

**CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS AVANZADOS
DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**

UNIDAD MONTERREY

*“Estudio de la motilidad en la inactivación fotodinámica de
Trypanosoma cruzi”*

Tesis que presenta:

Bryant Martínez Tena

**para obtener el grado de Maestro en Ciencias en
Ingeniería y Física Biomédicas**

Directores:

Dra. Hilda Josefina Mercado Uribe

Dr. Daniel Paulo Sánchez Herrera

AGRADECIMIENTOS

No hace falta dar un argumento para agradecer de manera oportuna al Consejo Nacional de Humanidades, Ciencias Y Tecnologías (CONAHCyT) por la beca otorgada durante mi estancia y aprendizaje en la maestría.

Agradezco infinitamente a mis padres Javier y Delia, por haber apoyado cada decisión que he tomado en mi vida y por aconsejarme en cada una de ellas. Todo es gracias a ustedes.

Agradezco a mis hermanos Kevin y Edgar, que a pesar de la distancia nos animamos para siempre seguir adelante.

Quisiera agradecer de igual manera a mis tutores, la Dra. Hilda Mercado y el Dr. Daniel Sánchez por su apoyo, confianza y disponibilidad para que, de manera conjunta llevar a cabo este proyecto.

A mis sinodales, el Dr. Carlos Ruíz y el Dr. Rafael Guzmán por su apoyo y retroalimentación en las cuestiones teóricas y prácticas en la interpretación de los resultados experimentales, préstamo de equipos, así como entendimiento del arreglo experimental utilizado.

A mi compañero de laboratorio Daniel Ortega, por haber sido clave en mis primeros pasos experimentales, así como su amistad brindada y apoyo incondicional. Por haber hecho mi estancia en la maestría más amena.

A Alejandra Nicolás, por su paciencia, apoyo y recomendaciones que con sus conocimientos sobre microbiología pude avanzar en las primeras instancias experimentales.

A Mireya Márquez, por ser mi gran amiga y compañera desde que empezamos nuestros cursos de física de radiaciones y desde siempre sacarme una sonrisa. Por haber sido mi gran apoyo, por retroalimentar mi aprendizaje y por siempre animarme a seguir adelante.

Agradezco a mis compañeros de generación Olivia, Erick, Daniel, Hernán, Jesús y Luz por haber dado su animosidad y por los aprendizajes tanto académicos como morales que recibí de cada uno de ellos.

RESUMEN

En el presente trabajo, se realizaron experimentos usando un método alternativo para la erradicación de patógenos, conocido como Inactivación Fotodinámica (PDI por sus siglas en inglés). La PDI fue utilizada conjuntamente con luz verde y Rosa de Bengala (RB) en cultivos de *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*). Este parásito es el causante de la enfermedad de Chagas, endémica de México y Latinoamérica y que provoca serias consecuencias en la población que la padece. El efecto de la PDI, cuya esencia fundamental es la generación de especies reactivas de oxígeno, fue evaluado a través de cambios en la motilidad del parásito, estudiado en su forma replicativa (epimastigote). Se utilizó este tratamiento en la cepa CL Brener de *T. cruzi*. El *T. cruzi* posee un flagelo que se encarga de proveer su movimiento en el medio acuoso en el que se encuentra suspendido. A través de la evaluación de un factor de correlación, fue posible analizar el efecto del método en cuestión, usando para ello diferentes concentraciones del fotosensibilizador RB, así como diferentes tiempos de irradiación, bajo el uso de herramientas biológicas, ópticas, electrónicas y computacionales.

Nuestro trabajo se centra en proponer una forma alterna de eliminación del parásito *T. cruzi*, que puede explorarse más a fondo en futuros trabajos.

ABSTRACT

In the present work, experiments were performed using an alternative method for the eradication of pathogens, known as Photodynamic Inactivation (PDI). PDI was used together with green light and Rose Bengal (RB) in *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*) cultures. This parasite is the cause of Chagas disease, endemic to Mexico and Latin America and which causes serious consequences in the population that suffers from it. The effect of the PDI, whose fundamental essence is the generation of reactive oxygen species (ROS), was evaluated through changes in the motility of the parasite, studied in its replicative form (epimastigote). This treatment was obtained in the strain CL Brener of *T. cruzi*. *T. cruzi* has a flagellum that is responsible for providing its movement in the aqueous medium in which it is suspended. Through the evaluation of a correlation factor, it was possible to analyze the effect of the method in question, using different concentrations of the RB photosensitizer, as well as different irradiation times, using biological, optical, electronic, and computational tools.

Our work is focused on proposing an alternative way of eliminating the *T. cruzi* parasite, which can be further explored in future work.

ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS.....	2
RESUMEN	3
ABSTRACT	4
Índice de figuras	7
1. INTRODUCCIÓN.....	9
1.2. Fundamentos teóricos	9
1.2.1. Generalidades de <i>Trypanosoma cruzi</i>	9
1.2.2. La enfermedad de Chagas	10
1.2.3. Diagnóstico.....	11
1.2.4. Tratamiento.....	12
1.2.5. Fases morfológicas del <i>Trypanosoma cruzi</i>	13
1.2.6. Modo de infección por <i>T. cruzi</i>	15
1.2.7. Estructura celular de <i>T. cruzi</i>	16
1.2.8. Función flagelar de <i>T. cruzi</i>	17
1.3. El epimastigote	18
1.4.2. Ley de Lambert-Beer	21
1.4.3. Terapia fotodinámica	21
1.5. Rosa de Bengala	25
1.6. Planteamiento del problema	26
1.7. Hipótesis.....	27
1.8. Objetivos	27
1.8.1. Objetivo general.....	27
1.8.2. Objetivos específicos.....	27
2. MATERIALES Y MÉTODOS.....	29
2.1. Preparación del fotosensibilizador en medio líquido	29
2.2. Preparación del medio de cultivo de <i>Trypanosoma cruzi</i>	29
2.2.1. Protocolo de cultivo de <i>Trypanosoma cruzi</i>	30
2.3. Curva de crecimiento de <i>Trypanosoma cruzi</i>	30
2.4. Medición de motilidad de <i>T. cruzi</i>	31
2.4.1. Fotoinactivación de la cepa CL Brener	33
2.4.2. Procesamiento de imágenes	34
2.5. Suspensión de la RB en epimastigotes.....	35

2.6. Pruebas de viabilidad de epimastigotes post-PDI.....	35
2.7. Análisis estadístico	36
3. RESULTADOS	38
3.1. Cinética de crecimiento de CL Brener	38
3.2. PDI a 26 μM :	40
3.3. PDI a 130 μM :	43
3.4. PDI a 260 μM :	46
3.5. Pruebas de viabilidad	49
4. DISCUSIÓN.....	52
5. CONCLUSIONES	55
PERSPECTIVAS	56
REFERENCIAS.....	57

Índice de figuras

<i>Figura 1: Trypanosoma cruzi: algoritmo de detección inmunológico y molecular.</i>	12
<i>Figura 2: Fases morfológicas de T. cruzi</i>	14
<i>Figura 3: Ciclo de vida de T. cruzi</i>	16
<i>Figura 4. Epimastigote de T. cruzi.</i>	20
<i>Figura 5: Ley de Lambert-Beer</i>	21
<i>Figura 6: Aplicaciones de la inactivación fotodinámica.</i>	22
<i>Figura 7: Diagrama de Jablonski.</i>	24
<i>Figura 8: Consecuencias de combinar luz con fotosensibilizador.</i>	25
<i>Figura 9: Rosa de bengala como fotosensibilizador.</i>	26
<i>Figura 10: Fotografía y esquema de la cámara de Neubauer.</i>	31
<i>Figura 11: Representación esquemática del arreglo experimental para estudiar la motilidad de parásitos T. cruzi.</i>	32
<i>Figura 12: Arreglo optoelectrónico para la PDI de CL Brener.</i>	33
<i>Figura 13: Análisis de procesamiento de imágenes de los parásitos.</i>	35
<i>Figura 14: Cinética de crecimiento parasitaria en medio LIT.</i>	38
<i>Figura 15: Cinética de crecimiento parasitaria para las distintas concentraciones de RB.</i>	39
<i>Figura 16: Evolución temporal del factor de correlación para parásitos fotoinactivados por 6 horas con luz verde y 26 μM de RB.</i>	41
<i>Figura 17: Coeficiente de correlación respecto al tiempo de parásitos suspendidos a 26 μM de RB y sometidos a iluminación con luz verde.</i>	41
<i>Figura 18: Seguimiento de motilidad de epimastigotes a 26 μM de RB.</i>	43
<i>Figura 19: Evolución temporal del factor de correlación para parásitos fotoinactivados por 5 horas con luz verde y 130 μM de RB.</i>	44
<i>Figura 20: Coeficiente de correlación respecto al tiempo de parásitos suspendidos a 130 μM de RB y sometidos a iluminación con luz verde.</i>	45
<i>Figura 21: Seguimiento de motilidad de epimastigotes a 130 μM de RB.</i>	46
<i>Figura 22: Evolución temporal del factor de correlación para parásitos fotoinactivados por 3.5 horas con luz verde y 260 μM de RB.</i>	47
<i>Figura 23: Coeficiente de correlación respecto al tiempo de parásitos suspendidos a 260 μM de RB y sometidos a iluminación con luz verde.</i>	48
<i>Figura 24: Seguimiento de motilidad de epimastigotes a 260 μM de RB.</i>	49
<i>Figura 25: Parásitos en su medio nutritivo y RB a 260 μM antes de ser sometidos a PDI y los efectos de PDI en la morfología parasitaria a 260 μM de RB.</i>	50
<i>Figura 26: Efectos de PDI en el tiempo para 26,130 y 260 μM de RB.</i>	52

1

Introducción

1. INTRODUCCIÓN

Trypanosoma cruzi (*T. cruzi*) es un protozoo hemoflagelado perteneciente al orden de los Kinetoplastida y es un agente causante de la enfermedad de Chagas (descubierta por Carlos Ribeiro Justiniano Chagas, médico e investigador brasileño en el año 1909). Esta enfermedad es fatal, debilitante e incurable que afecta entre dieciséis y dieciocho millones de personas en todo el mundo. En 2021 la Organización Mundial de la Salud (OMS) estimó que hay más de 80 millones de personas en riesgo de infección, donde la mayor concentración de contagios se encuentra en América Latina y el sur de Estados Unidos de América (WHO, 2021). Este parásito presenta un ciclo de vida complejo y bifásico, moviéndose entre huéspedes invertebrados y vertebrados, en los que se pueden identificar tres formas de desarrollo alternativas: epimastigotes, tripomastigotes metacíclicos y del torrente sanguíneo, así como amastigotes (WHO, 2021), (de Souza, de Carvalho Tecia, & Santos Barrias, 2010).

1.2. Fundamentos teóricos

1.2.1. Generalidades de *Trypanosoma cruzi*

El modo de transmisión de *T. cruzi* a los seres humanos y otros mamíferos es principalmente por las heces y/o la orina de insectos triatominos (vía vectorial), que se alimentan de la sangre hospedera. Estos insectos hematófagos son conocidos como vinchucas o chinches (besuconas) que habitan las grietas y huecos de paredes y tejados de casas y estructuras exteriores, como gallineros, corrales y almacenes, en zonas rurales y suburbanas. El principal vector en México es conocido como *Triatoma Barberi*. Las chinches en general pican en zonas expuestas de la piel y defecan u orinan cerca del sitio de picadura. Los parásitos se introducen al organismo comúnmente a través de autoinoculación cuando la persona picada se frota y empuja las heces o la orina hacia la picadura, o alguna lesión cutánea abierta. Hay otros modos de transmisión, aunque menos probable como el contacto con alimentos contaminados, transfusiones de sangre, transmisión de madre embarazada infectada (transmisión congénita), por trasplante de órganos e incluso por accidentes de laboratorio (Ramsey, et. al.,2015).

1.2.2. La enfermedad de Chagas

1.2.2.1. Fase aguda

Esta fase tiene una duración aproximada de 4 a 8 semanas después de contraer la infección. En este periodo, *T. cruzi* circula a través del torrente sanguíneo, aunque no son muy presentes los síntomas de la infección. Menos de la mitad de la gente que recibe una picazón de la chinche percibe una lesión cutánea o una hinchazón amoratada de un párpado (si el piquete fue en esa zona). Los síntomas comunes pueden ser fiebre, dolor de cabeza, agrandamiento de ganglios linfáticos, palidez, malestar muscular, conflicto para respirar, hinchazón y dolor abdominal o torácico.

1.2.2.2. Fase crónica

En esta fase, los parásitos permanecen escondidos principalmente en el músculo cardíaco y digestivo. Aproximadamente 3 de cada 10 personas infectadas sufren trastornos cardíacos y hasta 1 de cada 10 presentan alteraciones digestivas (típicamente, ensanchamiento del esófago o del colon), neurológicas o mixtas. Como la mayor parte de los casos en fase aguda se encuentran en estado asintomático, solo entre el 30 – 40% de las personas infectadas logran presentar síntomas durante la fase crónica. La enfermedad de Chagas crónica se asocia con la destrucción inflamatoria progresiva del corazón, los músculos, los nervios y el tejido del tracto gastrointestinal (GI). Del 7 al 10% de los pacientes desarrollan síndromes severos que involucran el tracto GI, en particular, el esófago y el colon (Tanowitz, *et. al.* 1992), (Kirchhoff, Votava, Ochs, & Moser, 1996). Estos síndromes se combinan con alteraciones de la motilidad gastrointestinal en pacientes con enfermedad de Chagas (Madrid & Defilippi, 2006). Con el paso del tiempo, la infección podría causar muerte súbita por alteraciones cardíacas progresivas a consecuencia de la destrucción del músculo cardíaco y sus inervaciones. Aproximadamente 30% de los infectados crónicos fallecen a causa de esta enfermedad (Teixeira, Nascimento, & Sturm, 2006), (De Souza, *et. al.*, 2010).

En caso de contraer la COVID-19, los pacientes infectados con tripanosomiasis americana presentan riesgo de padecer miocarditis. La enfermedad de Chagas crónica, con frecuencia produce estados protrombóticos, alteraciones cardíacas y accidentes cerebrovasculares trombóticos secundarios (WHO, 2021).

1.2.3. Diagnóstico

Las técnicas de diagnóstico empleadas varían según la etapa en la que se encuentre el paciente. Por ejemplo, en la fase aguda, se caracteriza por un contenido elevado cuantitativo de parásitos en la sangre (parasitemia elevada) detectada por medios parasitológicos directos (podría ser observación por microscopía directa). En la fase crónica, la parasitemia disminuye y es difícilmente detectable. Se cuenta con una elevada producción de anticuerpos específicos de tipo inmunoglobulinas (IgG anti-*T. cruzi*) que son detectadas por pruebas serológicas (Kirchhoff, Votava, Ochs, & Moser, 1996).

El xenodiagnóstico y el hemocultivo (disponibles solo en laboratorios especializados) son los métodos de diagnóstico más comunes, y se practican cuando existe un alto grado de parasitemia del paciente. Otra opción para la detección de *T. cruzi* es la inoculación en ratones, aunque este método se emplea principalmente en investigación. También se puede hacer la detección de ADN a través de pruebas tipo PCR, que puede demorar más que por la observación directa (Kirchhoff, Votava, Ochs, & Moser, 1996).

La técnica de diagnóstico serológico en laboratorio más utilizada es la ELISA (*Enzyme Linked Immunoabsorbent Assay*). Hay varios antígenos que pueden ser útiles para esta técnica, así como extractos crudos del parásito de proteínas recombinantes y/o péptidos sintéticos en test comerciales, de donde se encontraron altos valores de especificidad y sensibilidad para *T. cruzi* con respecto a la técnica por PCR, que presenta variabilidad en los pruebas dando lugar a falsos positivos durante la fase crónica (Murcia, Carrilero, Saura, Iborra, & Segovia, 2013), (Lozano, 2016). En la figura 1 se muestra un algoritmo de seropositividad de *T. cruzi* bien definido que nos dicta el modo de detección del mal de Chagas dado por la OMS, quienes recomiendan el resultado de al menos dos ensayos serológicos positivos diferentes para obtener datos más precisos y exactos. Todas las muestras seropositivas se deben examinar más a fondo mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en busca de ADN del parásito en el momento de una donación y/o análisis sanguíneo (Lozano, 2016).

