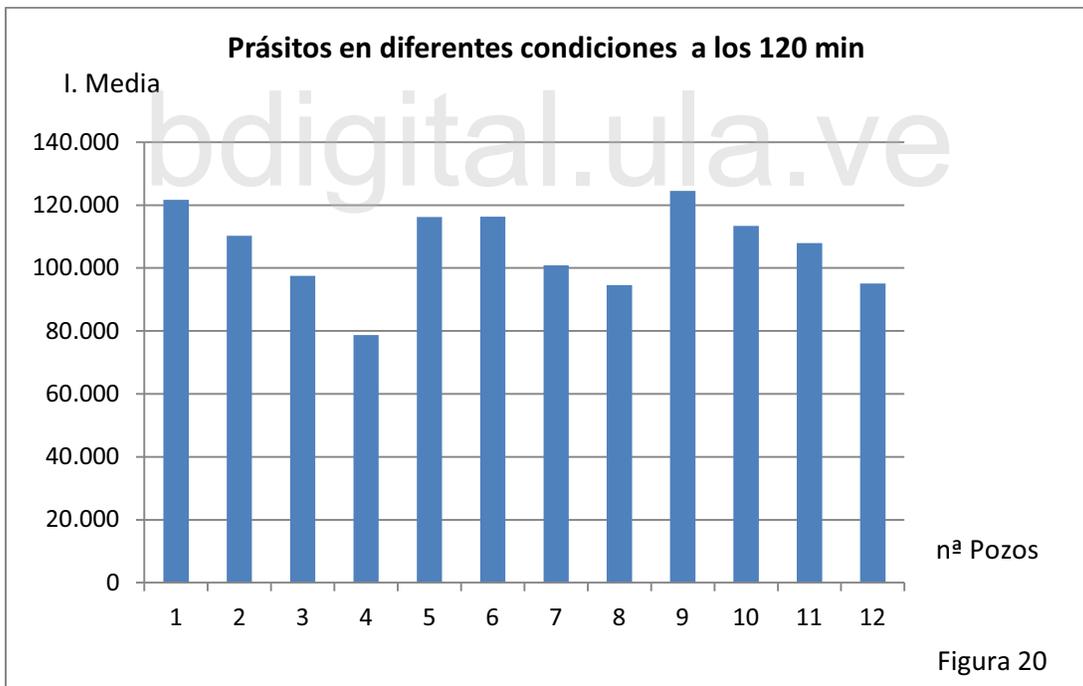
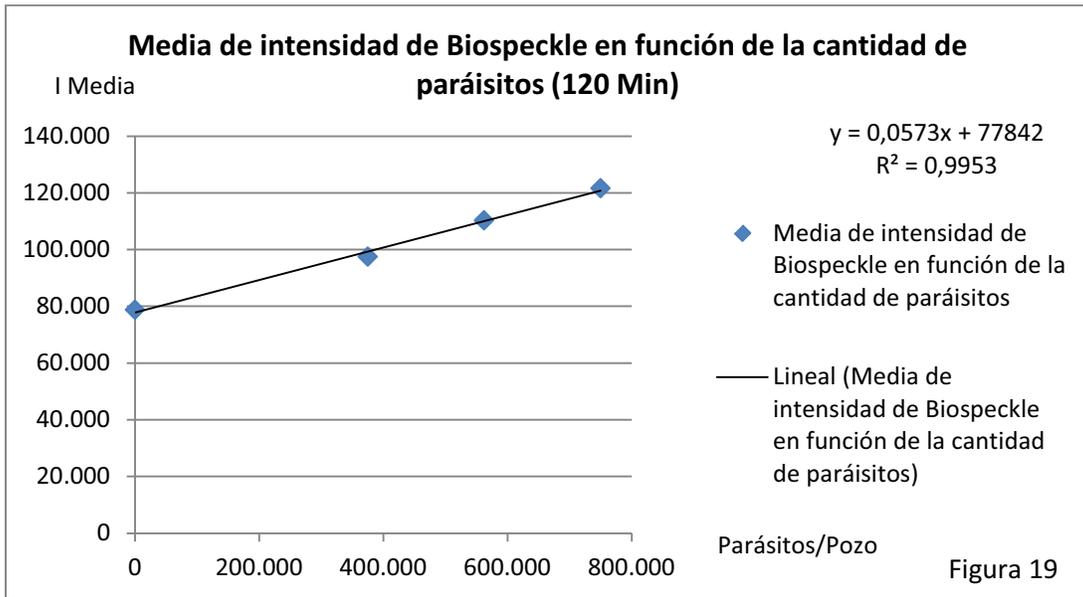
Tiempo 2 (60 Minutos)



