

## Adaptación del ensayo colorimétrico del MTT para la evaluación de la actividad frente a *Giardia duodenalis*

## Adaptation of the colorimetric MTT assay for evaluating activity against *Giardia duodenalis*

Arroyo Díaz Jaime E.<sup>1\*</sup>, Gómez Muñoz María T.<sup>2</sup>, Martínez-Díaz Rafael A.<sup>3</sup>, González-Coloma Azucena<sup>4</sup>

**RESUMEN:** *Giardia duodenalis* es un parásito protozoario flagelado cosmopolita con un amplio rango de hospedadores, incluyendo tanto animales domésticos como salvajes, así como al ser humano. Se reproduce en el intestino delgado ocasionando giardiosis, enfermedad caracterizada por producir diarrea, cólicos abdominales, pérdida de peso y malabsorción. El presente trabajo tiene como objetivo la estandarización del método colorimétrico del MTT (bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol) para la realización de ensayos de actividad in vitro frente a trofozoítos de *G. duodenalis*. El MTT ha demostrado ser útil en la determinación de productos activos frente a diversos biomodelos y un buen sustituto del recuento microscópico en la determinación de la viabilidad de los parásitos. Para adaptar este método a *G. duodenalis* se realizaron una serie de ensayos a fin de optimizar la prueba, empezando con la realización de curvas de crecimiento para observar el comportamiento de los cultivos de este protozoario. Además, se realizaron otros ensayos modificando ciertas variables como el inóculo inicial, la fase del cultivo o las concentraciones de reactivos, dando como resultado un protocolo efectivo estandarizado. Los resultados de este estudio pueden ser de gran utilidad para identificar compuestos con actividad frente a *G. duodenalis*.

**Palabras clave:** bioensayo, cultivo axénico, giardiosis, parásitos, trofozoítos.

**ABSTRACT:** *Giardia duodenalis* is a cosmopolitan flagellated protozoan parasite with a wide range of hosts, including both domestic and wild animals, as well as humans. It reproduces in the small intestine causing giardiosis, a disease characterized by diarrhea, abdominal cramps, weight loss, and malabsorption. The aim of this study is to standardize the colorimetric MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) method for in vitro assays against *G. duodenalis* trophozoites. The MTT has been shown to be useful in determining active products against various biomodels and a good substitute for microscopic counting in determining parasite viability. To adapt this method to *G. duodenalis*, a series of assays were performed to optimize the test, starting with growth curves to observe the behavior of the protozoan cultures. Multiple assays were then performed, modifying certain variables such as initial inoculum, culture phase, or reagent concentrations, resulting in an effective standardized protocol. The results of this study can be of great utility in identifying compounds with activity against *G. duodenalis*.

**Keywords:** axenic culture, biological assay, giardiosis, parasites, trophozoites.

### INTRODUCCIÓN

El protozoo *Giardia duodenalis* (syn. *G. intestinalis*, *G. lamblia*) es uno de los parásitos intestinales más comunes en los humanos. Generalmente causa una enfermedad autolimitante caracterizada por diarrea, cólicos abdominales, pérdida de peso y malabsorción. Diversas especies del género *Giardia* afectan frecuentemente a animales domésticos, incluyendo ganado, perros y gatos además de animales silvestres.

Sin embargo, la especie *G. duodenalis*, causa giardiosis en humanos y en la mayoría de los mamíferos, por lo cual la giardiosis es considerada una enfermedad zoonótica (Cama y Mathison, 2015; Dixon, 2021).

*Giardia duodenalis* es un parásito de distribución mundial, aunque especialmente prevalente en áreas con deficientes condiciones sanitarias. La mayor parte de las infecciones se adquieren a través de la ingesta de agua o alimentos contaminados con quistes, o por

<sup>1</sup>Departamento de Enfermedades Transmisibles y Salud Pública, Facultad de Medicina Veterinaria, Universidad de Panamá, Panamá. Ciudad Universitaria, Estafeta Universitaria, Apartado 3366, Panamá 4, Panamá.

<sup>2</sup>Departamento de Sanidad Animal, Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense de Madrid, Madrid, España.

<sup>3</sup>Departamento de Medicina Preventiva y Salud Pública, y Microbiología, Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Madrid, Madrid, España.

<sup>4</sup>Instituto de Ciencias Agrarias, CSIC, Madrid, España.

transmisión fecal-oral. Los quistes son excretados en las heces y pueden sobrevivir en ambientes húmedos durante períodos prolongados. Tras la ingestión los quistes dan lugar a trofozoítos que se adhieren a la mucosa intestinal generando una disrupción del borde en cepillo e interfieren con la actividad enzimática, estimulan la respuesta inflamatoria y producen la secreción de fluidos y electrolitos y el daño de los enterocitos (Hernández Torres *et al.*, 2018). En parasitosis intensas, gran parte de la mucosa del intestino delgado está tapizada por los trofozoítos produciendo atrofia de las microvellosidades y un proceso de malabsorción que da lugar a uno de los síntomas más característicos de la giardiosis que es la esteatorrea y la intolerancia a la lactosa secundaria a este efecto (Minetti, 2016; Rojas-López, 2022).