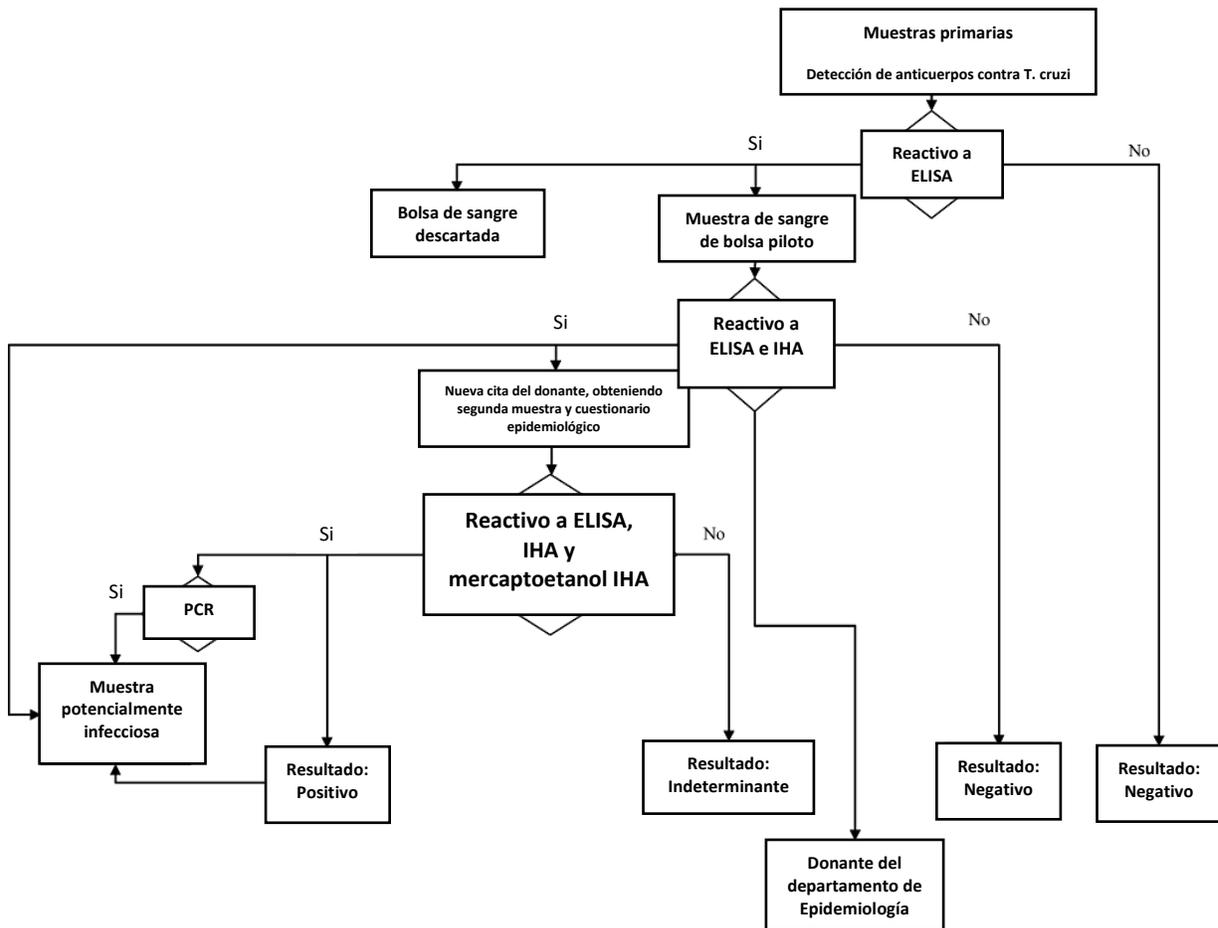


Figura 1: *Trypanosoma cruzi*: algoritmo de detección inmunológico y molecular. Se muestran los pasos que sigue la salud pública mexicana desde el 2004 para las pruebas de seropositividad a trypanosomiasis americana. Imagen modificada de “*Trypanosoma cruzi*: seroprevalence detected in the blood bank of the Instituto Nacional de Pediatría, Mexico City, in the period 2004 through 2009” de Escamilla-Guerrero y colaboradores (Salazar, et. al., 2006), (Escamilla-Guerrero, et. al., 2011).

1.2.4. Tratamiento

El tratamiento actual para la enfermedad de Chagas se basa en dos derivados nitroheterocíclicos: el nitrofurano nifurtimox (desde 1960) y el 2-nitroimidazol benznidazol. El benznidazol no está disponible en farmacia y debe obtenerse por lo general por medios extranjeros. El tratamiento de benznidazol y nifurtimox devuelven resultados muy positivos si son administrados en la fase aguda de la enfermedad (Murta, Gazzinelli, Zigman, & Romanha, 1998). Por ejemplo, lo recomendado para benznidazol es de 5 a 7 mg/kg/día en 2 o 3 tomas durante 60 días (APT, 1999). Sin embargo, estos

dos medicamentos son menos eficientes a medida que transcurre el tiempo de infección, además, las reacciones adversas son más frecuentes en edades avanzadas, es decir, una vez que la enfermedad ha progresado. No existen fármacos eficaces y el tratamiento tiene como objetivo la reducción de los síntomas. Un síntoma común es la cardiopatía chagásica que se trata de una cardiopatía fibrosante y cursa con afectación predominantemente segmentaria de la contractilidad del corazón (Arrúa Torreani, 2013). Esta cardiopatía se trata con indicaciones terapéuticas de otras miocardiopatías de distinto origen. Los fenómenos trombóticos y embólicos son altamente frecuentes en los pacientes con enfermedad de Chagas, por lo que en algunos casos resulta útil el uso de fármacos antiplaquetarios o anticoagulantes para prevenir estos incidentes.

Una causa común para la suspensión del tratamiento es debido a reacciones adversas, dando lugar hasta a un 40% de los pacientes tratados con benznidazol cuyos efectos secundarios son neuropatía periférica, reacciones cutáneas y granulocitopenia. Aproximadamente el 61% de los pacientes tratados con nifurtimox presentan efectos como el dolor abdominal, anorexia, náusea, vómito y pérdida de peso (Murcia, Carrilero, Saura, Iborra, & Segovia, 2013).

1.2.5. Fases morfológicas del *Trypanosoma cruzi*

T. cruzi tiene un ciclo de vida biológico complejo y tiene varias etapas de desarrollo que se pueden observar en los hospederos vertebrados e invertebrados como se puede visualizar en la figura 2. Los amastigotes (o esferomastigotes) se caracterizan por la presencia de un flagelo corto, que tienen una forma esférica u ovalada como se muestra en la figura 2A, y son la fase de replicación en las células de vertebrados (mamíferos). Es importante señalar que las formas de amastigote también pueden infectar células mediante un mecanismo que depende de actina, y de este modo llevar a cabo su ciclo replicativo intracelular. Se sabe que se ocupan de nueve ciclos de división binaria en el citosol, para que los amastigotes se diferencien en tripomastigotes del torrente sanguíneo y se liberen después de romperse la membrana de la célula huésped (Fernandes & Andrews, 2012), (Dvorak & Hyde, 1973).

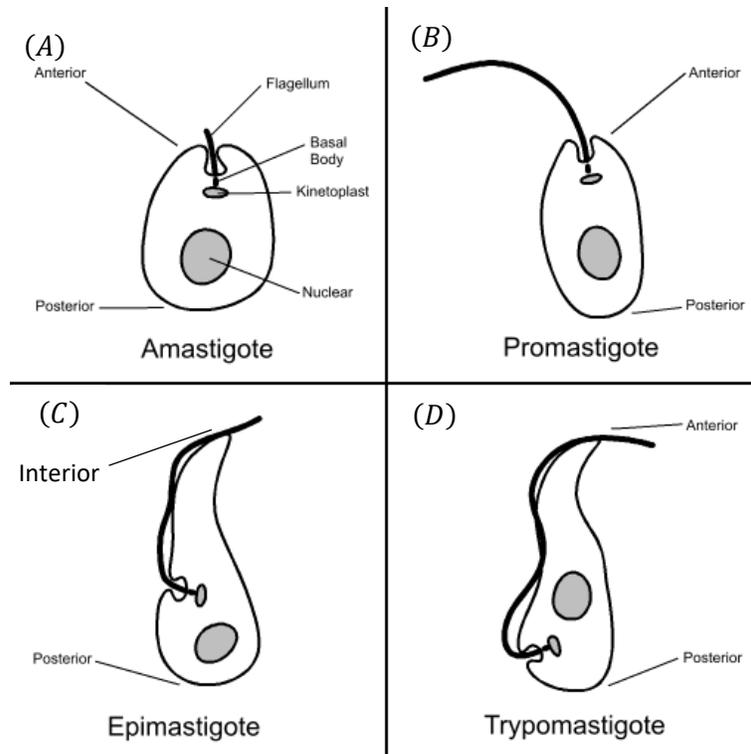


Figura 2: Fases morfológicas de T. cruzi
 Señalamientos cualitativos de las fases (A) amastigote y (C) epimastigote en el vector infector, y (B) promastigote y (D) trypomastigote en el mamífero y morfología del *Trypanosoma cruzi*. Imagen tomada de “Formas celulares de los Trypanosomatida” por Richard Wheeler (Zephyris) 2006.

Los epimastigotes son organismos en forma de huso que miden entre 20 – 40 μm de longitud. Particularmente, hallaremos el cinetoplasto (material filamentoso observado dentro de la mitocondria de los tripanosomátidos) anterior al núcleo como se muestra en la figura 2C. Esta fase es la de replicación de *T. cruzi* en células de invertebrados por lo que se verá reflejado como fase de crecimiento logarítmico (De Souza, 1984). Durante el ciclo de vida normal de los tripanosomátidos, se producen cambios en la posición del cinetoplasto con respecto al núcleo, este cinetoplasto tiene una estructura que aparece como un disco ligeramente cóncavo de 1 μm de longitud y una profundidad de 0.1 μm . En la forma esferomastigota de *T. cruzi*, el cinetoplasto se localiza en la porción anterior de la célula como se muestra en la figura 2B. En la forma tripomastigote se localiza en la región posterior. En ambas situaciones, el cuerpo basal, del que se origina el flagelo, siempre se localiza cerca del cinetoplasto (De Souza, 1984).

Los tripomastigotes tienen un flagelo largo de aproximadamente $25 \mu m$ y un diámetro de alrededor de $2 \mu m$ que emerge del bolsillo flagelar, organelo que junto con el citostoma está involucrado en las vías endocítica y exocítica del parásito. En esta fase, el cinetoplasto se encuentra posterior al núcleo como se muestra en la figura 2D. Estas formas no son capaces de dividirse y se encuentran en la sangre de los mamíferos (De Souza, 1984).

1.2.6. Modo de infección por *T. cruzi*

Una vez que el triatomino (vector) se halla en la superficie (piel) del mamífero y lo logra picar para succionar su sangre, éste defeca sobre el sitio de picadura donde se acarrean los parásitos e invaden hasta llegar al torrente sanguíneo, como se muestra en el punto 1 de la figura 3. En este momento, *T. cruzi* está en su forma de tripomastigote metacíclico. En el punto 2 se muestra que algunos tripomastigotes se transforman en amastigotes. El punto 3 indica que los amastigotes se replican, principalmente en tejidos musculares y nerviosos. Posteriormente, los amastigotes logran romper la célula hospedera y entran al torrente sanguíneo (punto 4). Por otro lado, cuando un triatomino sano ingiere alimentos de un huésped infectado, puede darse el caso que ingiera parásitos en su forma tripomastigote, como se muestra en el punto 5. Luego, al pasar los parásitos por el intestino medio, éstos cambian a su forma de epimastigote (punto 6). Esta es la fase reproductiva en el vector, y se multiplican en el intestino medio (punto 7). Finalmente, los parásitos pasan a su forma infectiva de tripomastigotes metacíclicos (punto 8).

la glicocálix. El grosor de la glicocálix cambia respecto a la fase de *T. cruzi*. La glicocálix tiene un grosor de 15 nm en tripomastigotes sanguíneos y 5 nm en esferomastigotes y epimastigotes. Hay una carga superficial celular más negativa en tripomastigotes sanguíneos respecto a epimastigotes que ha sido determinado mediante movilidad electroforética (EPM, por sus siglas en inglés) de cultivos axénicos con $-0.52 \mu\text{m s}^{-1} \text{V}^{-1} \text{cm}$ para epimastigotes y -1.14 para tripomastigotes sanguíneos o para eritrocitos de $-1.07 \mu\text{m s}^{-1} \text{V}^{-1} \text{cm}$ (De Souza, 2002), dando lugar a una labor más amena para trabajar con tratamientos que también son negativos.

Se ha demostrado por citoquímica ultraestructural que *T. cruzi* no tiene reserva de polisacáridos (se han aislado polisacáridos de epimastigotes donde la galactosa, glucosa, manosa, xilosa y glucosamina fueron halladas como componentes del polisacárido). El producto de reacción, indicativo de la presencia de carbohidratos, se asoció principalmente con la membrana plasmática del protozoario, aunque se observó una ligera reacción en las membranas intracelulares que forman el aparato de Golgi, el retículo endoplásmico y algunas vesículas citoplasmáticas (Meyer & De Souza, 1976). Por tanto, los datos bioquímicos de glicoproteínas o polisacáridos de *T. cruzi* pueden considerarse asociados a membranas celulares. Hay más técnicas para el análisis de glicoproteínas asociadas a la superficie celular, esto es, mediante el uso de procedimientos de marcaje enzimático.

1.2.8. Función flagelar de *T. cruzi*

Todos los miembros de la familia *Trypanosomatidae* tienen un flagelo que emerge de una invaginación llamada bolsillo flagelar. En etapas de desarrollo como promastigote, paramastigote, opistomastigote y choanomastigote, el flagelo emerge en la punta anterior, mientras que en las formas epimastigote y tripomastigote emerge en algún lugar a lo largo del costado.

En los tripanosomátidos, la longitud del flagelo varía según su etapa de desarrollo. Por ejemplo, los esferomastigotes de *T. cruzi* tienen un flagelo corto, de 1 μm de longitud (está casi completamente ubicado dentro de la bolsa flagelar). Sin embargo, al final del ciclo intracelular el parásito se alarga y el flagelo también crece hasta unos 20 μm (Meyer & Xavier, 2009), iniciando un proceso de diferenciación a formas epi- y tripomastigotes; durante el cual se produce una elongación del cuerpo y del flagelo. Todos los tripanosomátidos presentan una región conocida como bolsa flagelar que se presenta como una depresión que se encuentra en la región anterior de la célula de donde emerge el flagelo.

Al igual que otras células flageladas, el flagelo de los tripanosomátidos impulsa al parásito mediante la acción de su oscilador mecanoquímico, que genera fuerzas móviles a través del modelo de filamento deslizante mediante un proceso dependiente de ATP, donde la curvatura se inicia en la base del flagelo y la onda se propaga desde la base hasta la punta y la célula es impulsada por el flagelo (Satir, 1968).

Por microscopía electrónica y criofractura se ha podido visualizar en la base del flagelo, un agregado de partículas irregulares. Tal estructura ha sido designada como collar ciliar y posiblemente esté involucrada en el control de la motilidad flagelar (Ballesteros-Rodea, Santillán-Zerón, Martínez-Calvillo, & Manning-Cela, 2012).

En muchas situaciones se ha informado que estos parásitos tocan la superficie de la célula huésped primero con el flagelo y luego inician el proceso de entrada.

1.3. El epimastigote

Esta fase morfológica está compuesta por las siguientes características como se muestra en la figura 4:

- Flagelo: es un organelo en forma de látigo que permite el movimiento del protozoario.
- Citostoma: comúnmente tratado como la boca celular (“cyto” = célula, “stoma” = boca). Es una abertura por donde entran las partículas alimenticias a la célula. Se encuentra en *T. cruzi* ya que cuenta con membrana resistente especializada para la fagocitosis.
- Microtúbulo subpericilar: es una sola capa de microtúbulos que subyace a la membrana plasmática. Los microtúbulos están reticulados entre sí por fibrillas regularmente espaciadas.
- Aparato de Golgi: es un orgánulo celular que asesora en el procesamiento y empaquetamiento de proteínas y moléculas de lípidos, especialmente proteínas cuyo fin son extracelulares.
- Acidocalcisoma: cuenta con varias funciones tales como la homeostasis del calcio, el mantenimiento del pH intracelular para el parásito y la regulación osmótica.
- Citofaringe: es un pasaje en forma de tubo. Sirve como una garganta por donde pasa la comida celular. Conduce desde el citostoma, que sirve como boca.

- **Retículo endoplasmático:** estructura dinámica que cumple funciones en la célula como la síntesis de proteínas, almacenamiento de calcio y el metabolismo de los lípidos.
- **Núcleo:** es el orgánulo encerrado en una membrana dentro de una célula que contiene los cromosomas.
- **Mitocondria:** este orgánulo suministra la mayor parte de la energía necesaria para la actividad celular mediante la respiración celular, es decir, actúa como central energética de la célula, por lo que sintetiza ATP.
- **Glicosoma:** Es un orgánulo encerrado en una membrana que contiene las enzimas glucolíticas. La función principal de los glucosomas en las células es la glucólisis.
- **Cinetoplasto:** Un cinetoplasto es una red de ADN circular (llamado ADNk) dentro de una gran mitocondria que contiene muchas copias del genoma mitocondrial.
- **Corpúsculo basal:** es una estructura que se presenta en la base de las extremidades móviles de *T. cruzi*. El corpúsculo sirve como punto de agregación para que los microtúbulos continúen su crecimiento y ordenamiento.
- **Bolsillo flagelar:** es una pequeña invaginación de la membrana plasmática donde el flagelo sale del citoplasma y participa en muchos procesos celulares. Es el único sitio de exocitosis y endocitosis y parte de un complejo multiorgánico que está involucrado en la polaridad y la división celulares (Carrington & Field, 2009).
- **Axonema:** es la principal parte extracelular del flagelo. Consiste en un citoesqueleto de microtúbulos, que normalmente consta de nueve dobletes.
- **Complejo contráctil vacuolar:** es un orgánulo osmorregulador unido a la membrana de *T. cruzi* que separa el exceso de agua citosólica que fue adquirida osmóticamente, expulsándola extracelularmente, con el objetivo de mantener la osmolaridad citosólica constante bajo una condición osmótica dada.