Tiempo 3 (90 Minutos)



Tiempo 4 (120 Minutos)



En este método de Imagen de Diferencias Acumuladas de Base Variable, para obtener la media de intensidad de Biospeckle (Intensidad media vs cantidad de parásitos), en las Figs. (11, 13,15, 17 y 19) se observó una proporcionalidad en todos los tiempos en que se realizó el experimento, observándose una tendencia lineal con un coeficiente de determinación aceptable ya que en todos los casos se encuentra por encima de 0,80.

Por otra parte, en los gráficos del parásito en diferentes condiciones (Intensidad media vs número de pozos en los gráficos de barra) se observó:

4.2.1 Figura 12 (Tiempo 0)

Los valores de la intensidad media obtenidos con la Dipirona (pozo 5) y el Dimetilsulfóxido (pozo 6) resultaron encontrarse entre el control del pozo 7 y el control del pozo 1. La intensidad media de los pozos 8 (EDTA), 10 (*Randia* Etanol), 11 (*Extracto* 1992) y 12 (Celebrex) resultaron ser menores que la del pozo control, mientras que el 9 (*Randia* Cloroformo), resultó mayor. El orden de Intensidad media en este último caso es el $12 < 10 < 11 < 8 < 9$.

4.2.2 Figura 14 (Tiempo 1- 30 Minutos)

Aquí de nuevo el Celebrex (pozo 12) resultó el más potente junto con el EDTA (pozo 8). Dipirona y Dimetilsulfóxido dan entre los dos controles y los extractos de plantas son similares al control del pozo 7, encontrándose en el siguiente orden: $10 < 11 < 6 < 5 < 9$. La secuencia 11, 10 y 9 (extracto 1992, *Randia* etanol y *Randia* cloroformo, respectivamente) se repite en el mismo orden como en el tiempo cero y la muestra 9 da un valor superior a los dos controles.

4.2.3 Figura 16 (Tiempo 2 – 60 Minutos)

El Celebrex (pozo 12) nuevamente es el más potente al igual que el EDTA (pozo 8), manteniéndose de manera similar los otros cinco tratamientos. De nuevo el orden de intensidad media de los extractos de plantas es $10 < 11 < 9$ siendo este último superior a los controles.

4.2.4 Figura 18 (Tiempo 3 – 90 Minutos) y figura 20 (Tiempo 4 – 120 Minutos)

En estos dos casos el resultado sigue siendo igual que en los dos anteriores tiempos, es decir, el Celebrex (pozo 12) sigue siendo el más potente junto con el EDTA (pozo 8), la intensidad media de los pozos 5, 6, 10 y 11 siguen encontrándose entre el control (pozo 7) y el control del pozo 1, el pozo 9 superior a los controles y el orden de los extractos de las plantas sigue siendo el mismo.

En síntesis, se observa un efecto de disminución de la intensidad media ocasionado por la presencia de Celebrex y de EDTA. *Randia* en extracto clorofórmico, produce un aumento en la intensidad media, lo cual genera un efecto interesante que explicamos a continuación.

El método que se representa con la IDABV, refleja la velocidad de movimiento de esos parásitos en el pozo. Es por ello que, aunque en algunos casos el resultado es el mismo por ambos métodos, se puede explicar el aumento en el valor de la muestra 9 medida por IDABV, como un aumento en el movimiento de los parásitos ocasionado por el compuesto añadido que es *Randia* en extracto clorofórmico.

Para detallar a fondo el efecto de estos compuestos, se examinó la intensidad media de Biospeckle, en función del tiempo. A continuación se muestra (Figura 21) el comportamiento de los parásitos a diferentes concentraciones. Se puede observar una familia de curvas con tendencias similares, y con coeficientes de determinación aceptables. En la (Figura 22) se muestran las curvas de la intensidad media en función del tiempo de parásitos que se encuentran en presencia de Celebrex (muestra 12) y de EDTA (muestra 8). Se puede observar que ambos compuestos tienen un efecto que induce una curva contraria a la de los parásitos solos, con una tendencia a disminuir la intensidad media en función del tiempo.