La parasitosis crónica resulta en deficiencia de vitamina A, vitamina B12 y ácido fólico. La alteración del transporte y la disfunción de la barrera epitelial son los posibles mecanismos responsables. (Bartelt y Sartor, 2015).

El diagnóstico de esta especie parásita, se realiza habitualmente mediante la observación microscópica de quistes en las heces, ya sea muestras frescas o teñidas con solución de Lugol pudiendo ser optimizada por métodos de concentración como flotación o sedimentación por centrifugación, así como realizar otras tinciones. Para aumentar la sensibilidad diagnóstica pueden efectuarse recolecciones seriadas sobre un conservante. Esta técnica tiene ciertos beneficios como bajo coste, detección simultánea de distintos parásitos y su facilidad de implementación. También se han descrito técnicas inmunológicas (ELISA) y moleculares (PCR) (Silva *et al.*, 2016).

A pesar del reconocimiento de *G. duodenalis* como un importante patógeno del humano, se han utilizado relativamente pocos agentes en la terapia. Los derivados de nitroimidazol, como el metronidazol, tinidazol y el secnidazol, han demostrado ser altamente efectivos y de bajo costo. El desarrollo de cepas de *G. duodenalis* resistentes a nitroimidazol podría ser motivo de preocupación (Argüello-García *et al.*, 2020).

Para medir la viabilidad *in vitro* de los trofozoítos de *G. duodenalis* en ensayos de actividad frente a nuevos compuestos es común realizar el recuento microscópico de trofozoítos viables utilizando la tinción de azul tripán. Este método se basa en la capacidad de la tinción de penetrar en las células no viables, mientras que las células viables permanecen sin teñir o con un tinte menos intenso (Strober, 1997). Esta técnica tiene la desventaja de requerir de tiempo para realizar el recuento de cada muestra.

El ensayo del MTT fue descrito por primera vez en 1983 por Mosmann y está basado en la reducción metabólica del bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-

2,5-difeniltetrazolio (MTT) dando lugar a la formación de cristales de formazán, mediante la actividad mitocondrial de las células. Debido a que, para la mayoría de las poblaciones celulares, la actividad mitocondrial total es directamente proporcional al número de células viables, este ensayo se utiliza para medir los efectos citotóxicos *in vitro* de drogas en líneas celulares o en cultivos celulares primarios (Mosmann, 1983; Tolosa *et al.*, 2015). Inicialmente fue diseñado para evaluar la viabilidad de células de mamíferos, sin embargo, fue optimizado por Ellis *et al.* (1993) para su uso en protozoarios, mediante ensayos con tripomastigotes de *Trypanosoma congolense* y *Trypanosoma brucei rhodesiense*. Desde aquel entonces ha aumentado la popularidad de este ensayo para evaluar la actividad de compuestos contra parásitos protozoarios.

Este ensayo se ha optimizado para diversos tipos celulares y protozoarios mediante la incorporación de sustancias como el PMS (metosulfato de fenazina), que actúa como un aceptor de electrones, y la menadiona, que desempeña el papel de agente de acoplamiento de electrones (Muelas-Serrano, 2000; Tarín Tera, 2016). En el caso específico de *G. duodenalis*, al no poseer mitocondria, no se conoce con exactitud qué enzimas pueden ser las responsables de la reducción del MTT, entre las cuales se han sugerido la piruvato ferredoxina oxidoreductasa, la  $\alpha$ -cetobutirato oxidoreductasa y la ferredoxina NAD oxidoreductasa (Bénére *et al.*, 2007).

Este estudio tiene como objetivo la estandarización del ensayo del MTT en trofozoítos de *Giardia duodenalis* para medir su viabilidad de manera precisa y reproducible con el propósito de evaluar la actividad *in vitro* de sustancias que podrían ser candidatas para el desarrollo de nuevos fármacos contra este parásito.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Para este estudio se utilizó la cepa *Giardia duodenalis* ATCC® 30957, que es la cepa WB aislada por Gillin en 1979 a partir de aspirado duodenal proveniente de un hombre de 27 años que presentó síntomas de giardiosis durante dos años y medio y se ha mantenido cultivando continuamente desde entonces (Gillin, 1987). Se utilizó el medio de Keister (1983) modificado para el cultivo de trofozoítos de *G. duodenalis in vitro* (Tabla 1).

### Soluciones, colorantes y reactivos

#### PBS (solución salina fosfatada)

- ClNa ..... 8,00 g
- PO<sub>4</sub>HNa<sub>2</sub> ..... 1,21 g
- PO<sub>4</sub>H<sub>2</sub>K ..... 0,34 g
- Agua destilada ..... 1000 ml

**Tabla 1. Composición del medio Keister modificado para el cultivo de trofozoítos de *Giardia duodenalis* in vitro.**

| Componente                   | Cantidad         | Concentración final |
|------------------------------|------------------|---------------------|
| Fosfato potásico monohidrato | 1 g              | 4,4 mM              |
| Fosfato monopotásico         | 0,6 g            | 4,4 mM              |
| Tripticasa (Peptona caseína) | 20 g             |                     |
| Extracto de levadura         | 10 g             |                     |
| D-glucosa                    | 10 g             | 56 mM               |
| NaCl                         | 2 g              | 34 mM               |
| Cisteína-HCl                 | 2 g              | 16,5 mM             |
| Ácido ascórbico              | 0,2 g            | 1,1 mM              |
| Citrato férrico              | 0,0228 g         |                     |
| Bilis Bovina                 | 0,5 g            |                     |
| Suero fetal Bovino           | 100 ml           | 10%                 |
| Vitaminas 100x GIBCO         | 10 ml            |                     |
| NaOH                         | Hasta pH 7,0-7,2 |                     |
| Agua destilada               | c.s.p. 1.0 l     |                     |

Fuente: Modificado de Keister (1983).