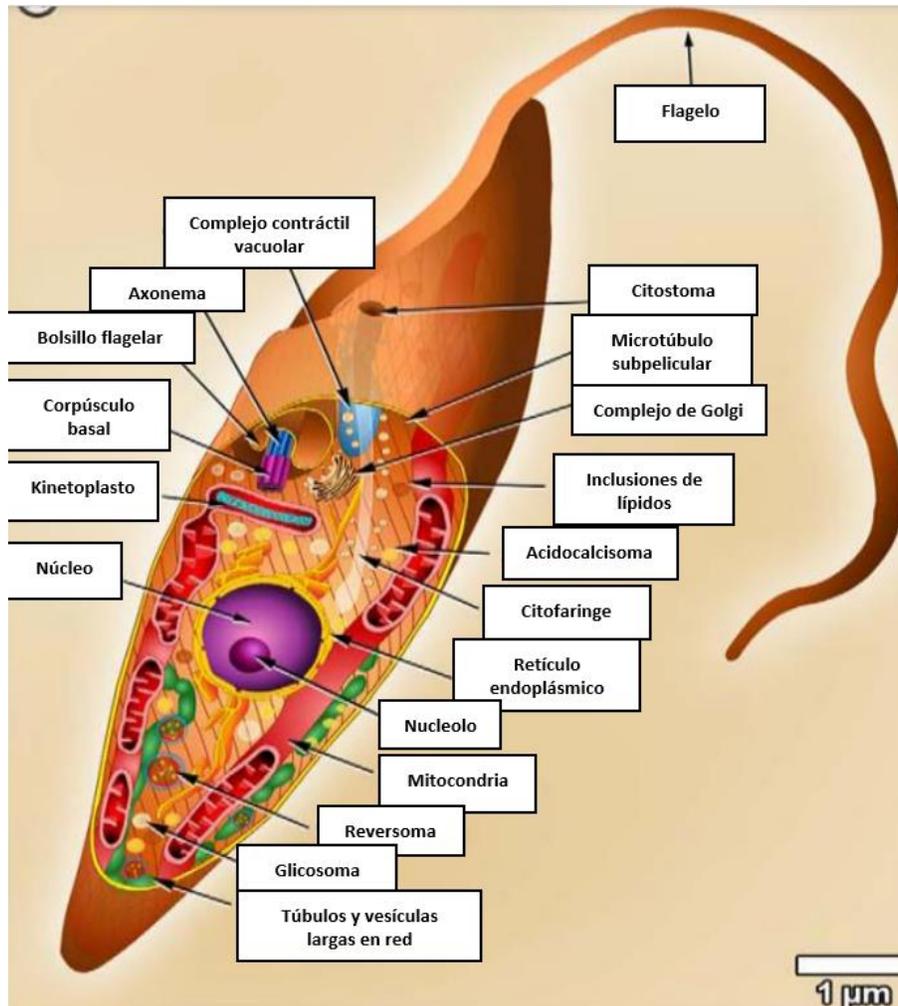


Figura 4. Epimastigote de *T. cruzi*. Se detallan los organelos del epimastigote y se muestran las dimensiones a escala de sus tamaños. Imagen tomada del portal <https://chagas.fiocruz.br/en/parasite/structural-organization/>.

En un estudio (Collison, *et. al.*, 2012), se analizó la motilidad y el batido flagelar de los epimastigotes de *Trypanosoma cruzi*. Se capturaron imágenes de epimastigotes nadando libremente mediante microscopía de video, y se realizó un análisis cuantitativo de la distancia recorrida por epimastigotes individuales. La trayectoria temporal de cada parásito se descompuso en distancia, velocidad y ángulo de rotación para facilitar un análisis vectorial cuantitativo más detallado, y también se realizó un análisis de toda la población.

1.4.2. Ley de Lambert-Beer

Para determinar la eficiencia de absorción de cualquier material, se hace uso de la ley de Lambert-Beer que cuantifica la absorción de luz.

Suponiendo que se tiene un contenedor con sección transversal conocida ℓ y en él se deposita un material o solución conocida cuya concentración es C como en la figura 5. Se hace incidir en el contenedor un haz de luz de longitud de onda λ , y se puede calcular cuál es la capacidad de esta solución de absorber la intensidad de luz I_0 , que se absorbe y resulta con I , a esta longitud de onda bajo las condiciones dadas usando la ecuación:

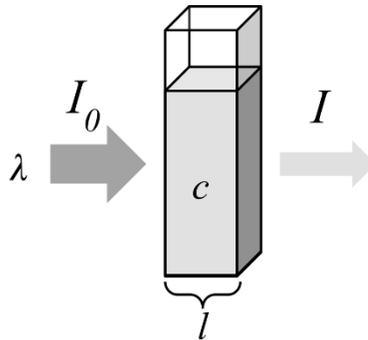


Figura 5: Ley de Lambert-Beer

Esquema de un cuvette de ancho ℓ donde se hace incidir un haz de luz con intensidad I_0 , a una longitud de onda λ y a una concentración C . Tras atravesar el ancho ℓ , el haz de luz se atenúa a una intensidad I . Figura tomada del portal de imamagnets en internet.

$$A = \varepsilon(\lambda)C\ell = \log \frac{I_0}{I}, \quad (1)$$

donde ε es el coeficiente de extinción molar que nos indica la susceptibilidad del medio de absorber luz de longitud de onda dada λ . Las unidades usualmente empleadas en este análisis son ℓ (cm), λ (nm), C (mol/L) y ε ($L/mol \cdot cm$) (Wypych, 2020).

1.4.3. Terapia fotodinámica

La Inactivación Fotodinámica (PDI, por sus siglas en inglés), es un método en el que se irradia con luz visible, UV o infrarroja, una cepa patógena, excitando moléculas sensibles a esas longitudes de onda. Como consecuencia, se activan especies reactivas de oxígeno (ROS, por sus siglas en inglés)

en el medio, para poder eliminar los microorganismos patógenos (Mercado Uribe, 2020). En la figura 6 se destacan los microorganismos contra los que se puede aplicar la PDI.

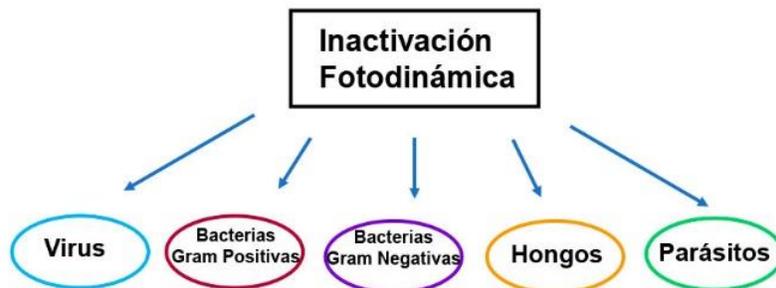


Figura 6: Aplicaciones de la inactivación fotodinámica. Conjunto de aplicaciones de la inactivación fotodinámica a distintos microorganismos. Figura tomada de “Luz visible contra un enemigo invisible” del portal de Avance y Perspectiva (Mercado Uribe, 2020).

En la PDI es necesario utilizar una molécula fotosensibilizadora (PS, por sus siglas en inglés), tener oxígeno molecular en el medio (O_2) y una fuente de luz. Las ROS son moléculas que contienen oxígeno, que son muy inestables y reaccionan fácilmente ya que tienen uno o más electrones desapareados, por lo que buscan su estabilidad interaccionando con el medio “robando” electrones de éste. Un PS es aquella molécula que, al excitarla con la longitud de onda adecuada (a la que presenta mayor absorbancia), puede desencadenar una cascada de reacciones de generación de ROS.

En la PDI sucede que, tras la absorción de luz, el PS es transformado desde su estado base (S_0) a un estado electrónicamente excitado e inestable (estado singlete S_1) con el empuje a uno de sus electrones de valencia a un estado más energético, con una vida media del orden de nanosegundos (10^{-9} s). El PS excitado puede volver a su estado basal mediante un número limitado de formas, una de estas formas puede ser mediante la emisión de luz (fluorescencia), una segunda forma es que el PS irradie calor mediante un proceso conocido como conversión interna (CI), en el tercer modo es en el que el PS puede decaer a otro estado de energía excitado, pero más estable conocido como estado triplete excitado (T_1), a través de un mecanismo conocido como cruce entre sistemas (CS). A partir de aquí el PS que decae de T_1 interaccionando con las moléculas circundantes en dos modos distintos según la Tabla 1 (Mercado Uribe, 2020):

Tabla 1: Decaimiento del estado triplete excitado

Tipo I	Mediante reacciones de oxidación-reducción (redox), es decir, por transferencia de electrones, originando radicales libres como las ROS (siendo los más comunes el anión superóxido (O_2^-), peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y radical hidroxilo ($OH\cdot$)).
Tipo II	Mediada por la transferencia de energía directamente al oxígeno molecular (O_2) del medio (radical libre <i>per se</i>). El O_2 buscará su estabilidad robando electrones a otras moléculas del medio, dando lugar a la formación de oxígeno singlete (1O_2) (con vida media del orden de microsegundos y con un radio de acción de 150 nm). El 1O_2 es altamente reactivo con muchos tipos de biomoléculas como los lípidos de la membrana celular y algunos aminoácidos, entre otros.

Los dos tipos de reacciones (Tipo I y Tipo II) pueden ocurrir simultáneamente y en competición (dependiendo de la concentración de oxígeno en el medio), sin embargo, la formación del oxígeno singlete es el mayor responsable del daño tisular producido durante la PDI. Considerando que el diámetro de un parásito *T. cruzi* es de $\sim 2 - 5 \mu m$, la distancia de reactividad del oxígeno singlete es efectiva para estos tratamientos, dado el radio de acción de la PDI de aproximadamente 150 nm, se logra dañar la membrana celular de manera efectiva.

Existe un tercer modo en que el PS recupera su estabilidad desde el estado T_1 , esto es, mediante la emisión de luz a través de fosforescencia.

El diagrama de Jablonski representado en la Figura 7 resume toda la información de esta sección. Este diagrama ilustra los estados energéticos de la molécula PS. Se muestra (implícitamente) de modo vertical, la energía acumulada en el PS y de acuerdo con el modo horizontal; la multiplicidad del espín.

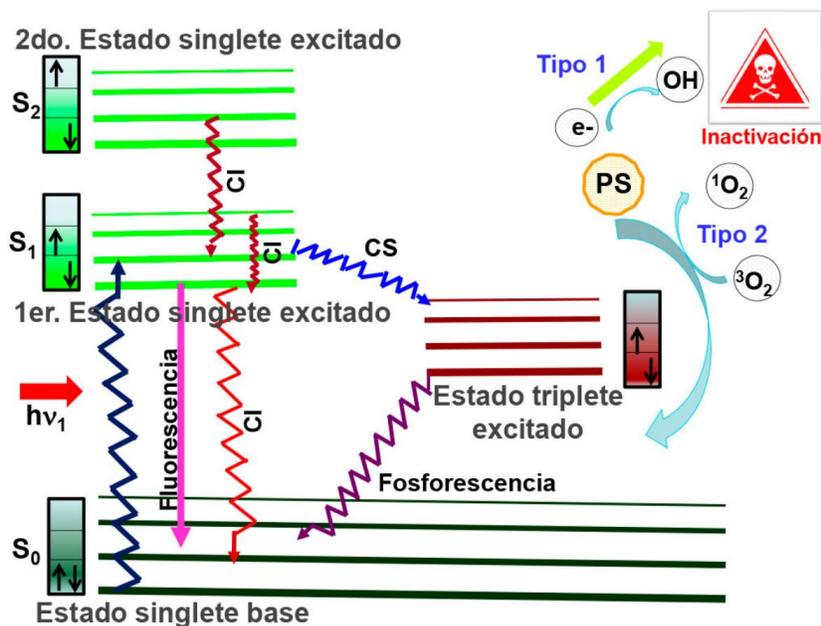


Figura 7: Diagrama de Jablonski.

Se representan las transiciones electrónicas que siguen a la absorción de luz por un fotosensibilizador y la transferencia de energía a una molécula de oxígeno, produciendo oxígeno singlete. Hay una escala de energía vertical implícita en este diagrama, de modo que los niveles de energía electrónicos más altos están por encima de los niveles de energía más bajos. Además, los estados triplete excitados se dibujan a la derecha de los estados singlete, y los estados que involucran oxígeno están a la derecha de los que involucran al fotosensibilizador. Figura tomada de "Luz visible contra un enemigo invisible" del portal de Avance y Perspectiva (Mercado Uribe, 2020).

Después de que el PS regresa a su estado basal, puede volver a activarse y repetir el proceso descrito anteriormente. Sin embargo, el PS también puede ser fotodestruido, proceso denominado como fotoblanqueamiento (PB por sus siglas en inglés). El PB es un mecanismo de interrupción de la reacción fotodinámica. Por otro lado, existe una dosis umbral de terapia fotodinámica para producir muerte en el tejido corporal, si sucede fotoblanqueamiento antes de alcanzar este umbral no ocurrirá este daño (Gilaberte, *et. al.*, 2006).

El oxígeno singlete reacciona rápidamente con muchos agentes biológicos, incluidos ciertos aminoácidos en proteínas, principalmente triptófano, tirosina, histidina, cisteína y metionina. También reacciona con las bases de guanina del ADN y el ARN, así como con una variedad de lípidos insaturados, incluidos el colesterol y los ácidos grasos insaturados. Sin embargo, no se ha reportado que afecte significativamente a los carbohidratos (Figura 8) (Oleinick, 2011).

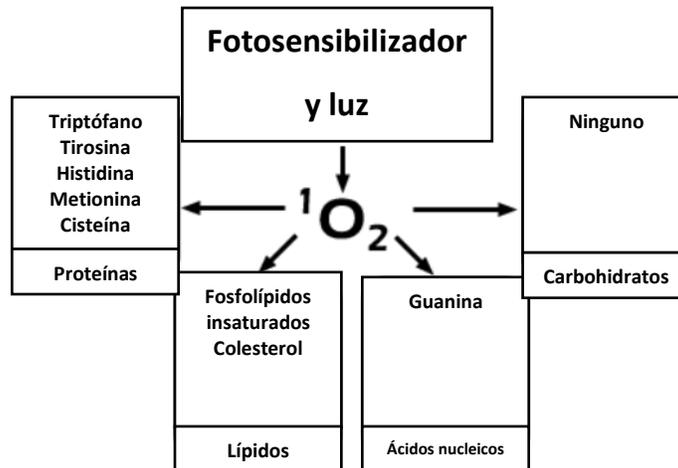


Figura 8: Consecuencias de combinar luz con fotosensibilizador. Esquema que muestra los blancos de la terapia fotodinámica al combinar un fotosensibilizador con luz en presencia de oxígeno molecular. Imagen modificada del portal de Photobiological Sciences Online (Oleinick, 2011).

1.5. Rosa de Bengala

La Rosa de Bengala (RB) es una molécula que pertenece a los compuestos orgánicos llamados xantenos (colorantes) los cuales son solubles en agua a un pH de 7 (Salazar Juárez, 2019). La RB llama nuestro interés por que presenta propiedades fotosensibilizantes, es relativamente inocua y muestra fuerte absorción en el espectro de longitud de onda visible del verde (entre 500 – 550 nm).

En la Figura 9 se representa la estructura molecular de la rosa de bengala y la viabilidad de excitarla con luz visible para acarrear a eventos de producción de ROS y aprovechar estos mecanismos para la PDI en *T. cruzi* (Mulani, Kamble, Kumkar, Tawre, & Pardesi, 2019).