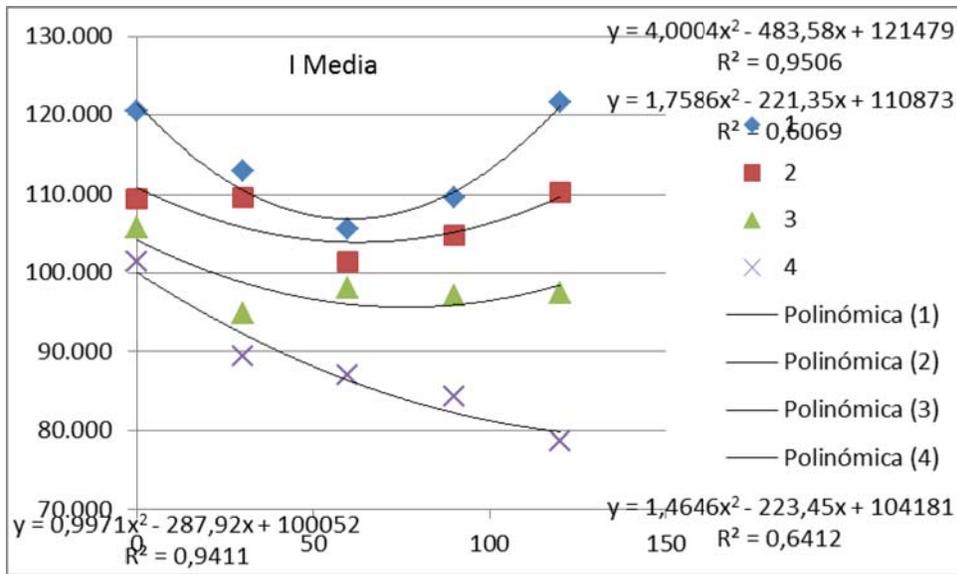


Figura 21

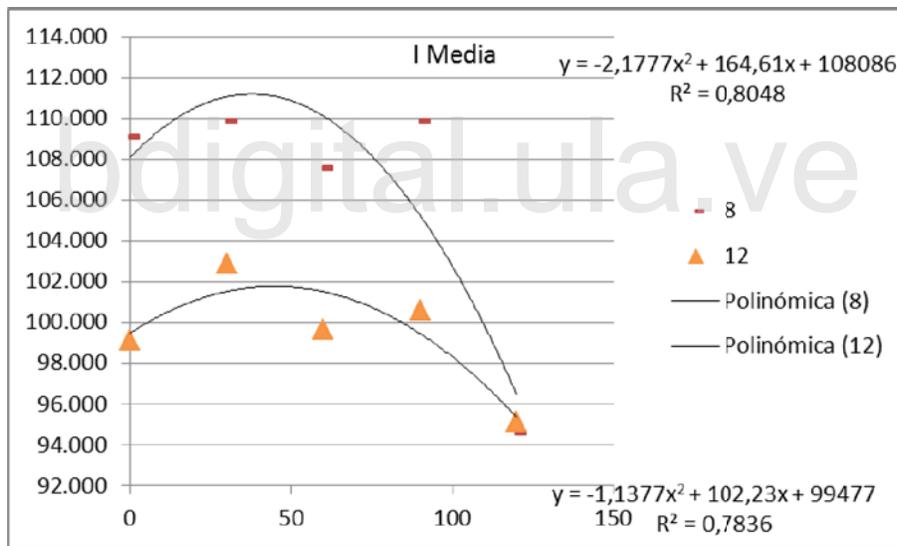


Figura 22

Capítulo V

5. Conclusiones

En general comparando todos estos resultados observamos que el Dimetilsulfóxido es un buen disolvente de los extractos en estos ensayos, porque su presencia no disminuye la actividad de los parásitos procesada por este método. En este sentido debemos destacar que la Dipirona tiene una actividad medida como intensidad media mayor que el Dimetilsulfóxido, mayor que el control y mayor que cualquiera de los otros ensayos. La Dipirona ha sido evaluada *in vitro* (Ramírez-Parra 2000, Lobo 2011), *in vivo* (Ramírez-Parra 2000, Lobo 2011) y en pacientes humanos (Agelvis 2004) en un Ensayo Clínico 1. En los experimentos *in vitro* resultó efectivo contra los parásitos *T. cruzi* en 24 horas, dando una disminución de la parasitemia en ratones en un mínimo de un mes y fue efectivo en mejorar la condición de los pacientes humanos infectados en un tiempo mínimo de 8 meses. El hecho de que sea tan poco efectivo en los resultados presentados en este trabajo, en un plazo máximo de 2 horas, nos indica que posiblemente la acción de la Dipirona requiera un procesamiento metabólico o la internalización de la droga en algún compartimento específico.