**Solución de SDS**

- SDS (Duchefa Biochemie)..... 10 g
- HCl ..... 31,5 µl
- Agua destilada ..... 100 ml

Durante la estandarización del método, se ensayó con múltiples soluciones compuestas por distintas concentraciones de MTT (Bromuro de 3-(4,5 dimetiliazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolio), además de la adición de distintas concentraciones de PMS (metosulfato de fenazina) o menadiona (Tabla 2).

Los cultivos de *G. duodenalis* se mantuvieron a 37 °C en tubos cónicos de polipropileno, los cuales permiten su adherencia a las paredes, que es fundamental para el crecimiento de los trofozoítos.

El cultivo está formado por una fracción adherida y otra no adherida, la fracción adherida está compuesta en su totalidad por trofozoítos viables, mientras que la

no adherida está compuesta por trofozoítos en división y trofozoítos muertos, los cuales precipitan. Para despegar la fracción adherida de la superficie del tubo, se coloca entre 0 y 4 °C por 30 a 60 minutos, pudiendo observarse al microscopio la separación completa de la superficie.

Los recambios de medio se realizan cada 48 a 72 horas, y en el caso de observarse una monocapa completa de trofozoítos en la superficie del tubo se procede a despegar los trofozoítos y a reducir su concentración a la mitad, para mantenerlos en fase de crecimiento exponencial y evitar la sobrepoblación y muerte.

**Curvas de crecimiento de *Giardia duodenalis***

Para la realización de las curvas de crecimiento se partió de tres inóculos iniciales distintos:

- Grupo A – Inóculo inicial de 10.000 trofozoítos/ml
- Grupo B – Inóculo inicial de 50.000 trofozoítos/ml
- Grupo C – Inóculo inicial de 100.000 trofozoítos/ml

Los inóculos fueron cultivados a 37°C en 1 ml de medio, realizando recuentos de trofozoítos adheridos y no adheridos por separado a las 24, 48, 72, 96 y 120 horas y por triplicado. Los recuentos fueron realizados en cámara de Neubauer, para ello se prepararon soluciones de 100 µl de cultivo, 100 µl de azul tripán y 10 µl de formol al 10%.

**Elección de reactivos a utilizar**

Con el objetivo de determinar los reactivos a utilizar se ensayaron las siguientes soluciones:

- 1,25 mg/ml MTT + 0,4 mg/ml PMS
- 2,5 mg/ml MTT + 0,4 mg/ml PMS
- 5,0 mg/ml MTT + 0,4 mg/ml PMS
- 2,5 mg/ml MTT
- 2,5 mg/ml MTT + 0,16 mg/ml menadiona

Se partió de un cultivo en fase exponencial, inoculando en una placa de 96 pocillos, una cantidad de 150 µl por pocillo en dilución seriada 1:2, partiendo de una concentración de 1,0x10<sup>6</sup> trofozoítos/ml. Se incubó por 24 horas a 37°C. Luego se retiró el medio (debido a que el medio utilizado causa una precipitación instantánea del MTT) y se agregaron 90 µl de PBS y 10 µl de la solución de MTT preparada. Se incubó por 75 minutos y se agregaron 50 µl de una

**Tabla 2. Composición de soluciones de MTT utilizadas en los ensayos de actividad frente a *Giardia duodenalis*.**

| Componente |       |       |       |       |       |       |        |       |         |
|------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|--------|-------|---------|
| PBS        | 10 ml | 10 ml | 10 ml | 10 ml | 10 ml | 10 ml | 10 ml  | 10 ml | 10 ml   |
| MTT        | 50 mg | 25 mg | 25 mg | 25 mg | 25 mg | 25 mg | 25 mg  | 25 mg | 12,5 mg |
| PMS        | 4 mg  | 8 mg  | 6 mg  | 4 mg  | 2 mg  | 1 mg  | 0      | 0     | 4 mg    |
| Menadiona  | 0     | 0     | 0     | 0     | 0     | 0     | 1,6 mg | 0     | 0       |

solución de SDS para disolver los cristales formados. Se midió la absorbancia en un espectrofotómetro a 570 nm. La decisión de los reactivos a utilizar (así como la de los siguientes parámetros) se basó en la diferencia máxima de absorbancias obtenidas con relación a la absorbancia blanco, tal y como se muestra en las tablas y corroborando que hubiera correlación positiva entre los diferentes tamaños de inóculo y los valores de absorbancia obtenidos.

**Determinación de momento de siembra**

Con el objetivo de determinar si utilizar cultivos en fase exponencial o estacionaria, se sembró una cantidad de 150 µl por pocillo en dilución seriada 1:2 por triplicado a partir de cultivos de 24 y 72 horas respectivamente, partiendo de una concentración de 1,0x10<sup>6</sup> trofozoítos/ml.