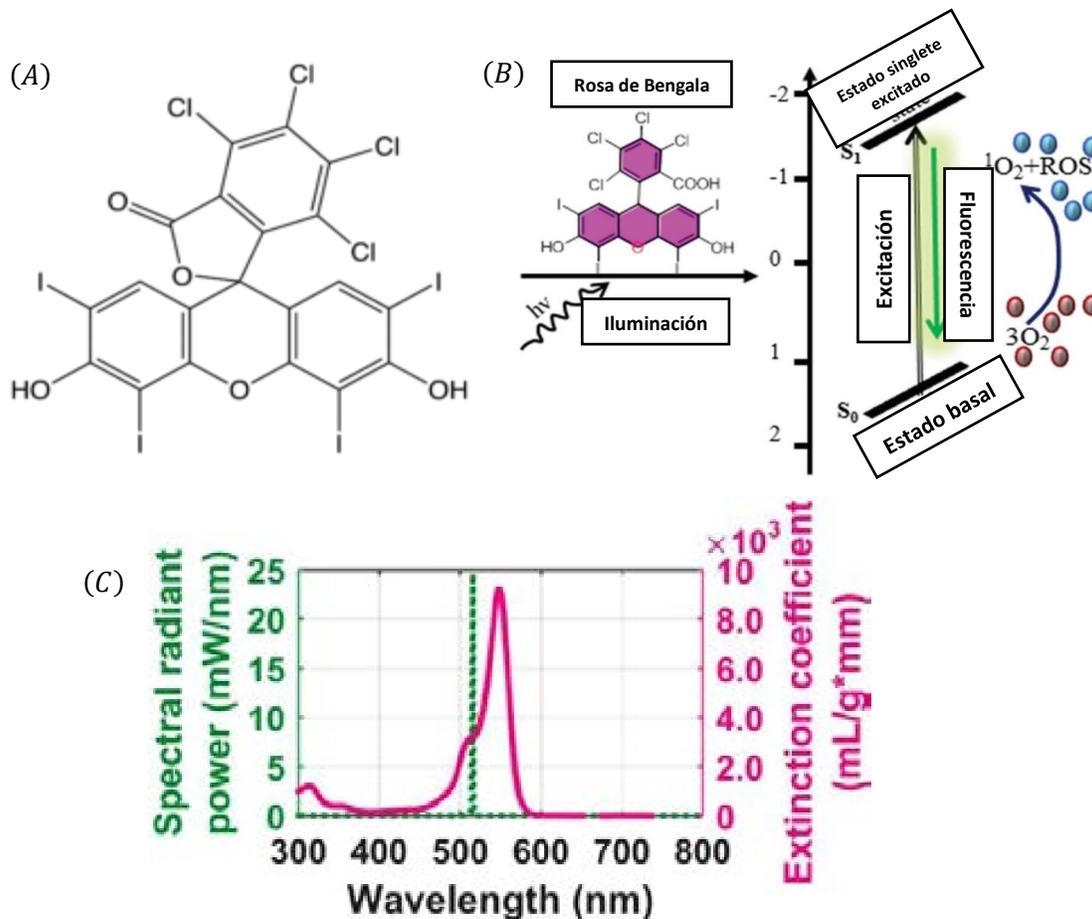


Figura 9: Rosa de bengala como fotosensibilizador.

(A) Estructura molecular de la Rosa de Bengala (RB). (B) Los electrones excitados del fotosensibilizador (RB) generan especies reactivas de oxígeno (ROS). (C) Espectro de absorción de la RB en la curva rosa y su potencia espectral radiante en la curva verde. Imagen modificada de "Engineering of fluorescent or photoactive Trojan probes for detection and eradication of β -Amyloids" de Aziz y colaboradores (Aziz, Siddiqui, & Amtul, 2020).

1.6. Planteamiento del problema

El protozario *T. cruzi* presenta motilidad debido a la funcionalidad de su flagelo, lo cual es esencial para que penetre la célula hospedera, dando lugar a complicaciones de salud en su huésped (De Souza, 2002). La motilidad de *T. cruzi* es requerida para iniciar su proceso contagioso.

De manera natural, el protozoo *T. cruzi* no absorbe luz a la longitud de onda de 532 nm. Por lo que en este trabajo planteamos el uso del método de fotoinactivación para reducir al máximo la motilidad del parásito *T. cruzi* de la cepa CL-Brenner, utilizando la Rosa de Bengala como fotosensibilizador, en combinación con un tratamiento con luz verde.

1.7. Hipótesis

El uso de Rosa de Bengala, como fotosensibilizador en conjunto con luz visible en cultivos de *Trypanosoma cruzi* disminuye su motilidad.

1.8. Objetivos

1.8.1. Objetivo general

Estudiar los cambios en la motilidad del parásito *Trypanosoma cruzi* mediante un factor de correlación, después de haber sido sometido a un proceso fotodinámico con luz visible y Rosa de Bengala.

1.8.2. Objetivos específicos

- Implementar el arreglo experimental para estudiar la motilidad de *T. cruzi*.
- Establecer un protocolo adecuado para la realización de los experimentos con *T. cruzi* (incluyendo los grupos control y experimentales).
- Realizar el cultivo de los parásitos *T. cruzi* en condiciones de laboratorio (28 °C).
- Estudiar el nivel de motilidad de *T. cruzi* en función de la concentración de RB.
- Estudiar los cambios en la motilidad de los parásitos en presencia y ausencia de luz verde mediante un factor de correlación.
- Analizar los resultados de los correlogramas de motilidad.

2

Materiales y métodos

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Preparación del fotosensibilizador en medio líquido

De manera natural, la Rosa de Bengala (RB) (CAS: 632-69-9) se encuentra en polvo y se prepara diluyéndola en una solución salina tamponada con fosfato (PBS, por sus siglas en inglés) (CAS: P4417-50TAB) que se encuentra como pastilla y se adiciona en agua milli-Q para su preparación. Se diluyó la RB en PBS para todas las concentraciones experimentadas con la siguiente ecuación:

$$\text{Molaridad deseada} \left[\frac{\text{mol}}{\text{L}} \right] \times \text{Peso molecular de RB} \left[\frac{\text{g}}{\text{mol}} \right] = \text{RB a diluir en PBS} \left[\frac{\text{g}}{\text{L}} \right], \quad (2)$$

2.2. Preparación del medio de cultivo de *Trypanosoma cruzi*

Es necesario contar con un medio enriquecido con ciertos nutrientes para el crecimiento óptimo de *T. cruzi*. Este medio enriquecido se conoce como *Liver Infusion Tryptose* (LIT) y consta de los siguientes reactivos (para una preparación de 100 mL): 450 mg de Cloruro de Sodio (CAS: 7647-14-5), 40 mg de Cloruro de Potasio (CAS: 7447-40-7), 420 mg de Fosfato Dibásico de Sodio (CAS: 7558-79-4), 200 mg de D-(+)-Glucosa (CAS: 50-99-7), 500 mg de Infusión de hígado (Liver Infusion) y 500 mg de Triptosa (CAS: 70937-500G-F).

Hasta este momento, LIT es un medio libre de suero y sangre que contiene una base de caldo de infusión de hígado, triptosa y glucosa. Una vez que se tienen estos ingredientes vertidos en un recipiente hermético, se procede a suspender con 89 mL de agua desionizada milliQ (18.2 MΩ cm), y enseguida se esteriliza con calor para eliminar micropartículas no deseadas.

Para evitar la contaminación en el medio, se añade antibiótico (penicilina – estreptomina), adicionalmente se agrega también Suero Fetal Bovino (SFB), con las siguientes cantidades: 10 mL de SFB (10% (v/v)), 0.5 mL de Hemina (5 mg/mL) y 1 mL de Antibiótico (10000 U – 10 mg/mL).

Siguiendo este procedimiento, se cuenta con 100 mL de medio LIT para realizar los experimentos con la cepa de parásitos CL Brener.

2.2.1. Protocolo de cultivo de *Trypanosoma cruzi*

Una vez que se cuenta con el medio LIT estéril en el que los parásitos se pueden verter, se toma una pequeña porción de la cepa y se homogeniza con éste para que se lleve a cabo la reproducción y proliferación del parásito.

2.3. Curva de crecimiento de *Trypanosoma cruzi*

Los cultivos inician con 1×10^6 *epimastigotes/mL* en 5 mL de medio enriquecido (medio LIT) y se incuban a 28 °C. El número de parásitos se determinó por conteo directo con una cámara de Neubauer (figura 10A) cada 24 h para determinar el crecimiento de los parásitos. Se hizo conteo en 5 de los 25 cuadrantes en la cámara de Neubauer (como se muestra en rojo en la figura 10B), haciendo un análisis de éstos para cuantificar la reproducción parasitaria pasadas 24 horas, por n días según la siguiente ecuación:

$$\frac{\text{num. promedio de parásitos}}{\text{cuadrante}} \times 25 \text{ cuadrante} \times \frac{\text{parásito}}{0.1 \text{ mm}^3} \times \frac{1000 \text{ mm}^3}{1 \text{ mL}} \left[\frac{\text{parásito}}{\text{mL}} \right], \quad (3)$$

donde el recuento parasitario se promedia y se determina que una vez que se contaron 5 de los 25 cuadrantes determinados (figura 10B). Por otra parte, la profundidad del cristal (para el conteo) está a exactamente 0.1 mm más bajo que las secciones laterales, estableciendo un volumen fijo una vez colocado el cubreobjetos sobre la cámara de Neubauer. El cuadrante intermedio se muestra que tiene dimensiones de 1 mm × 1 mm (cuadro rojo en la figura 10B). Este cuenta con 25 recuadros (de 0.2 × 0.2 mm² cada uno), donde en 5 de ellos se hace el recuento de parásitos.

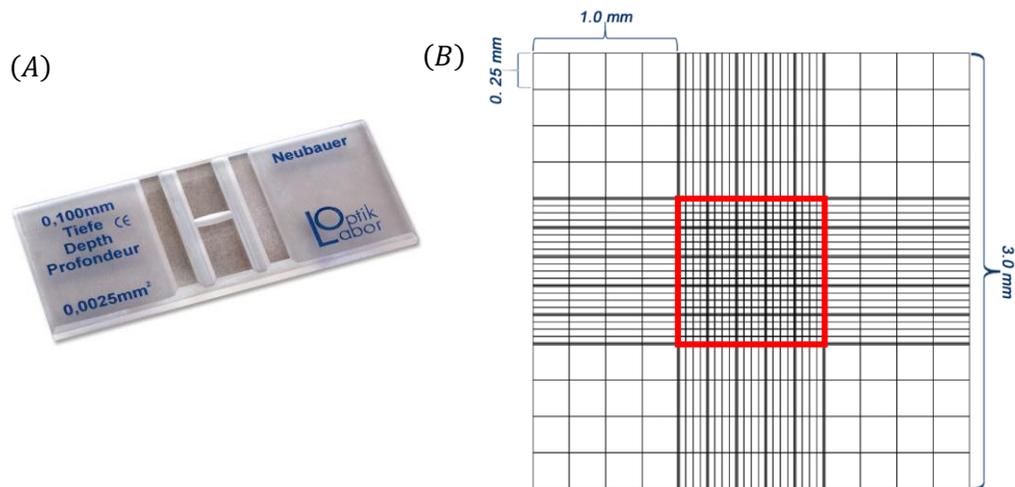
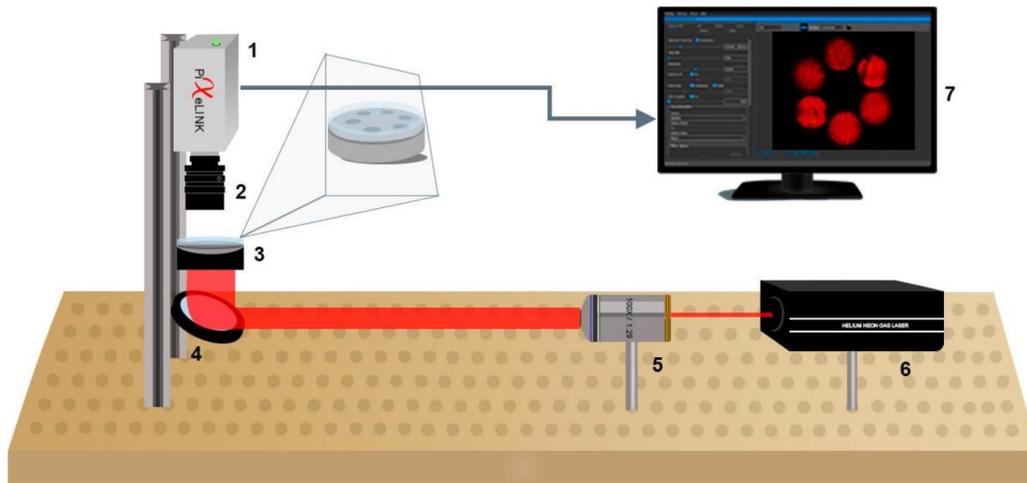


Figura 10: Fotografía y esquema de la cámara de Neubauer. (A) Se muestra una fotografía de una cámara de Neubauer. (B) Se muestra un área encerrada en rojo la que indica el sitio donde se hace el conteo de microorganismos en la cámara de Neubauer (Arnal Barbedo, 2013). Figura de elaboración propia.

2.4. Medición de motilidad de *T. cruzi*.

Para la medición de la motilidad de los parásitos, se implementó un arreglo experimental que cuenta con láser de helio-neón el cual emite un haz de 633 nm (luz roja), a 1 mW de potencia, que se hace incidir en un espejo a través de un objetivo de microscopio $100\times$ (Figura 11). Este accesorio es útil para que incida la luz sobre un espejo que refleja el haz rojo en un portamuestras de acero inoxidable con base de acrílico transparente, el cual cuenta con 6 pozos en los que se colocaron las muestras experimentales y los controles. Mediante una cámara se capturan imágenes en períodos determinados, y con éstas se analiza la motilidad de los epimastigotes, al comparar los cambios de intensidad lumínica en los pozos entre una primera imagen o fotografía de referencia (primer cuadro) y todas las fotografías (cuadros) posteriores que, en conjunto conformaron un vídeo. Este análisis fue posible mediante un coeficiente de correlación temporal C_{ij} que sirve como métrica de similitud entre pares de imágenes, estando siempre normalizada, es decir $C_{ij} \in [0,1]$. Cuando el coeficiente $C_{ij} \rightarrow 0$, implica que no hay similitud entre el par de imágenes comparadas (motilidad máxima); cuando $C_{ij} \rightarrow 1$, se implica que hay un alto grado de similitud en las imágenes comparadas (motilidad nula), y cuando $C_{ij} \in (0,1)$ es que hay valores intermedios de similitud en el par de imágenes comparadas (motilidad parasitaria media).

Las mediciones de la motilidad fueron realizadas antes y después de irradiar las muestras en los pozos. Estas mediciones se hicieron cada segundo por 1.5 minutos, es decir, se tomaron 90 mediciones de motilidad cada vez que se hace la medición de C_{ij} y se hizo un análisis de las primeras 60 fotografías.



*Figura 11: Representación esquemática del arreglo experimental para estudiar la motilidad de parásitos *T. cruzi*.*

1) Cámara Pixelink que se emplea para capturar las imágenes procesadas en RGB al CPU (7). 2) Sitio de ajuste de la cámara Pixelink para enfocar la imagen capturada. 3) Base del portamuestras. 4) Espejo reflector del haz de luz posicionado estratégicamente debajo de la base del portamuestras. 5) Lente de microscopio cuyo aumento es de 100 ×. 6) Láser de gas helio-neón que emite luz de 633 nm al centro de la lente del microscopio. 7) CPU donde se procesan y almacenan las imágenes capturadas en el portal de Pixelink. Figura tomada de “Inactivación fotodinámica en la motilidad de los espermatozoides de ratón” de Santos Aguirre (Santos Aguirre, 2022).

Utilizando este arreglo experimental, se estudió la motilidad de los parásitos *T. cruzi*, formando 3 grupos por cada experimento efectuado:

- 1) El grupo control donde se tuvo parásitos en su medio de crecimiento (medio LIT) sin ningún tratamiento particular (pozo 4).
- 2) Un segundo grupo control donde además de adicionar medio LIT, se aplicó solamente el tratamiento de RB a los parásitos (pozo 2).
- 3) El grupo experimental donde se añadió medio LIT, RB como fotosensibilizador y se aplicó el tratamiento de luz verde en la población parasitaria (pозos 1, 3 y 5).

A partir de las fotografías (video) obtenidas, se realizó el análisis cuantitativo de la motilidad de los parásitos mediante un factor de correlación C_{ij} .

2.4.1. Fotoinactivación de la cepa CL Brener

Para llevar a cabo la inactivación fotodinámica se usó un láser que emite luz verde a una longitud de onda de 532 nm , para irradiar la cepa de *T. cruzi*, y posteriormente estudiar la motilidad de ésta. Se usó una fibra óptica por la cual se le hizo incidir el haz de luz verde como se muestra en la figura 12. Todos los experimentos fueron realizados con una $n = 3$.