El Celebrex y el EDTA resultaron ser los más activos en cuanto a la disminución de la intensidad media. El Celebrex, cuyo ingrediente activo es Celecoxib, es un inhibidor selectivo de la Cicloxigenasa 2 (COX 2), droga anti inflamatoria, no esteroideal. Quintero (2013) determinó que esta droga era un potente inhibidor del crecimiento de *T. cruzi*. En este sentido nuestro resultado confirma ese hallazgo además de demostrar que su efecto comienza en un tiempo inferior a dos horas. El EDTA es un conocido quelante de cationes divalentes, tales como el calcio (Fuenmayor 2000). Los resultados de esta autora y de Colantuoni (1993) han demostrado la presencia de una Calcio proteína específica en este parásito, que es importante en la función motriz del flagelo, lo cual imprime un movimiento oscilante y muy dinámico a *T. cruzi*, esta actividad es dependiente de la enzima Calcio-ATPasa asociada al cuerpo basal del flagelo donde funciona como una

propela. En nuestro caso los resultados con el EDTA están confirmando esos hallazgos además del tiempo corto para el comienzo del efecto.

El método de diferencia y suma evalúa la movilidad y el estado cinético del parásito. Se pueden explicar los resultados con los extractos de *Randia* en Cloroformo (pozo 9), *Randia* en Etanol (pozo 10) y Extracto 1992 (pozo 11), en el sentido de que en el método de diferencia y suma, el resultado es que la actividad de 10 < 11 (Extracto *Randia* Etanol < Extracto 1992), lo cual indicaría que el Extracto *Randia* Etanol afecta más la movilidad y el Extracto 1992 afecta más la densidad ó la forma de los parásitos. En el método utilizado, el Extracto de *Randia* Cloroformo (pozo 9), la Intensidad media es mayor que el 10 y el 11, indicando que el solvente elegido para la extracción es relevante para el resultado.

Finalmente, se observa que la evaluación del efecto en función del tiempo, pone de manifiesto y de una manera cuantitativa, el efecto objeto de este estudio, indicando que se ha cumplido con los objetivos planteados.

bdigital.ula.ve

Referencias Bibliográficas

Abche, S. (2015). El antibiograma realizado por la técnica de Biospeckle. Tesis de Maestría para obtener el título de *Magister Scientae* en Química de Medicamentos, Facultad de Farmacia y Bioanálisis, Universidad de Los Andes, Mérida, Venezuela. Tutor Prof. Cristina Grassi.

Agelvis, G. (2004). Ensayo clínico sobre la actividad de la dipirona en pacientes chagásicos (Resultados Preliminares). Tesis de postgrado clínica de medicamentos sección de biotecnología. Facultad de farmacia Universidad de los Andes (ULA). Realizado bajo la tutoria de la prof Cristina Grassi.

Aramburu, M. Díaz, M. (2007). Ministerio de economía y producción secretaria de industria, comercio y de la pequeña y mediana empresa. Pp 50.

Belandria, O. (2011). *Evaluación comparativa del de la quimiotaxis y el antioibiograma con el método "biospeckle" sobre bacterias.* Tesis de Maestría para obtener el título de Magister Scientae en Química de Medicamentos, Facultad de Farmacia y Bioanálisis, Universidad de Los Andes, Mérida, Venezuela.

Briceño, M. Ángel, A. (2013). *Detección de la presencia de bacterias por Biospeckle: Métodos de atenuación del láser.* Tesis de Pregrado para obtener el título de Licenciado en Bioanálisis, Facultad de Farmacia y Bioanálisis, Universidad de Los Andes, Mérida, Venezuela.

Cianci, M. Guevara, S. Gosella, P. Melillo, F. Ponce, P. (2014). Speckle Dinámico. Pp 3.

Colantuoni G. (1993). Análisis de un Antígeno de la Forma Epimastigote de *T. cruzi* ausente en *T. rangeli*. Tesis para obtener el título de Licenciado en Biología, Facultad de Ciencias, ULA. Tutor: Prof. Efrén Andrades.