Se repitió el procedimiento descrito en el apartado anterior para el ensayo de MTT y de igual manera la decisión del momento de siembra se basó en la diferencia máxima de absorbancias obtenidas con relación a la absorbancia blanco, indicando de esta manera en qué fase los trofozoítos llevan a cabo una mayor reducción del MTT.

**Tabla 3. Curvas de crecimiento de *Giardia duodenalis*.**

| Grupo | Horas | Adheridos (Trofozoítos/ml) | No adheridos (Trofozoítos/ml) | Total (Trofozoítos/ml) |
|-------|-------|----------------------------|-------------------------------|------------------------|
| A     | 0     |                            |                               | 1,00E+04               |
| A     | 24    | 6,67E+03                   | 5,00E+03                      | 1,17E+04               |
| A     | 48    | 4,60E+04                   | 2,25E+04                      | 6,85E+04               |
| A     | 72    | 8,83E+04                   | 5,50E+04                      | 1,43E+05               |
| A     | 96    | 2,40E+05                   | 2,20E+05                      | 4,60E+05               |
| A     | 120   | 3,50E+05                   | 1,70E+05                      | 5,20E+05               |
| B     | 0     |                            |                               | 5,00E+04               |
| B     | 24    | 1,87E+05                   | 4,00E+04                      | 2,27E+05               |
| B     | 48    | 4,80E+05                   | 1,85E+05                      | 6,65E+05               |
| B     | 72    | 5,09E+05                   | 1,90E+05                      | 6,99E+05               |
| B     | 96    | 5,18E+05                   | 2,40E+05                      | 7,58E+05               |
| B     | 120   | 5,85E+05                   | 2,13E+05                      | 7,98E+05               |
| C     | 0     |                            |                               | 1,00E+05               |
| C     | 24    | 2,95E+05                   | 1,08E+05                      | 4,03E+05               |
| C     | 48    | 5,98E+05                   | 3,50E+05                      | 9,48E+05               |
| C     | 72    | 7,21E+05                   | 2,48E+05                      | 9,69E+05               |
| C     | 96    | 7,28E+05                   | 2,45E+05                      | 9,73E+05               |
| C     | 120   | 7,90E+05                   | 2,48E+05                      | 1,04E+06               |

**Establecimiento de inóculo inicial y determinación de concentraciones de reactivos**

Con el objetivo de determinar la concentración de trofozoítos a inocular y la concentración de MTT a utilizar, se repitió el ensayo explicado en los apartados anteriores, en este caso utilizando los siguientes inóculos iniciales: 100.000, 250.000, 500.000, 750.000 y 1.000.000 trofozoítos/ml.

Utilizando una concentración de PMS constante en todos los casos de 4,0 mg/ml y las siguientes concentraciones de MTT:

- 1,25 mg/ml MTT
- 2,5 mg/ml MTT
- 5,0 mg/ml MTT

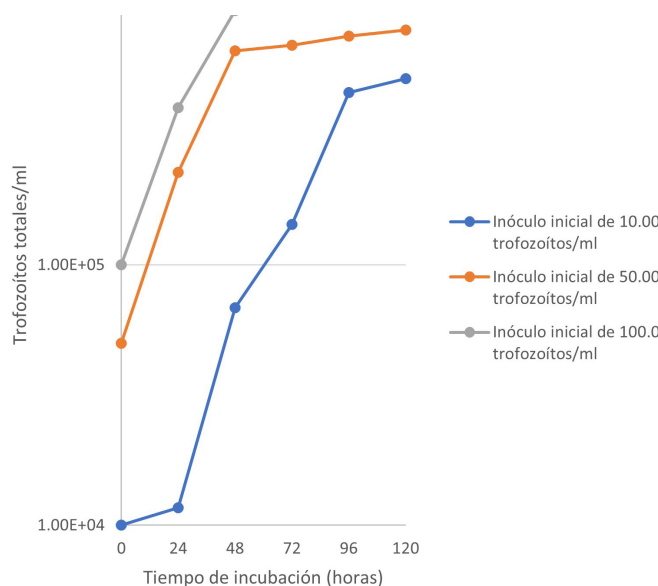
Luego, habiendo definido la concentración de MTT e inóculo inicial, se repitió el mismo procedimiento utilizando una concentración de MTT constante de 2,5 mg/ml y las siguientes concentraciones de PMS:

- 0,1 mg/ml PMS
- 0,2 mg/ml PMS
- 0,4 mg/ml PMS
- 0,6 mg/ml PMS
- 0,8 mg/ml PMS

**RESULTADOS**

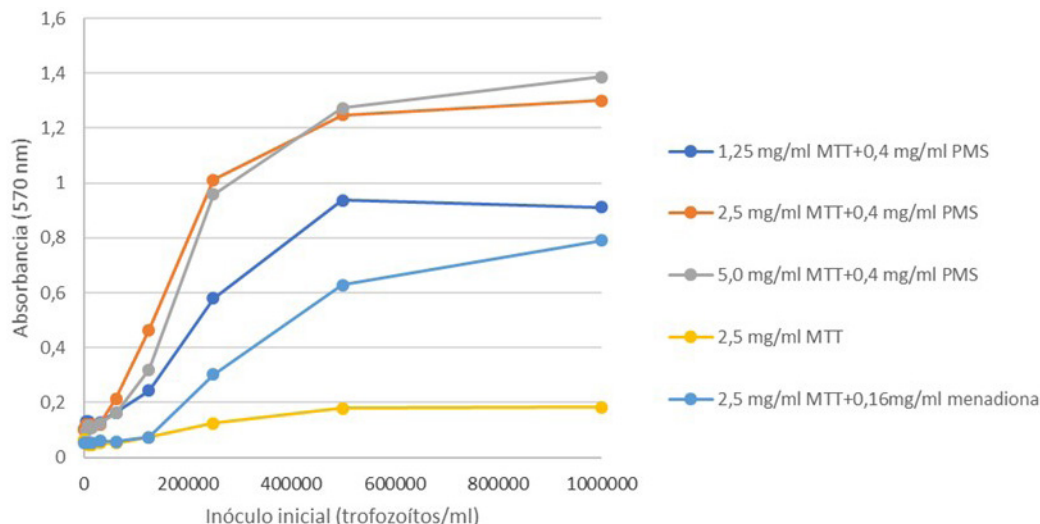
**Curvas de crecimiento de *Giardia duodenalis***

En la Tabla 3 y Figura 1 se observan los resultados obtenidos a partir de cada uno de los inóculos iniciales y el protocolo descrito previamente.

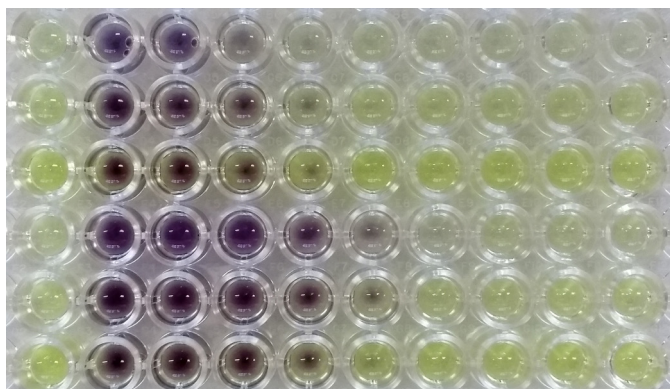


**Figura 1.** Curvas de crecimiento de *Giardia duodenalis* a partir de diferentes inóculos iniciales.





**Figura 2.** Absorbancias registradas con diferentes reactivos y distintas concentraciones. MTT (1,25 mg/ml, 2,5 mg/ml, 5,0 mg/ml), PMS (0.4 mg/ml), menadiona (0.16 mg/ml).



**Figura 3.** Ensayo del MTT con cultivos de *Giardia duodenalis* en fase estacionaria y fase exponencial. Las tres filas superiores corresponden a concentraciones crecientes de MTT (1,25 mg/ml, 2,5 mg/ml y 5,0 mg/ml de arriba hacia abajo) ensayadas en el cultivo en fase estacionaria, mientras que las tres filas inferiores corresponden a las mismas concentraciones de MTT ensayadas en el cultivo en fase exponencial. La primera columna es el blanco, las siguientes corresponden a concentraciones decrecientes del inóculo inicial en dilución 1:2 de izquierda a derecha.

**Elección de reactivos a utilizar**

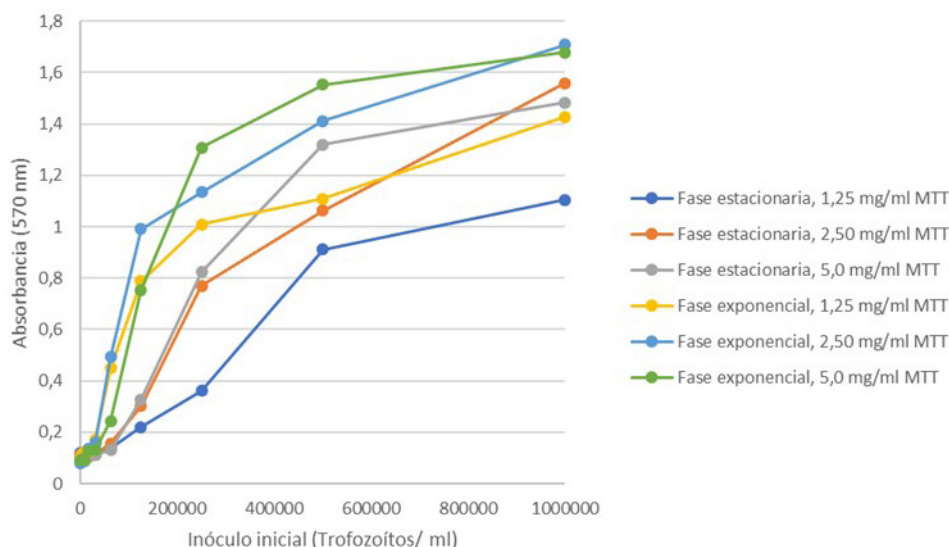
En la figura 2 se observan los resultados de absorbancia obtenidos en cada uno de los ensayos realizados.