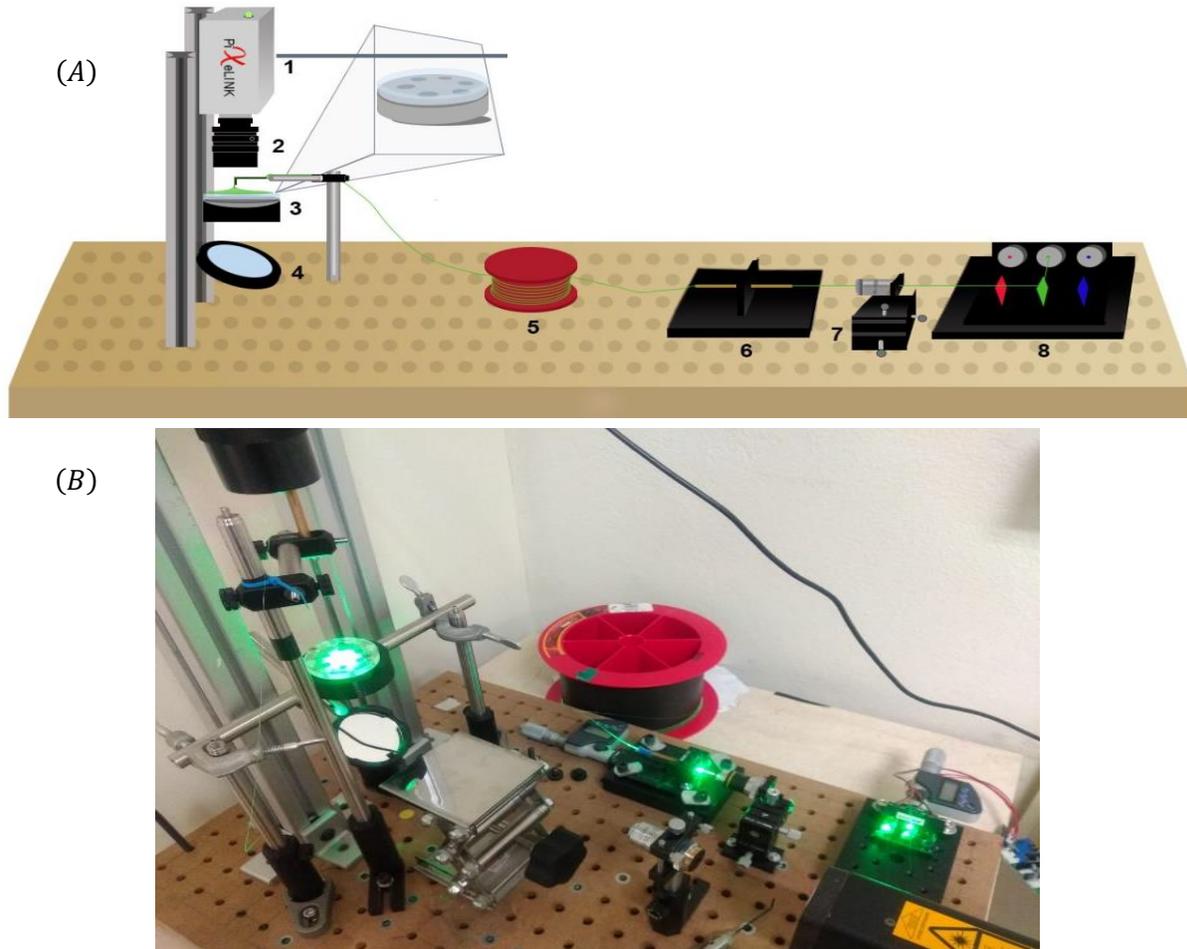


Figura 12: Arreglo optoelectrónico para la PDI de CL Brener.

(A) 1) Cámara Pixelink que se emplea para capturar las imágenes procesadas en RGB al CPU de escritorio (7). 2) Sitio de ajuste de la cámara Pixelink para enfocar la imagen

capturada. 3) Base del portamuestras. 4) Espejo reflector posicionado estratégicamente. 5) Fibra óptica (Thorlabs, multimodo, 0.22 NA, 250 – 22400 nm). 6) Acoplador de la fibra óptica. 7) Plataforma para el ajuste tridimensional del haz del láser RGB. 8) Láser verde (Laserland, módulo láser RGB, 532 nm). (B) Se muestra como se hace incidir luz verde sobre el portamuestras donde se encuentran los pozos y en éstos la cepa CL Brener). Figura modificada de “Inactivación fotodinámica en la motilidad de los espermatozoides de ratón” de Santos Aguirre (Santos Aguirre, 2022).

2.4.2. Procesamiento de imágenes

Una vez se capturan los videos durante los experimentos, cada cuadro es procesado para obtener un espectro de capas RGB. Utilizando un coeficiente de correlación es posible cuantificar la intensidad de luz capturada con una cámara en el espectro RGB. Sin embargo, es algo laborioso trabajar con este espectro, por lo que se optó por convertir el RGB a una escala de grises con 8 bit de profundidad. En este caso, cada píxel puede tener valores enteros entre 0 y 255. Entonces se pudo trabajar con las imágenes estudiando el contraste que presentan respecto a un cuadro o imagen de referencia (correspondiente a la primera capturada al inicio del video) tomada en un tiempo inicial t_0 . Se compararon las imágenes sucesivas tomadas en tiempos t_1, t_2, \dots, t_N a una imagen de referencia, como se muestra en la Figura 13A. La cuantificación de este proceso se hizo mediante un factor de correlación temporal que se expresa como:

$$C_{ij} = \frac{1}{\beta} \left[\frac{\langle I(t_0)I(t_0 + t) \rangle_{XY}}{\langle I(t_0) \rangle_{XY} \langle I(t_0 + t) \rangle_{XY}} - 1 \right], \quad (4)$$

donde β es una constante (factor) que normaliza la correlación C_{ij} en valores entre 0 y 1, y $I(t_0)$ es toda la imagen en el tiempo t_0 de la matriz de referencia de tamaño $N \times N$, esto es, de 100×100 pixeles (Sierra Valdez, Cisneros Mejorado, Sánchez Herrera, & Ruiz-Suárez, 2012), (Sierra Valdez F. J., 2011).

En la Figura 13B se muestra un recorte cuadrado de cada imagen de donde se emplea la ecuación 4 para comparar el promedio de intensidades en el tiempo en un sistema de dos dimensiones XY .

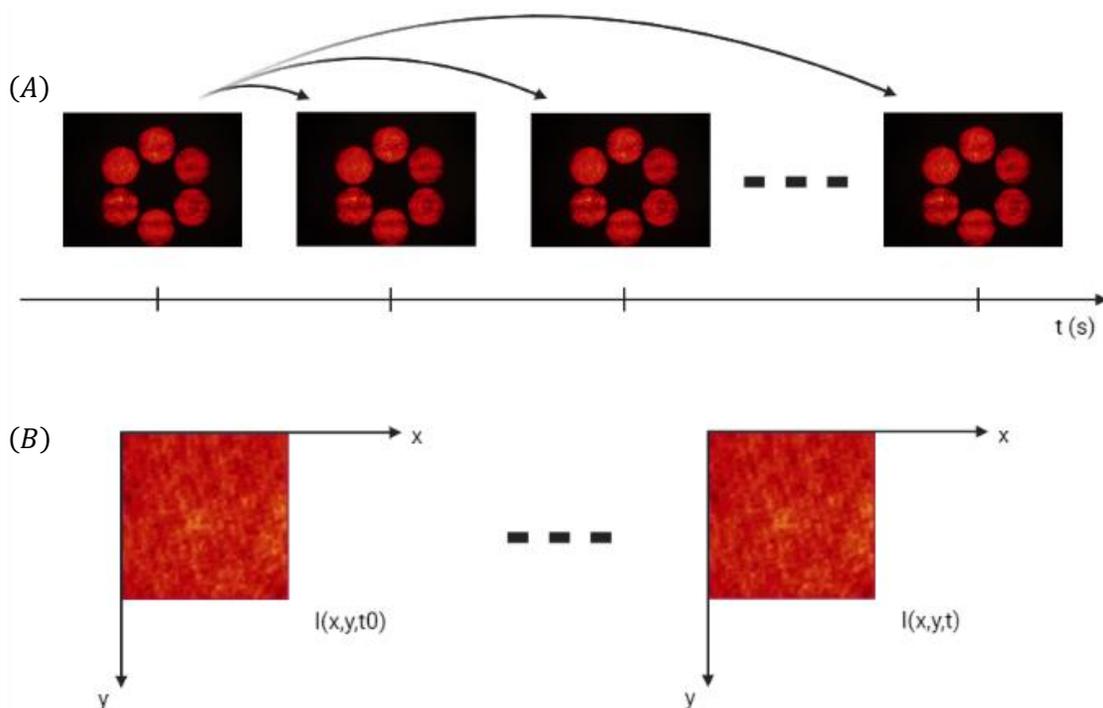


Figura 13: Análisis de procesamiento de imágenes de los parásitos. (A) Elección de fotografía de referencia con lo que se compara cada una de las fotografías tomadas posteriormente. (B) Estudio de intensidades (usando un factor de correlación) en un cuadro de 100×100 píxeles. Figura de elaboración propia.

2.5. Suspensión de la RB en epimastigotes

Para llevar a cabo la suspensión del fotosensibilizador en conjunto con los epimastigotes, es necesario contenerlos en medio líquido, por lo que se decidió verterlos en medio PBS. Se hicieron ensayos para concentraciones de RB a $26 \mu M$, $130 \mu M$ y $260 \mu M$.

La RB fue vertida en PBS en el medio LIT que contenía epimastigotes, con una dilución 1:10, es decir, por cada 100 mL de RB se suspendió 900 mL de epimastigotes.

2.6. Pruebas de viabilidad de epimastigotes post-PDI

Para realizar los experimentos de viabilidad de las células se observó vía microscopio la cepa CL Brener antes y después de irradiar, es decir, se hizo un seguimiento de la cepa a través de un microscopio para evaluar si existen efectos retardados y/o inmediatos de PDI. Para llevar a cabo estos experimentos se analizaban con una lente de microscopio con un acercamiento de $40 \times$.

2.7. Análisis estadístico

Para hacer un estudio de errores experimentales, se hizo un recuento de datos los cuales fueron sometidos a una serie de métodos aritméticos con el fin de reflejar la naturaleza de un grupo relativamente pequeño de datos a uno mayor.

Cuando se encuentra con una serie de datos que son similares, se decide ocupar un análisis para interpretar qué tan dispersos son, esto es, un estudio de desviación estándar típica σ :

$$\sigma = \sqrt{\frac{\sum(x_i - \mu)^2}{N}}, \quad (5)$$

donde σ es la desviación estándar poblacional, N es el tamaño de la población, x_i es cada valor de la población y μ es la media poblacional, es decir, una medida de tendencia central.

3

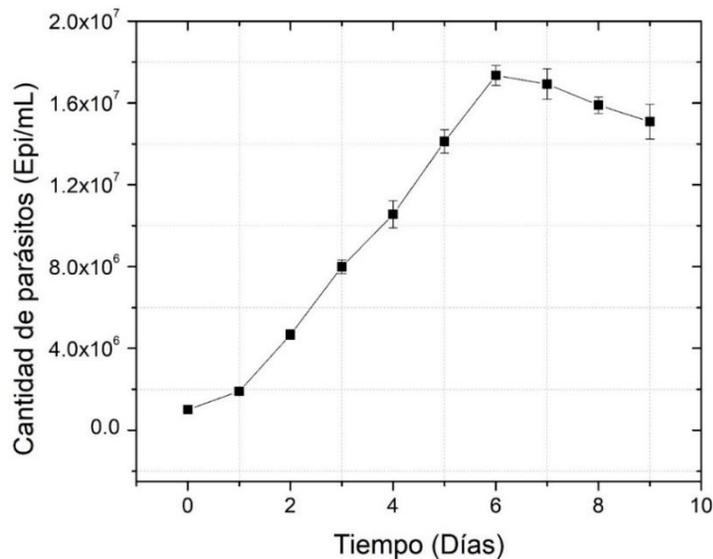
Resultados

3. RESULTADOS

3.1. Cinética de crecimiento de CL Brener

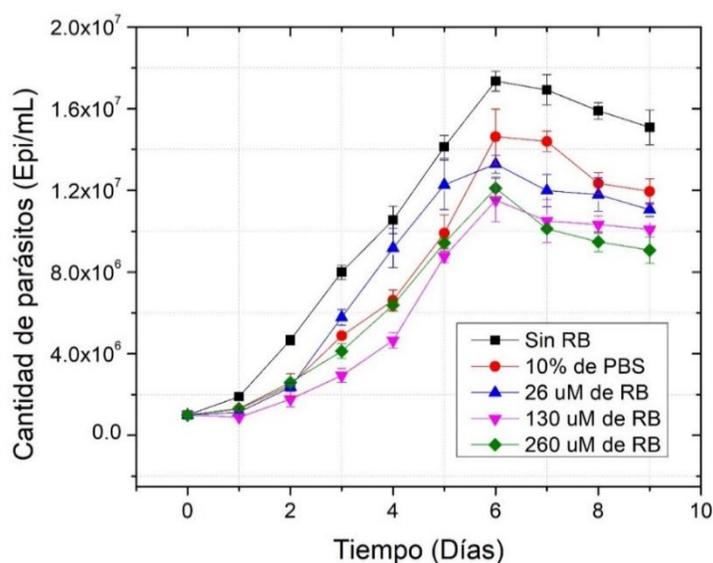
Se realizó un monitoreo continuo sobre el desarrollo y crecimiento de CL Brener en su medio nutritivo (medio LIT). En seguida, se evaluó de manera similar el crecimiento de la cepa suspendida en medio con RB, para las concentraciones en las que se obtuvieron mayores efectos de PDI: $26 \mu M$, $130 \mu M$ y $260 \mu M$. En todos estos experimentos se preparó el cultivo agregando inicialmente 1×10^6 *parásitos/mL*, de donde se pudo llevar a cabo una evaluación y estimar los resultados con las mismas condiciones y cuantificar el aumento poblacional parasitario en el tiempo.

En la figura 14 se muestra el crecimiento poblacional parasitario que se determinó a través de la ecuación 3. Se observa un aumento predominante en el día 5, es decir, del día 5 al día 6 (punto en donde se llevaron a cabo los experimentos de PDI) para luego evaluar el efecto de la motilidad en los epimastigotes al ser sometidos a nuestro método de irradiación con una fuente de luz verde (532 nm), a 24 mW y tiempos específicos de iluminación.



*Figura 14: Cinética de crecimiento parasitaria en medio LIT. Se muestra la parasitemia de *T. cruzi* por 9 días en su medio de enriquecimiento. Se observa cómo se llega al pico poblacional el día 6 post siembra y el día de mayor crecimiento se da en el día 5 ($n = 3$). Figura de elaboración propia.*

Posteriormente, se hizo un recuento del comportamiento parasitario para las distintas concentraciones utilizadas en el proceso de PDI para la evaluación de efectos adversos (citotoxicidad) que podría acarrear la adición de RB sobre la población parasitaria. Se realizó también una curva de crecimiento donde se diluyeron los epimastigotes únicamente en medio PBS (1:10), ver figura 15. En todas las concentraciones utilizadas se siguió el mismo método de preparación de medio con contenido de RB, como se describe en la sección 2.5. Notamos como hay valores poblacionales similares en varios puntos de la cinética comparativa de las distintas concentraciones de RB, siendo las concentraciones de 130 y 260 μM en donde se encuentra la mayor similitud en cantidad de parásitos.



*Figura 15: Cinética de crecimiento parasitaria para las distintas concentraciones de RB. Se presenta la muestra de *T. cruzi* en su medio de enriquecimiento suspendida con las distintas concentraciones de RB (26, 130 y 260 μM). Se observa que en cualquier curva se tiene un pico poblacional parasitario al día 6 ($n = 3$). Figura de elaboración propia.*

Después de procesar los datos para evaluar los efectos de las distintas concentraciones de RB en la cepa de parásitos, se procedió a evaluar los efectos de PDI. En cualquier caso, se debe aclarar que los pozos 1, 3 y 5 son nuestro grupo experimental, es decir, en ellos se suspendió la cepa de parásitos CL Brener con tratamiento de RB a una concentración molar determinada en las mismas cantidades a cada pozo (empezamos cada experimento con 2×10^6 epimastigotes/pozo). Los pozos 2, 4 y 6 son nuestro grupo control, en donde, en el pozo 2 se suspendió exactamente igual que los pozos experimentales. En el pozo 4 se vertió la muestra de epimastigotes sin RB y en el pozo

6 fue nuestro control de agua, es decir, en donde se evalúa la eficiencia de nuestro arreglo experimental.

3.2. PDI a $26 \mu M$:

El análisis de los efectos en la motilidad de *T. cruzi* sometida a PDI con diferentes concentraciones de RB, fue realizado mediante un factor de correlación de la ecuación 4, considerando 180 imágenes (cuadros).

La figura 16 muestra datos a partir de utilizar un factor de correlación C_{ij} . En la figura 16A se muestra que los parásitos que se encuentran en los pozos 1, 2, 3, 4 y 5 son altamente activos y estos no llegan al mismo valor después de 60 cuadros ya que hay diferencias pequeñas de motilidad y población en cada uno. En la figura 16B se muestra que los parásitos en suspensión en los pozos experimentales 24 horas después de ser irradiados por 6 horas (pozos 1, 3 y 5), siguen prácticamente la misma tendencia que nuestro control de agua (pozo 6). Vemos en la figura 16B para $26 \mu M$ de RB que después de irradiar cada muestra experimental por 6 horas con una potencia de $24 mW$, la motilidad se ve disminuida de manera significativa, es decir, aumenta su valor de correlación en $\sim 90\%$ (prácticamente igual que el control de agua): en tanto que las muestras en los pozos 2 y 4 siguen siendo motiles, aunque la muestra 4 es levemente más activa que la 2. Las curvas del pozo 2 y 4 son mayores a cero en la figura 16B a casi 60 capturas, dada la similitud al reacomodo de parásitos que evitan el paso de luz para su captura.

En seguida, se calcularon los valores de correlación conforme avanzaba el tiempo, como se muestra en la figura 17. Particularmente, hay un aumento en la correlación cuando se sometían los epimastigotes a 4 horas de iluminación de luz verde, hasta llegar a un tiempo de irradiación de 6 horas, en donde la correlación fue mayor a 0.9.