Díaz, K. y Gallego, K. (2013) *Utilización del sistema dinámico "biospeckle" para medir el efecto de ciprofloxacina sobre Escherichia coli cepa 322 K-12.* Tesis de

Pregrado para obtener el título de Licenciado en Bioanálisis, Facultad de Farmacia y Bioanálisis, Universidad de Los Andes, Mérida, Venezuela.

Draiger, M.(2009) . Review of laser speckle contrast techniques for visualizing tissue perfusión. Pp 639-651.

Fuenmayor-Meza A. (2000). *Determinación del Comportamiento de la Actividad Ca-Proteína y de la Actividad Cisteino Proteasa de Diferentes Aislados en Trypanosoma cruzi y Trypanosoma rangeli Cultivados en Tres Medios Distintos.* Tesis de Maestría para obtener el título de *Magister Scientae* en Química de Medicamentos, Facultad de Farmacia y Bioanálisis, Universidad de Los Andes, Mérida, Venezuela. Tutor Prof. Efrén Andrades.

García, L. (2011). *Evaluación comparativa del ensayo de fármacos desenergizantes sobre Trypanosoma cruzi usado "biospeckle" y otras técnicas de bioensayo.* Tesis de Maestría para obtener el título de *Magister Scientae* en Química de Medicamentos, Facultad de Farmacia y Bioanálisis, Universidad de Los Andes, Mérida, Venezuela.

Guía de especialidades farmacéuticas Spilva (2012). XXXIII edición. Caracas.

Lanis, E. Basombrio, M. Bojarski, R. Matthews, C. Montero, M. Rabal, H. Romero, G. (1991). Tucuman. Vol 3. Pp 459.

Lobo M.L, García L., Grassi H.C, Andrades E., Cabrera H., Martí, L. (2009). Resultados no publicados.

Lobo. M.L. (2011). Estrategias para evaluar la actividad biológica de fármacos comerciales sobre *Trypanosoma cruzi*. Tesis de maestría de postgrado en química de medicamentos de la facultad de farmacia y bioanálisis, ULA. Tutor: Cristina Grassi.

Méndez, R. (2015). Procesamiento de Imágenes de Biospeckle. Tesis de Maestría para obtener el título de *Magister Scientae* en Química de Medicamentos, Facultad

de Farmacia y Bioanálisis, Universidad de Los Andes, Mérida, Venezuela. Tutor Prof. Cristina Grassi.

Murray, P. Rosenthal, K. Pfaller, M. (). Microbiología médica. 5ta Edición. Editorial ELSEVIER. España. Pp 2.

Padilla, N. (1998). Bioensayos para evaluar la toxicidad de organismos biosensores de productos naturales. Tesis 5º año de la escuela de Bioanálisis.

Quintero, R. (2013). Medicamentos inhibidores de ciclooxigenasa y *Trypanosoma cruzi* COX1. Trabajo de pregrado. Facultad de Farmacia y Bioanálisis. Tutora: Cristina Grassi.

Rabal, H. (2009). Speckle láser y mapas autoorganizados para la identificación de golpes no visibles en manzanas. Buenos Aires, Argentina. Pp 38-43.

Ramírez-Parra, M.Y. (2000). Diseño de ensayos in vitro e in vivo para evaluar la actividad de productos naturales y sintéticos anti *Trypanosoma cruzi*. Tesis de pre grado del Dpto. de Biología, Facultad de Ciencias. ULA. Tutor HC. Grassi. 2000.

Romero, H. (2005). Parasitología y enfermedades parasitarias de animales domésticos. Editorial LIMUSA. México. Pp 753.

Van Hooft, K. (2004). Análisis de la crianza pecuaria familiar en latinoamerica con estudio de casos en los valles y en el altiplano de Bolivia. La Paz Bolivia. Pp 456.

Vargas Q, Y. (1999). *Trypanosoma cruzi* como blanco de bioensayo para evaluar la toxicidad de productos naturales y sintéticos. Trabajo especial de grado. Facultad de Farmacia y Bioanálisis. Tutora: H. Cristina Grassi. Pp 33-34.

Vianna, G. (1911). Contribuicao para o estudo da anatomia patológica da “Molestia de Carlos Chagas” memorias do instituto Oswaldo Cruz. Pp 276-293.