**Determinación de momento óptimo de siembra**

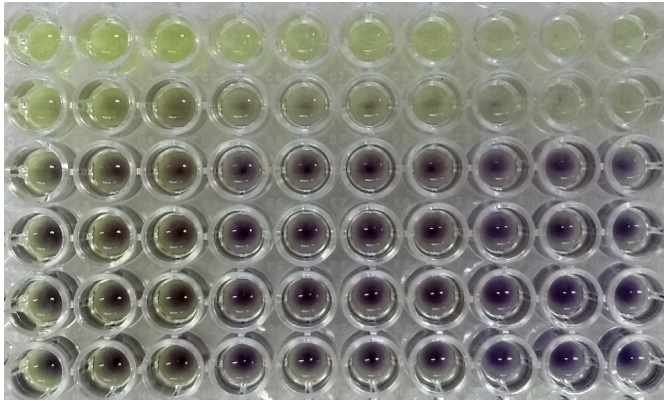
En la figura 3 se observan los resultados de la reacción del MTT en los ensayos realizados. En la figura 4 se observan los resultados de absorbancia obtenidos en cada uno de los ensayos realizados.

**Establecimiento de inóculo inicial y determinación de concentraciones de reactivos**

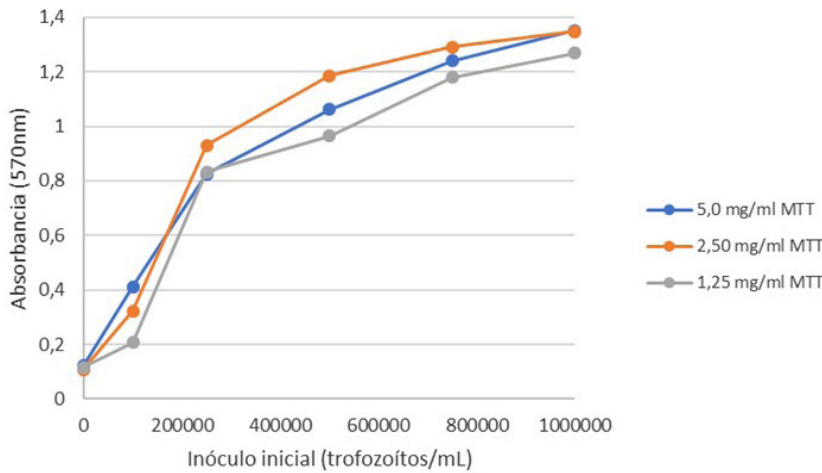
En la figura 5 se observan los resultados de la reacción a cada una de las concentraciones de MTT ensayadas. En las figuras 6 y 7 se observan los resultados de absorbancia obtenidos a cada una de las concentraciones de PMS ensayadas.



**Figura 4.** Absorbancias registradas con cultivos de *Giardia duodenalis* en fase estacionaria y exponencial con distintas concentraciones de MTT (1,25 mg/ml, 2,5 mg/ml, 5,0 mg/ml).



**Figura 5.** Ensayo con distintos inóculos iniciales de *Giardia duodenalis* y concentraciones de MTT. En las tres primeras columnas de pocillos se utilizó una concentración de 5.0 mg/ml de MTT, en las cuatro columnas siguientes se utilizó una concentración de 2.5 mg/ml de MTT y en las tres últimas columnas se utilizó una concentración de 1.25 mg/ml de MTT. Las filas corresponden a inóculos crecientes de trofozoítos (0, 100.000, 250.000, 500.000, 750.000 y 1.000.000, respectivamente)



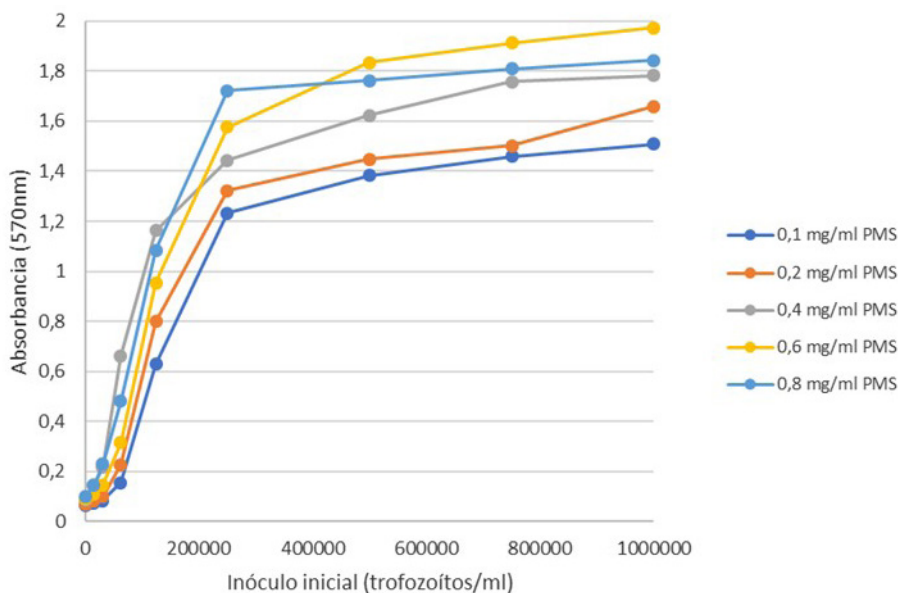
**Figura 6.** Absorbancias registradas a partir de inóculos de *Giardia duodenalis* y concentraciones de MTT utilizadas.