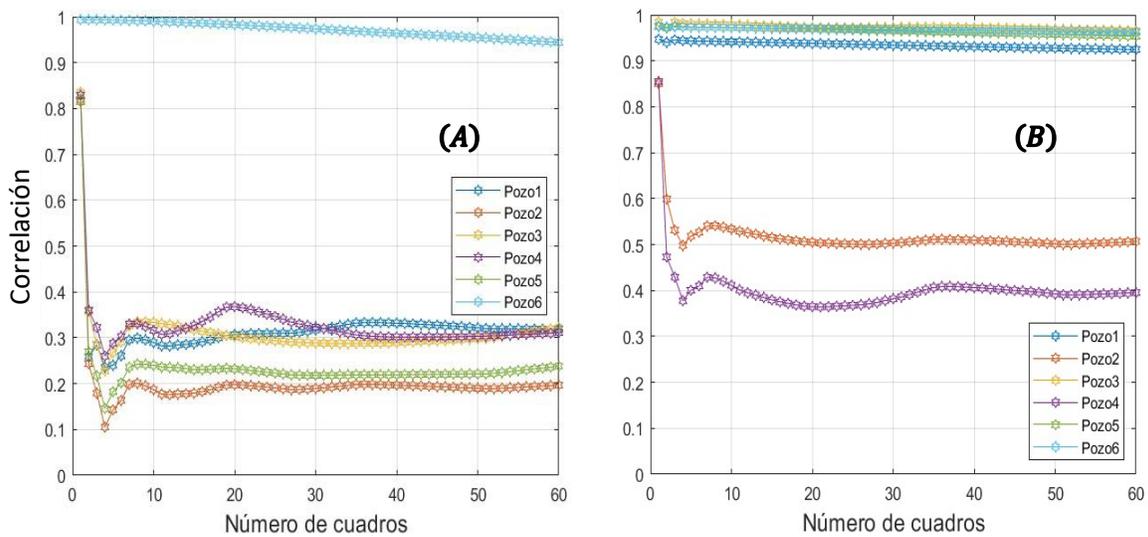


Figura 16: Evolución temporal del factor de correlación para parásitos fotoinactivados por 6 horas con luz verde y 26 μM de RB.

Se muestran las gráficas de correlación para cinco muestras de suspensiones con 2×10^6 epimastigotes y 26 μM de RB cada una (pozos 1 al 5), y para la muestra control sin parásitos que solo contenía agua milli-Q (pozo 6). (A) Factor de correlación de las muestras antes de ser irradiadas ($n = 3$). (B) Factor de correlación de las muestras 24 horas después de ser irradiadas (pozos 1, 3 y 5) por 6 horas cada una ($n = 3$). Figura de elaboración propia.

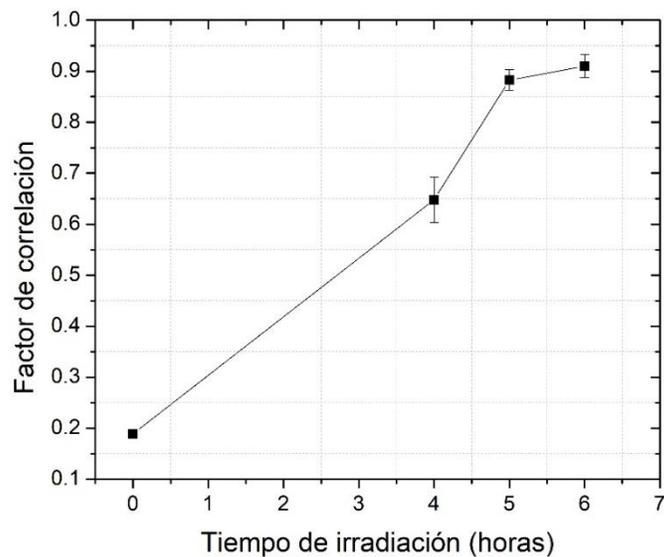


Figura 17: Coeficiente de correlación respecto al tiempo de parásitos suspendidos a 26 μM de RB y sometidos a iluminación con luz verde.

Se muestran los valores de correlación para la motilidad de *T. cruzi* con 26 μM de RB e irradiados con luz verde con valores de correlación de 0, 4, 5 y 6 horas post iluminación ($n = 3$). Figura de elaboración propia.

En la figura 18 se muestra el comportamiento de los parásitos conforme pasa el tiempo, es decir, se tomaron fotografías al momento de ajustar las muestras en el arreglo experimental (0 horas). Para obtener el segundo valor de correlación, las muestras fueron irradiadas 4 horas más, y se tomaron fotografías al momento de detener esta irradiación. Posteriormente, se irradiaron 2 horas más y se adquirieron las imágenes correspondientes. Nótese como en la hora 20 y 36 se tienen efectos retardados de PDI, y la motilidad en ambos puntos es prácticamente igual que la del control de agua. Se notan efectos retardados en tiempos post-irradiación de los epimastigotes. Los triángulos verdes que se muestran en la figura 18 indican el momento en que los parásitos fueron sometidos a iluminación con luz verde, empezando de izquierda a derecha; el primer triángulo verde indica la iluminación por 4 horas y el segundo cuando se sometieron por dos horas adicionales. En esta figura, también se muestran cuatro curvas de correlación a lo largo del tiempo, donde la curva negra representa los valores de correlación de los epimastigotes suspendidos con una concentración de $26 \mu M$ de RB y medio LIT, en la curva roja se tienen los epimastigotes suspendidos únicamente en su medio nutritivo (medio LIT), la curva azul es nuestra muestra experimental (la que fue irradiada con luz verde con $24 mW$ de potencia) y la curva rosa es nuestro control de agua de donde se espera siempre sean valores cercanos a la unidad. Nótese como hay un aumento de correlación en las curvas roja y negra durante las primeras 18 horas experimentales, en seguida hay una disminución de esta correlación a partir de las 20 horas; se especula que hay muerte parasitaria en estas primeras horas debido al cambio de recipiente, esto es, se hizo un cambio de un recipiente plástico a uno de acero inoxidable, es decir, los parásitos ocupan un periodo de adaptación al ser trasladados a un recipiente de material diferente.

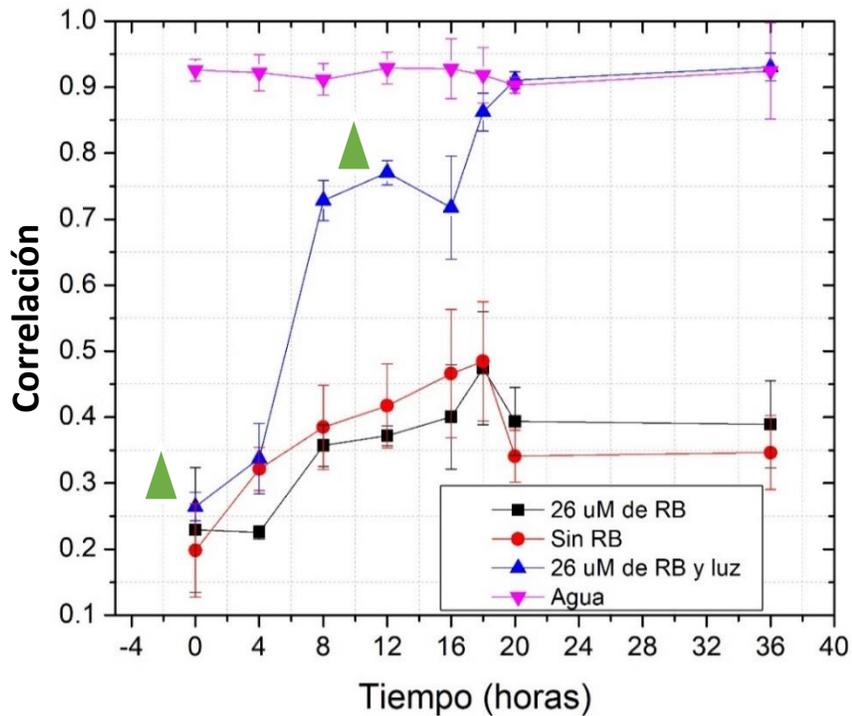


Figura 18: Seguimiento de motilidad de epimastigotes a 26 μM de RB. Se muestran los valores de motilidad para una muestra experimental con tiempos de iluminación de 4 y 6 horas, un control de parásitos diluido en 26 μM de RB, un control de parásitos sin RB y un control de agua ($n = 3$). Los triángulos verdes indican el momento en que los parásitos fueron sometidos a iluminación con luz verde. Figura de elaboración propia.

3.3. PDI a 130 μM :

En la figura 19 se muestra el factor de motilidad mediante los gráficos de correlación para los 5 pozos que contienen parásitos, donde 4 de ellos están en suspensión con RB a 130 μM y uno contiene parásitos en su medio nutritivo únicamente, y para la muestra control sin parásitos (pozo 6) que solo contenía agua milli-Q. En la figura 19A se presentan los valores de correlación de las muestras antes de ser sometidas a irradiación. En la figura 19B se grafican los efectos de motilidad a causa de PDI sobre los parásitos usando el coeficiente de correlación. En este experimento los pozos 1, 3 y 5 se mantuvieron irradiados durante 5 horas con una potencia de 24 $m\text{W}$, y se observa que aumentan su valor de correlación prácticamente igual que el control de agua, es decir, el pozo 6, respecto a la figura 19A. El contenido en los pozos 2 y 4 sigue siendo mótil, aunque se puede

apreciar que los parásitos en el pozo 4 se encuentran más activos que los que están en el pozo 2 en el panel B de la figura 19.

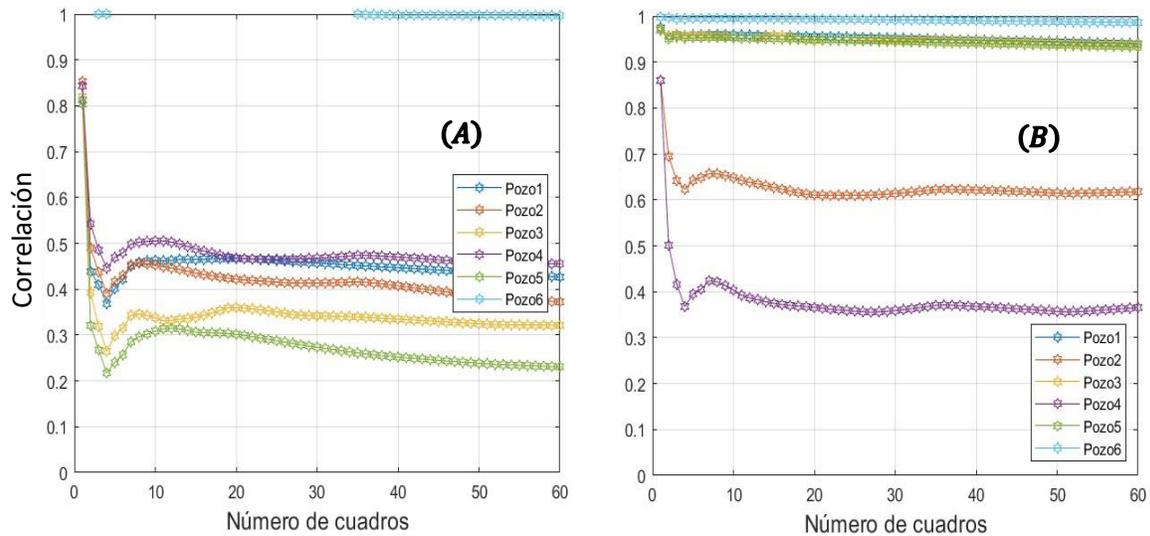


Figura 19: Evolución temporal del factor de correlación para parásitos fotoinactivados por 5 horas con luz verde y 130 μM de RB.

Se muestran las gráficas de correlación para cinco muestras de suspensiones con 2×10^6 epimastigotes y 130 μM de RB cada una (pozos 1 al 5), y para la muestra control sin parásitos que solo contenía agua milli-Q (pozo 6). (A) Factor de correlación de las muestras antes de ser irradiadas ($n = 3$). (B) Factor de correlación de las muestras 24 horas después de ser irradiadas (pozos 1, 3 y 5) por 5 horas cada una ($n = 3$). Figura de elaboración propia.

También se calcularon los valores de correlación únicamente en función del tiempo como se muestra en la figura 20. Con 3 horas de iluminación de luz verde se encuentran valores de motilidad muy bajos, sin embargo, no es hasta llegar a un tiempo de irradiación de 5 horas que se obtienen valores de correlación mayores a 0.9.

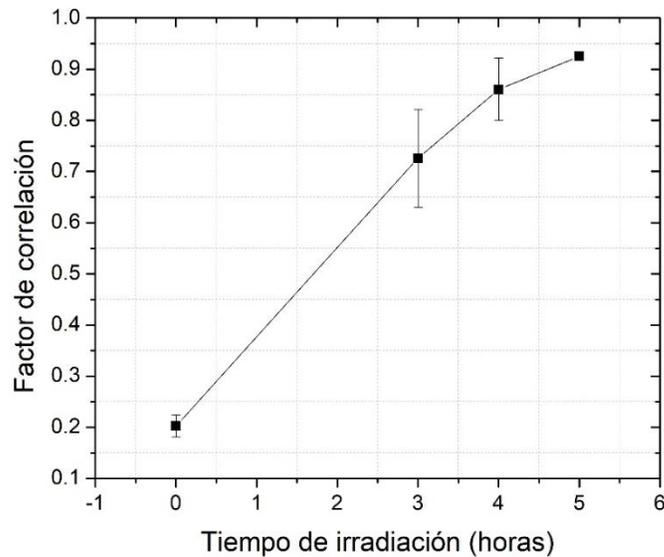


Figura 20: Coeficiente de correlación respecto al tiempo de parásitos suspendidos a 130 μM de RB y sometidos a iluminación con luz verde.

*Se muestran los valores de correlación para la motilidad de *T. cruzi* con 130 μM de RB e irradiados con luz verde con valores de correlación de 0, 3, 4 y 5 horas post iluminación ($n = 3$). Figura de elaboración propia.*

En la figura 21 se muestra el comportamiento de los parásitos conforme pasa el tiempo, para ello, se tomaron fotografías al momento de ajustar las muestras en el arreglo experimental (0 horas). Para nuestra segunda medición de correlación se irradió durante 3 horas (curva azul) y se tomaron fotografías al momento de detener esta irradiación donde se tiene graficado este valor de motilidad parasitaria. Después de 9 horas, se volvió a irradiar 1 hora más. Finalmente, 18 horas después se hizo una última irradiación (1 hora) al pozo experimental, para tener 5 horas de irradiación acumuladas. Nótese cómo en la hora 26 y 42 se tienen efectos retardados de PDI y la motilidad en ambos puntos es prácticamente igual que la del control de agua. Se notan efectos retardados en tiempos post-irradiación de los parásitos. Los triángulos verdes en la figura 21 indican el momento que los parásitos fueron sometidos a iluminación con luz verde, el primer triángulo verde indica la iluminación inicial por 3 horas, el segundo triángulo verde indica cuando se sometieron por una hora adicional y el último triángulo por una hora más (para tener un acumulado de 5 horas en total). En la figura 21 se muestran cuatro comportamientos: la curva negra representa los valores de correlación de los parásitos suspendidos con una concentración de 130 μM de RB y medio LIT, en la curva roja se tienen los epimastigotes suspendidos únicamente en su medio nutritivo (medio LIT), la curva azul es nuestra muestra experimental (la que fue irradiada con luz

verde con 24 mW de potencia) y la curva rosa es nuestro control de agua de donde se espera siempre sean valores cercanos a la unidad. De esta figura se sigue que, con tiempos de irradiación de 3, 4 y 5 horas se disminuye significativamente la motilidad parasitaria. Notamos como sucede también un pequeño periodo de adaptación parasitaria en las curvas roja y negra, aunque este tiempo es menor respecto al periodo para 26 μM .