**Resumen del protocolo resultante**

A continuación, se expone el protocolo óptimo resultante tras las pruebas iniciales realizadas:

1. Inóculo inicial de 1.000.000 de trofozoítos/ml en 150 µl (150.000 trofozoítos totales), en fase de crecimiento exponencial (24 a 48 horas) en placa multipocillos con fondo en "U".
2. Incubar durante 24 horas a 37°C (Con fármaco a evaluar).

3. Retirar cuidadosamente el medio de cada pocillo en su totalidad.
4. Agregar 90 µl de PBS y 10 µl de solución de 2,5 mg/ml de MTT + 0,6 mg/ml de PMS en cada pocillo.
5. Incubar por 75 minutos a 37°C en oscuridad.
6. Agregar 50 µl de la solución de SDS en cada pocillo.
7. Incubar en oscuridad durante 30 minutos.
8. Lectura de absorbancias en espectrofotómetro a 570 nm.



**Figura 7.** Absorbancias registradas a partir de diferentes inóculos iniciales de *Giardia duodenalis* y concentraciones de PMS (0,1 mg/ml, 0,2 mg/ml, 0,4 mg/ml, 0,6 mg/ml, 0,8 mg/ml) utilizadas.

## DISCUSIÓN

Puesta a punto del método de reducción del MTT para los ensayos de actividad

El método de reducción del MTT resulta más rápido, preciso y fiable que el recuento microscópico de trofozoítos viables, sin embargo, requiere de una adecuada adaptación al microorganismo en cuestión, en este caso *Giardia duodenalis*, así como una especial atención al diseño del ensayo y a la interpretación de los resultados, lo cual ha sido uno de los objetivos de este trabajo.

### Curvas de crecimiento

Tras la realización de curvas de crecimiento de *G. duodenalis* se observó que la fase de crecimiento exponencial tiene una duración de 48 horas tras las cuales el cultivo entra en la fase estacionaria y crece de manera marcadamente más lenta. Estos resultados coinciden con las curvas de crecimiento realizadas por Farthing y colaboradores (1985) al estudiar el efecto de la suplementación del medio de cultivo de *G. duodenalis* con sales biliares.

Además, se observó que con tres inóculos distintos el comportamiento del cultivo es muy similar, únicamente variando en las concentraciones de trofozoítos alcanzadas.

### Elección de reactivos a utilizar

Con el objetivo de decidir con qué reactivos dar inicio a los ensayos se realizó una primera prueba, con el fin de determinar principalmente si supone alguna ventaja el uso de un transportador intermediario de electrones como el PMS, que ha sido utilizado tanto en *G. duodenalis* (Carvalho *et al.*, 2014), como en *Trypanosoma cruzi* (Muelas-Serrano, 2000), la Menadiona, que mostró mejores resultados en *Phytomonas davidi* que el ya mencionado PMS (Tarín Tera, 2016), o no utilizar un transportador intermediario de electrones como también se ha visto en ensayos con *G. duodenalis* (Singh *et al.*, 2016). Como se observó en los resultados, se obtuvieron absorbancias notablemente más altas utilizando PMS, por lo que se decidió el uso de este aceptor de electrones en los ensayos siguientes, al igual que fue descrito en el protocolo empleado por Carvalho *et al.* (2014).

### Determinación de momento de siembra

Con respecto al momento adecuado para transferir los cultivos en masa a la placa de microtitulación y añadir los productos a ensayar, se determinó que entre 24 y 48 horas, que corresponden a la fase de crecimiento exponencial, es cuando se observó una mayor formación de cristales de formazán por parte de los trofozoítos de *G. duodenalis*. Además, debido a que con este protocolo se busca ensayar la actividad de productos activos, es preferible que los parásitos se

encuentren en fase exponencial de crecimiento, donde mantendrán sus rutas metabólicas activas, las cuales son potenciales dianas para la acción de compuestos con actividad frente a *G. duodenalis*.

### Establecimiento de inóculo inicial y determinación de concentraciones de reactivos

Se ensayó con distintos inóculos iniciales y concentraciones de MTT y PMS con el fin de optimizar al máximo la prueba y determinar con qué inóculo y concentración de reactivos se alcanzaba una mayor absorbancia en relación con el blanco, y que además presentara una correlación positiva con la cantidad de trofozoítos en el cultivo. Tomando en cuenta ambos parámetros se estableció que el inóculo inicial óptimo es de  $1,0 \times 10^6$  trofozoítos/ml utilizando concentraciones de 2,5 mg/ml de MTT y 0,6 mg/ml de PMS. Sin embargo, cabe mencionar que a partir de inóculos de 500.000 se obtienen resultados similares, al igual que podrían utilizarse concentraciones de 0,2 a 0,8 mg/ml de PMS sin influir excesivamente en los resultados.

### Protocolo resultante

El protocolo resultante, descrito en el apartado anterior, ha demostrado ser muy útil, como se pudo corroborar con los ensayos de actividad de aceites esenciales y productos, además de ser un ensayo bastante sencillo y una excelente alternativa al recuento microscópico de trofozoítos viables mediante el uso de azul tripán.