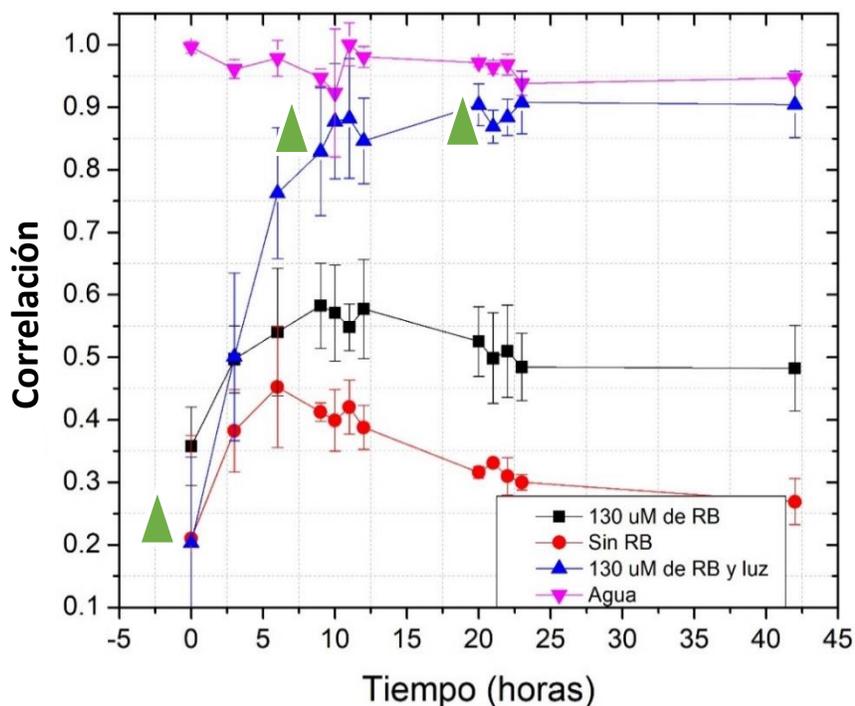


Figura 21: Seguimiento de motilidad de epimastigotes a 130 μM de RB. Se muestran los valores de motilidad para una muestra experimental con tiempos de iluminación de 3, 4 y 5 horas, un control de parásitos diluido en 130 μM de RB, un control de parásitos sin RB y un control de agua ($n = 3$). Los triángulos verdes indican el momento en que los parásitos fueron sometidos a iluminación con luz verde. Figura de elaboración propia.

3.4. PDI a 260 μM :

En la figura 22 se presentan los valores de motilidad dados por la función de correlación C_{ij} para parásitos con RB a 260 μM y sin RB, es decir, solamente en su medio nutritivo, así como los valores de correlación de la muestra control sin parásitos en agua milli-Q. En la figura 22A se muestran los valores correlación de las muestras antes de ser sometidas a PDI, observándose que tienen

movilidad muy alta (alrededor de 0.2). En la figura 22B se muestran los efectos de la PDI, sobre las muestras que contienen a los parásitos con el medio nutritivo y RB en los pozos 1, 3 y 5 por 3.5 horas, a $24 mW$ que contienen a los parásitos con el medio nutritivo y RB, así como los efectos del RB sin irradiar en los parásitos de la muestra del pozo 2 y el movimiento de los parásitos sin irradiar solamente con el medio nutritivo en el pozo 4. La función de correlación en la figura 22B nos indica que las muestras irradiadas los pozos 1, 3 y 5, aumentan su valor prácticamente igual que el control de agua (pozo 6) y el contenido en los pozos 2 y 4 siguen presentando motilidad, aunque los parásitos en el pozo 4 se encuentran más activos que los que están en el pozo 2.

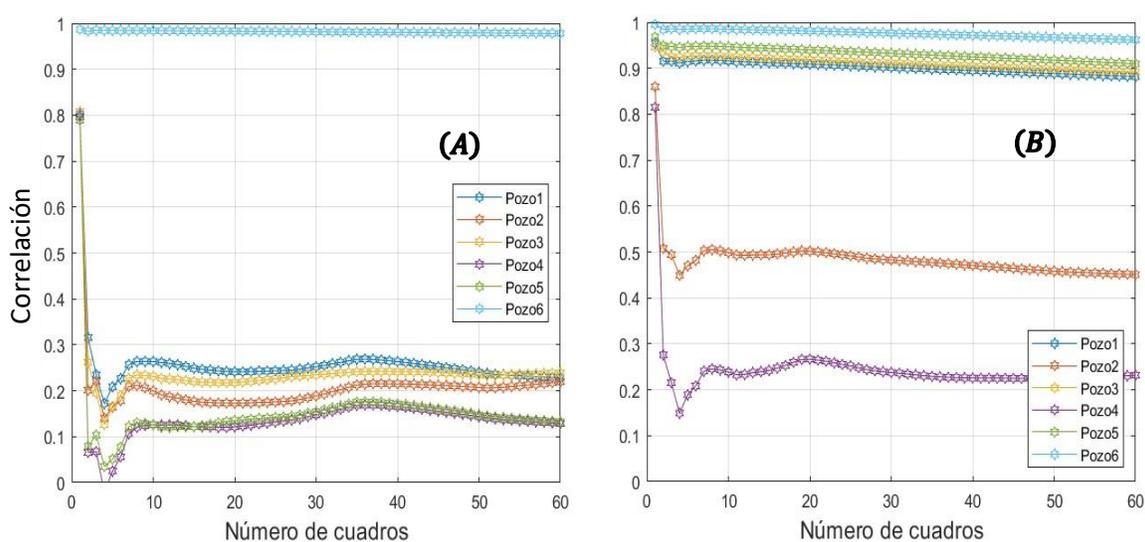
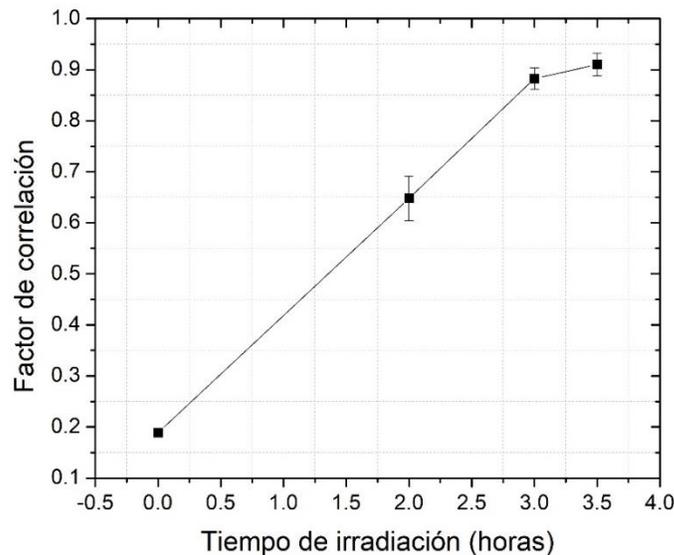


Figura 22: Evolución temporal del factor de correlación para parásitos fotoinactivados por 3.5 horas con luz verde y $260 \mu M$ de RB.

Se muestran las gráficas de autocorrelación para cinco muestras de suspensiones con 2×10^6 epimastigotes y $260 \mu M$ de RB cada una (pozos 1 al 5), y para la muestra control sin parásitos que solo contenía agua milli-Q (pozo 6). (A) Autocorrelación de las muestras antes de ser irradiadas ($n = 3$). (B) Autocorrelación de las muestras 24 horas después de ser irradiadas (pozos 1, 3 y 5) por 3.5 horas cada una ($n = 3$). Figura de elaboración propia.

Los resultados anteriores muestran que se necesita un menor tiempo de irradiación si duplicamos la cantidad de concentración molar de RB respecto a $130 \mu M$. En la figura 23 se presenta una curva del seguimiento de motilidad de *T. cruzi* en conjunto con $260 \mu M$ de RB y sometida a 2, 3 y 3.5 horas de irradiación con luz verde. Es interesante notar que a un tiempo de irradiación de 3.5 horas se encuentran valores de correlación mayor a 0.9 que se asemeja al comportamiento descrito

en la muestra control sin parásitos (agua quieta), es decir, la motilidad de los parásitos es prácticamente nula.



*Figura 23: Coeficiente de correlación respecto al tiempo de parásitos suspendidos a 260 μM de RB y sometidos a iluminación con luz verde. Se muestran los valores de correlación para la motilidad de *T. cruzi* con 260 μM de RB e irradiados con luz verde con valores de correlación de 0, 2, 3 y 3.5 horas post iluminación ($n = 3$). Figura de elaboración propia.*

En la figura 24 se muestra el comportamiento de los parásitos conforme pasa el tiempo, es decir, se tomaron fotografías al momento de ajustar las muestras en el arreglo experimental (0 horas). Para nuestra segunda medición de correlación se irradió durante 2 horas (curva azul) y se tomaron fotografías que es justo al momento de detener esta irradiación donde se tiene el valor de motilidad parasitaria C_{ij} mostrado. Al tiempo 6 horas, se sigue de la figura que se volvió a irradiar la muestra durante 1 hora más. Finalmente, al tiempo 9 horas se hizo una última irradiación (0.5 horas) al pozo experimental para tener 3.5 horas de iluminación acumuladas. Nótese como en la hora 10 y 26 se tienen efectos retardados de PDI y la motilidad en ambos puntos es prácticamente igual que la del control de agua sin la presencia de parásitos (la curva azul se asemeja a los valores de la curva rosa). Se notan efectos retardados en tiempos post-irradiación de los epimastigotes. Los triángulos verdes en la figura 24 indican el momento en que los parásitos fueron sometidos a iluminación con luz verde, el primer triángulo indica la iluminación por 2 horas, el segundo cuando se sometieron por una hora y el último por 0.5 horas más (para tener un acumulado de 3.5 horas). Se muestran cuatro curvas, en donde la curva negra representa los valores de correlación de los

parásitos suspendidos en $260 \mu\text{M}$ de RB y medio LIT, en la curva roja se representan los valores de correlación de los parásitos suspendidos únicamente en su medio nutritivo (medio LIT), la curva azul es la muestra experimental (irradiada con luz verde a 24 mW) y la curva rosa son los valores del control de agua de donde se espera siempre sean valores cercanos a la unidad. El periodo en que los parásitos entran en muerte celular por el cambio de recipiente en este caso es de poco más de 8 horas, es decir, las curvas roja y negra aumentan su valor de correlación durante estas primeras horas para posteriormente tender a disminuir y aumentar su motilidad.

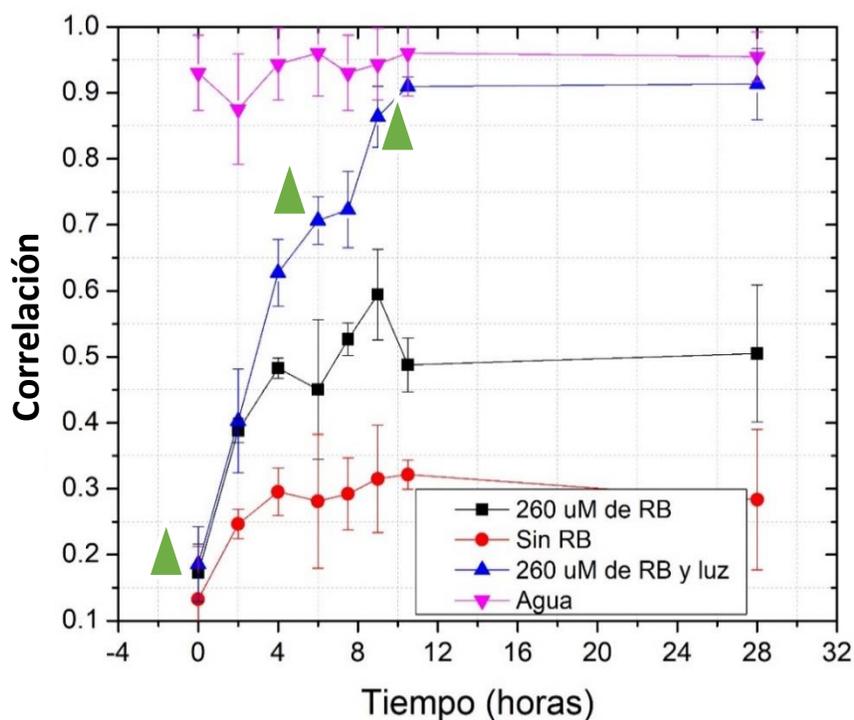


Figura 24: Seguimiento de motilidad de epimastigotes a $260 \mu\text{M}$ de RB. Se muestran los valores de motilidad para una muestra experimental con tiempos de iluminación de 2, 3 y 3.5 horas, un control de parásitos diluido en $260 \mu\text{M}$ de RB, un control de parásitos sin RB y un control de agua ($n = 3$). Los triángulos verdes indican el momento en que los parásitos fueron sometidos a iluminación con luz verde. Figura de elaboración propia.

3.5. Pruebas de viabilidad

A continuación, se muestran evidencias de la viabilidad de *T. cruzi* antes y después de ser sometidos al proceso de PDI. En la figura 25A se muestra una fotografía de la morfología de los parásitos en su

medio nutritivo a una concentración de $260 \mu\text{M}$ de RB antes de ser sometidos a PDI. Después de irradiar los parásitos se encuentra que estos desarrollan un cambio en su morfología, cambiando a una forma redondeada, esto es presumiblemente debido a los efectos de la PDI y a la producción de ROS generados en el ambiente (figura 25B).

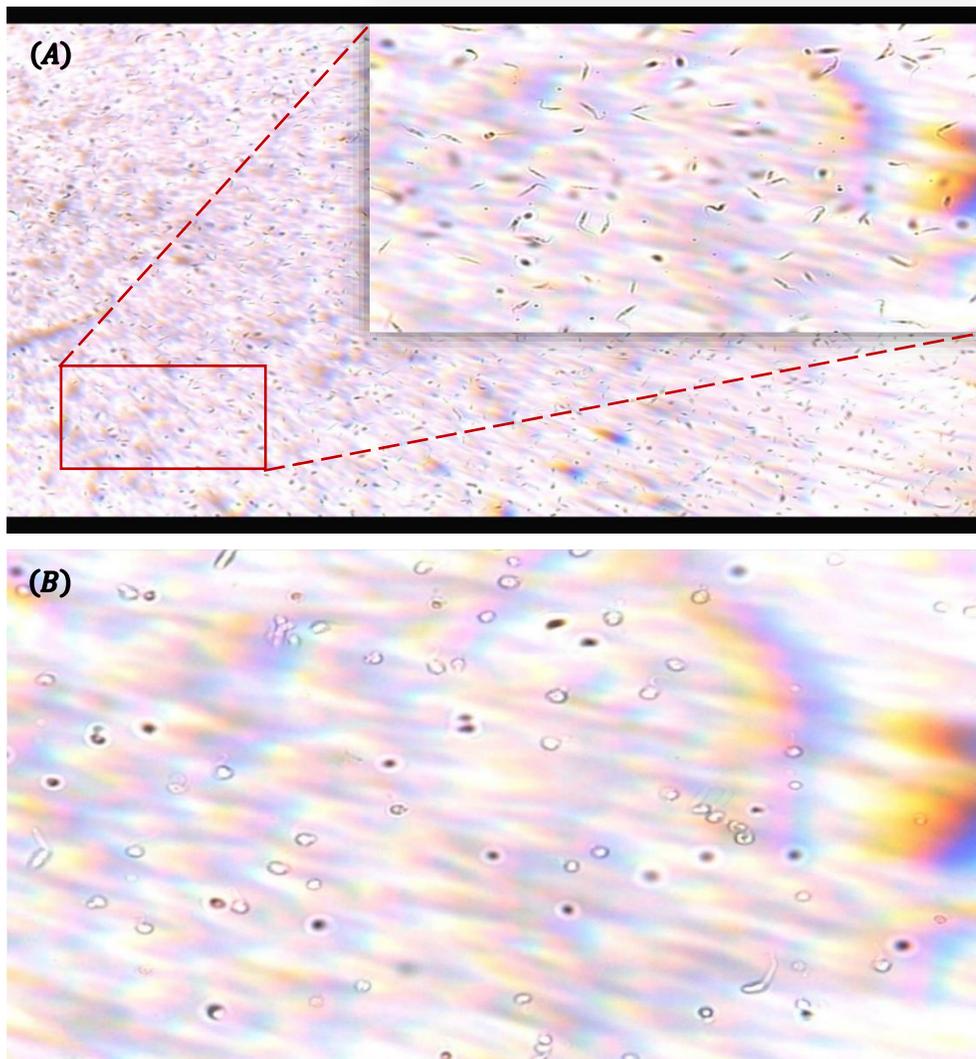


Figura 25: Parásitos en su medio nutritivo y RB a $260 \mu\text{M}$ antes de ser sometidos a PDI y los efectos de PDI en la morfología parasitaria a $260 \mu\text{M}$ de RB.

(A) Se muestra la morfología de los parásitos antes de ser sometidos a los efectos de PDI con luz verde. Se nota la forma alargada de los epimastigotes y se alcanza a percibir la presencia del flagelo al hacer un acercamiento que se muestra en el recuadro superior derecho. (B) En la microfotografía se muestra como los parásitos adquieren una morfología redonda después de ser sometidas a 3.5 horas de iluminación con luz verde a una potencia de 24 mW y en presencia de $260 \mu\text{M}$ de RB. Figura de elaboración propia.

4

Discusión

4. DISCUSIÓN

Los epimastigotes crecen de manera exponencial en su medio de cultivo enriquecido. Sin embargo, hay una disminución en el crecimiento y en la motilidad de los parásitos cuando son suspendidos en un medio simple como PBS, lo que sugiere que requieren de los nutrientes presentes en el medio enriquecido, además de que, al estar en contacto con RB el crecimiento y motilidad se ven disminuidos aún más dada la difusión de la RB a los parásitos (Cruz, Lopes, & De Souza, 1984).

Se encontraron valores bajos de motilidad del medio con parásitos fotoinactivados para las tres concentraciones de RB caracterizadas en este trabajo (26, 130 y 260 μM), comparando con la velocidad de tripomastigotes de la cepa CL Brener en la literatura de $\sim 8.12 \mu\text{m}/\text{s}$ nadando libremente. Estos parásitos están obligados a moverse dentro de un espacio cuasi bidimensional (Arias Del Angel, Santana Solano, Santillán, & Manning Cela, 2020) y en nuestros experimentos los parásitos nadan en bulto. Sin embargo, estos valores de velocidad se reducen a cero después de los tiempos de irradiación y potencia determinados para cada concentración molar dada.

Se observó que los efectos de la PDI no tienen un comportamiento lineal con la concentración del fotosensibilizador, ver figura 26. Y como era de esperarse, el cese de la motilidad de los parásitos se alcanza en menos tiempo a medida que la concentración de la RB se incrementa.

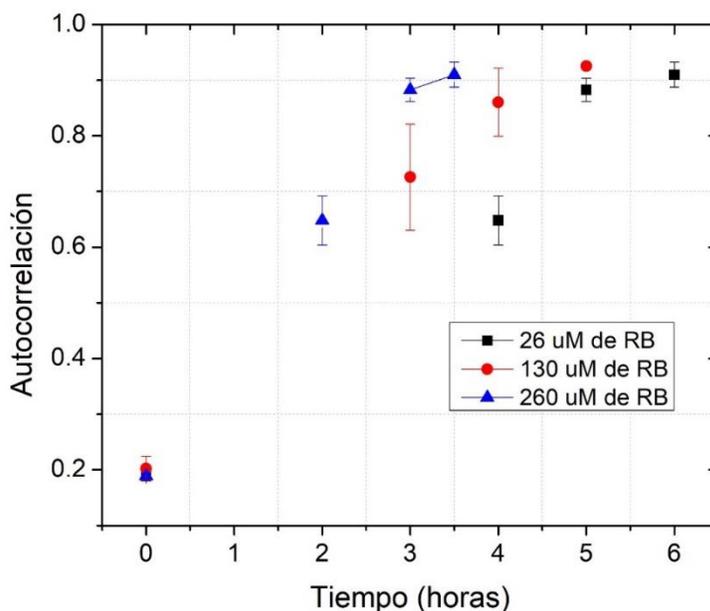


Figura 26: Efectos de PDI en el tiempo para 26,130 y 260 μM de RB.

Se muestran los efectos de la PDI para las tres concentraciones de RB utilizadas en este trabajo encontrando valores de autocorrelación similares hasta las 3.5, 5 y 6 horas de irradiación para 26, 130 y 260 μM de RB, respectivamente. Figura de elaboración propia.

En este trabajo se observó que los parásitos aumentan su tamaño y muestran una forma redonda conforme se incorpora RB al medio de enriquecimiento en que se prolifera, lo cual coincide con lo observado en otros trabajos (Cruz, Lopes, & De Souza, 1984), pero esto no perjudica de manera definitiva la motilidad de los epimastigotes por lo que se sugiere que los vuelve únicamente menos mótils y no crea un efecto citotóxico en su vecindad.

Se ha comprobado que la PDI se ve comprometida con las concentraciones bajas de prueba utilizadas en este proyecto (no se muestra en este escrito), es decir, a 13 μM de RB diluido en medio con parásitos, hubo un fotoblanqueamiento de la RB resultando en una baja eficacia de la PDI incluso por períodos largos de irradiación (hasta 12 horas). Sucede algo diferente cuando se trabaja con las concentraciones de RB, por ejemplo, 130 μM obteniéndose valores de correlación altos después de irradiar a una potencia de 24 mW por 3, 4 y 5 horas, esto es, con fluencias de energía de 916.7 J/cm^2 , 1222.3 J/cm^2 y 1527.9 J/cm^2 respectivamente.

Se han llevado a cabo tratamientos para la erradicación de *T. cruzi* como lo son, la terapia con nitroderivados *in vivo* (Lauria-Pires, *et. al.*, 2000), quimioterapia (Urbina, 2002) y PDI con curcumina como fotosensibilizador (9.77 μM) *in vitro* (Buenfil Chi, 2021). En el tratamiento de PDI con curcumina se obtuvieron resultados de viabilidad similares a los reportados en este trabajo, es decir, se logró erradicar el parásito después de aplicar la PDI, aunque para obtener una viabilidad nula de epimastigotes se tuvo que esperar un tiempo post-PDI mayor con curcumina respecto a RB (72 horas en el primer caso y 24 horas en el segundo).

5

Conclusiones

5. CONCLUSIONES

Las conclusiones de este trabajo son las siguientes:

- El uso de luz verde de 532 nm a una potencia de 24 mW y una fluencia de energía de 1833.5 J/cm^2 , 1527.9 J/cm^2 y 1069.5 J/cm^2 en conjunto con RB a concentraciones de $26\text{ }\mu\text{M}$, $130\text{ }\mu\text{M}$ y $260\text{ }\mu\text{M}$, respectivamente en *T. cruzi* produjo un cese de la motilidad del parásito.
- Los efectos de PDI en la motilidad de epimastigotes de *T. cruzi* requieren menores tiempos de iluminación a medida que aumentamos la concentración del agente fotosensibilizante bajo las mismas condiciones experimentales (potencia y longitud de onda de la luz).
- La RB tiene un moderado efecto citotóxico (para todas las concentraciones utilizadas en este trabajo), en la población parasitaria de los epimastigotes y provoca cambios en la morfología de éstos.
- El tiempo en que los epimastigotes permanecen móviles usando la PDI, está en función de la concentración del fotosensibilizador, es decir, a mayor concentración, habrá un menor tiempo en que los parásitos se mantienen móviles después de aplicar el tratamiento.
- Es posible obtener información sobre la motilidad de la cepa CL Brener de *T. cruzi* sometida a PDI a través de un sistema optoelectrónico y computacional, usando un coeficiente de correlación C_{ij} .

PERSPECTIVAS

Las perspectivas de este trabajo son las siguientes:

- Indagar que efectos podría tener el utilizar concentraciones de RB más altas que $260 \mu M$, para contextualizar y decidir si hay una conexión al aumento en el efecto de PDI sobre los parásitos (y su motilidad) utilizando las mismas condiciones de iluminación, es decir, a $24 mW$ de potencia con luz verde de $532 nm$.
- Realizar un estudio similar sobre la cepa NINOA de *T. cruzi* y determinar las consecuencias que la RB en conjunto con luz verde tiene sobre su motilidad y/o morfología.
- Explorar si con tiempos de iluminación menores y concentración de RB menores, pero con potencia de luz mayor se logra la PDI de los parásitos.
- Estudiar el efecto de la PDI en un sistema con células sanguíneas sanas en conjunto con epimastigotes de *T. cruzi* en medio acuoso (simulando el fluido sanguíneo), en donde se puede aplicar el tratamiento con RB a las concentraciones utilizadas en este trabajo, como una primera aproximación para el desarrollo de tratamientos clínicos futuros, utilizándolos por ejemplo, en combinación con una técnica de aféresis.

REFERENCIAS

- [1] Abuin, G., Colli, W., Souza, W. D., & Alves, M. J. (1989). A surface antigen of *Trypanosoma cruzi* involved in cell invasion (Tc-85) is heterogeneous in expression and molecular constitution. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 229-237.
- [2] APT, W. (1999). *Tratamiento de la enfermedad de Chagas*. Santiago, Chile: Parasitología al día.
- [3] Arias Del Angel, J. A., Santana Solano, J., Santillán, M., & Manning Cella, R. G. (2020). Motility patterns of *Trypanosoma cruzi* trypomastigotes correlate with the efficiency of parasite invasion in vitro. *Scientific Reports*, 10.
- [4] Arnal Barbedo, J. G. (2013). Automatic Object Counting In Neubauer Chambers. *XXXI SIMPOSIO BRASILEIRO DE TELECOMUNICACOES*, 1-4.
- [5] Arrúa Torreani, N. (2013). *Cardiopatía Chagásica*. Paraguay: Mem. Inst. Investig. Cienc. Salud.
- [6] Aziz, A. A., Siddiqui, R. A., & Amtul, Z. (2020). Engineering of fluorescent or photoactive Trojan probes for detection and eradication of β -Amyloids. *Drug Delivery*, 917-926.
- [7] Ballesteros-Rodea, G., Santillán-Zerón, M., Martínez-Calvillo, S., & Manning-Cella, R. (2012). Flagellar Motility of *Trypanosoma cruzi* Epimastigotes. *BioMed Research International*, 1-9.
- [8] Buenfil Chi, T. J. (2021). *Foto-inactivación del parásito Trypanosoma cruzi mediante el uso de luz visible*. Monterrey: CINVESTAV.
- [9] Carrington, M., & Field, M. (2009). *The trypanosome flagellar pocket*. Cambridge, UK: Nature Reviews Microbiology.
- [10] Collison, L. W., Delgoffe, G. M., Guy, C. S., Vignali, K. M., Chaturvedi, V., Fairweather, D., . . . Vignali, D. A. (2012). The composition and signaling of the IL-35 receptor are unconventional. *Nature Immunology*, 290-299.
- [11] Cross, G. A., & Takle, G. B. (1993). The surface trans-sialidase family of *Trypanosoma cruzi*. *Annual Review of Microbiology*, 385-411.
- [12] Cruz, F., Lopes, L., & De Souza, W. (1984). The photodynamic action of rose bengal on "*Trypanosoma cruzi*". *Acta Tropica*, 99-108.
- [13] De Souza, A. P., Sieberg, R., Li, H., Cahill, H. R., Zhao, D., Araújo-Jorge, T. C., . . . Jelicks, L. A. (2010). The role of selenium in intestinal motility and morphology in a murine model of *Trypanosoma cruzi* infection. *Parasitology Research*, 1293-1298.
- [14] De Souza, W. (1984). *Cell Biology of Trypanosoma cruzi*. Rio de Janeiro: Academic Press Inc.
- [15] De Souza, W. (2002). Basic Cell Biology of *Trypanosoma cruzi*. *Current Pharmaceutical Design*, 269-285.

- [16] De Souza, W., & Barrias, E. S. (2020). *May the epimastigote form of Trypanosoma cruzi be infective?* Rio de Janeiro: Elsevier B.V.
- [17] de Souza, W., de Carvalho Tecia, M. U., & Santos Barrias, E. (2010). *Review on Trypanosoma cruzi: Host Cell Interaction*. Rio de Janeiro: Hindawi Publishing Corporation.
- [18] Dvorak, J. A., & Hyde, T. P. (1973). Trypanosoma cruzi: interaction with vertebrate cells in vitro. 1. Individual interactions at the cellular and subcellular levels. *Experimental Parasitology*, 268-283.
- [19] Escamilla-Guerrero, G., Martínez-Gordillo, M. N., Riverón-Negrete, L., Aguilar-Escobar, D. V., Bravo-Lindoro, A., Cob-Sosa, C., & Ponce-Macotela, M. (2011). Trypanosoma cruzi: seroprevalence detected in the blood bank of the Instituto Nacional de Pediatría, Mexico City, in the period 2004 through 2009. *TRANSFUSION COMPLICATIONS*, 595-600.
- [20] Fernandes, M. C., & Andrews, N. W. (2012). Host Cell Invasion by Trypanosoma cruzi: A Unique Strategy that Promotes Persistence. *FEMS Microbiol Rev*, 734–747.
- [21] Gilaberte, Y., Serra-Guillén, C., De las Heras, M. E., Ruiz-Rodríguez, R., Fernández-Lorente, M., Benvenuto-Andrade, C., . . . Guillén-Barona, C. (2006). Terapia fotodinámica en dermatología. *Actas Dermosifiliogr*, 83-102.
- [22] Hecht, E. (2016). *Optics*. New York: Pearson.
- [23] Kirchhoff, L. V., Votava, J. R., Ochs, D. E., & Moser, D. R. (1996). Comparison of PCR and microscopic methods for detecting Trypanosoma cruzi. *Journal of Clinical Microbiology*, 1171-1175.
- [24] Lauria-Pires, L., Braga, M. S., Vexenat, A. C., Nitz, N., Simoes-Barbosa, A., Tinoco, D. L., & Teixeira, A. R. (2000). Progressive chronic Chagas heart disease ten years after treatment with anti-Trypanosoma cruzi nitroderivatives. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 111-118.
- [25] Lozano, I. M. (2016). *Presencia en exovesículas y su papel en la enfermedad de Chagas de las regiones N- y C- terminal de las proteínas MASPs de Trypanosoma cruzi*. Granada: Universidad de Granada.
- [26] Madrid, A. M., & Defilippi, C. (2006). *Disturbances of small intestinal motility in patients with chronic constipation*. Santiago: Revista Medica de Chile.
- [27] Mercado Uribe, H. (2020). *Luz visible contra un enemigo invisible*. Apodaca: CINVESTAV.
- [28] Meyer, H., & De Souza, W. (1976). Electron microscopic study of Trypanosoma cruzi periplast in tissue cultures. I. Number and arrangement of the peripheral microtubules in the various forms of the parasite's life cycle. *The Journal of Protozoology*, 385-390.
- [29] Meyer, H., & Xavier, D. O. (2009). Cultivation of Trypanosoma cruzi in tissue cultures: a four-year study. *Parasitology*, 91-94.

- [30] Mulani, M. S., Kamble, E. E., Kumkar, S. N., Tawre, M. S., & Pardesi, K. R. (2019). Emerging Strategies to Combat ESKAPE Pathogens in the Era of Antimicrobial Resistance: A Review. *Frontiers in Microbiology*, 510-539.
- [31] Murata, Y., & Osakabe, M. (2013). The Bunsen–Roscoe reciprocity law in ultraviolet-B-induced mortality of the two-spotted spider mite *Tetranychus urticae*. *Journal of Insect Physiology*, 241-247.
- [32] Murcia, L., Carrilero, B., Saura, D., Iborra, M. A., & Segovia, M. (2013). Diagnóstico y tratamiento de la enfermedad de Chagas. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 26-34.
- [33] Murta, S., Gazzinelli, R., Zigman, B., & Romanha, A. (1998). Molecular characterization of susceptible and naturally resistant strains of *Trypanosoma cruzi* to benznidazole and nifurtimox. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 203-214.
- [34] Oleinick, N. L. (2011). *BASIC PHOTSENSITIZATION*. Cleveland: Department of Radiation Oncology.
- [35] Ortega Zambrano, D., Fuentes López, D., & Mercado Uribe, H. (2022). Photoinactivation of *Escherichia coli* using five photosensitizers and the same number of photons. *Journal of Innovative Optical Health Sciences*, 1-15.
- [36] Ramsey, J. M., Peterson, A. T., Carmona-Castro, O., Moo-Llanes, D. A., Nakazawa, Y., Butrick, M., . . . Ibarra-Cerdeña, C. N. (2015). Atlas of Mexican Triatominae (Reduviidae: Hemiptera) and vector transmission of Chagas disease. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 339–352.
- [37] Salazar Juárez, G. (2019). *Tratamiento de heridas con terapia fotodinámica empleando rosa de bengala*. Puebla: Benemérita Universidad Autónoma de Puebla.
- [38] Salazar, P. M., Rojas, G., Bucio, M., Cabrera, M., García, G., Ruiz, A., . . . Tapia, R. (2006). Seroprevalence of *Trypanosoma cruzi* antibodies and associated risk factors among the population under 18 years of age in Veracruz, Mexico. *Organización Panamericana de la Salud*, 75-82.
- [39] Santos Aguirre, D. E. (2022). *Inactivación fotodinámica en la motilidad de los espermatozoides de ratón*. Guadalajara: Universidad de Guadalajara.
- [40] Satir, P. (1968). Further Studies on the Cilium Tip and a "Sliding Filament" Model of Ciliary Motility. *Journal of Cell Biology*, 77-94.
- [41] Sierra Valdez, F. J. (2011). *Estudio fenomenológico de la motilidad espermática en búsqueda del mecanismo correcto de la anestesia*. Apodaca: CINVESTAV.
- [42] Sierra Valdez, F., Cisneros Mejorado, A., Sánchez Herrera, D., & Ruiz-Suárez, J. (2012). A thermal study of cellular motility by optical time-resolved correlation. *Rev Sci Instrum*, 1-5.
- [43] Tanowitz, H. B., Kirchhoff, L. V., Simon, D., Morris, S. A., Weiss, L. M., & Wittner, M. (1992). Chagas' disease. *American Society for Microbiology*, 400-419.

- [44] Teixeira, A. R., Nascimento, R. J., & Sturm, N. R. (2006). Evolution and pathology in chagas disease--a review. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 463-491.
- [45] Urbina, J. A. (2002). Chemotherapy of Chagas Disease. *Current Pharmaceutical Design*, 287-295.
- [46] Walter, C., & Alves, M. J. (2008). Role of the gp85/trans-sialidase superfamily of glycoproteins in the interaction of *Trypanosoma cruzi* with host structures. *Sub-Cellular Biochemistry*, 58-69.
- [47] WHO. (01 de Abril de 2021). *La enfermedad de Chagas (trypanosomiasis americana)*. Obtenido de World Health Organization: [https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/chagas-disease-\(american-trypanosomiasis\)](https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/chagas-disease-(american-trypanosomiasis))
- [48] Wypych, G. (2020). Handbook of UV Degradation and Stabilization. Earswick Drive, Toronto, Canada: Chem Tec Publishing.