En el caso de *G. duodenalis*, como se pudo comprobar y está descrito por Bénéré *et al.* (2007), al agregar la solución del MTT directamente en el medio de cultivo, ocurre una conversión espontánea del MTT, por lo cual en el caso específico de *G. duodenalis*, a diferencia de otros parásitos, hay que retirar cuidadosamente el medio, reemplazándolo por una solución de PBS. Por tal razón solo se consideró la fracción adherida de trofozoítos. Esto no afectará al resultado de la prueba ya que la fracciones adherida y no adherida se intercambian continuamente durante el cultivo y se consideran una población dinámica (Ghosh *et al.*, 2001; Bénéré *et al.*, 2007).

Se recomienda realizar el mismo procedimiento de retirar el medio en los pocillos "blanco" para así contemplar cualquier conversión inespecífica del MTT que pueda ocurrir. Además, se recomienda que la solución de PBS con la que se reemplace el medio esté previamente atemperada a 37°C con el fin de evitar despegar los trofozoítos de *G. duodenalis* y de esta manera interrumpir con su actividad y retrasar la formación de cristales de formazán.

### CONCLUSIONES

El ensayo colorimétrico del MTT es un método eficaz para llevar a cabo ensayos de actividad frente



a trofozoítos de *Giardia duodenalis*, ya que permite descartar de forma rápida y segura aquellos productos sin potencial interés. Esta prueba resulta ser más rápida, precisa y simple una vez estandarizada, que los tradicionales recuentos microscópicos de trofozoítos viables mediante el uso de azul tripán.

El rápido crecimiento de los cultivos de *G. duodenalis*, como fue observado en la realización de las curvas, permite llevar a cabo este ensayo de manera relativamente rápida en comparación a otros parásitos de crecimiento más lento como *T. cruzi*.

El uso del PMS como aceptor de electrones contribuye a una mayor eficacia de la prueba en el caso de *G. duodenalis*, como también se ha observado en ensayos con otros protozoos como *T. cruzi*.

### LITERATURA CITADA

Argüello-García, R., Leitsch, D., Skinner-Adams, T. y Ortega-Pierres, M. G. (2020). Drug resistance in *Giardia*: mechanisms and alternative treatments for giardiasis. *Advances in Parasitology*, 107, 201-282.

Bartelt, L. A. y Sartor, R. B. (2015). Advances in understanding *Giardia*: determinants and mechanisms of chronic sequelae. *F1000prime reports*, 7.

Bénére, E., da Luz, R. A. I., Vermeersch, M., Cos, P. y Maes, L. (2007). A new quantitative in vitro microculture method for *Giardia duodenalis* trophozoites. *Journal of Microbiological Methods*, 71(2), 101-106.

Cama, V. A., y Mathison, B. A. (2015). Infections by intestinal coccidia and *Giardia duodenalis*. *Clinics in laboratory medicine*, 35(2), 423-444.

Carvalho, T. B. D., Oliveira-Sequeira, T. C. G. y Guimarães, S. (2014). In vitro antigiardial activity of the cysteine protease inhibitor E-64. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, 56(1), 43-47.

Dixon, B. R. (2021). *Giardia duodenalis* in humans and animals—transmission and disease. *Research in veterinary science*, 135, 283-289.

Ellis, J. A., Fish, W. R., Sileghem, M. y McOdimba, F. (1993). A colorimetric assay for trypanosome viability and metabolic function. *Veterinary Parasitology*, 50(1-2), 143-149.

Farthing, M. J., Keusch, G. T. y Carey, M. C. (1985). Effects of bile salts on growth and membrane lipid uptake by *Giardia lamblia*. Possible implications for pathogenesis of intestinal disease. *The Journal of Clinical Investigation*, 76(5), 1727-1732.

Ghosh, S., Frisardi, M., Rogers, R. y Samuelson, J. (2001). How *Giardia* swim and divide. *Infection and Immunity*, 69(12), 7866-7872.

Gillin, F. D. (1987). *Giardia lamblia*: the role of conjugated and unconjugated bile salts in killing by human milk. *Experimental Parasitology*, 63(1), 74-83.

Hernández Torres, A., García Vázquez, E., Moral Escudero, E., Herrero Martínez, J., & Gómez Gómez, J. (2018). Parasitosis con manifestaciones clínicas

gastrointestinales. *Medicine-Programa de Formación Médica Continuada Acreditado*, 12(58), 3403-3408.

Keister, D. G. (1983). Axenic culture of *Giardia lamblia* in TYI-S-33 medium supplemented with bile. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 77, 487-488.

Minetti, C., Chalmers, R. M., Beeching, N. J., Probert, C., & Lamden, K. (2016). Giardiasis. *Bmj*, 355.

Mosmann, T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods*, 65(1-2), 55-63.

Muelas-Serrano, S., Nogal-Ruiz, J. J. y Gómez-Barrio, A. (2000). Setting of a colorimetric method to determine the viability of *Trypanosoma cruzi* epimastigotes. *Parasitology Research*, 86(12), 999-1002.

Rojas-López, L., Marques, R. C., & Svärd, S. G. (2022). *Giardia duodenalis*. *Trends in Parasitology*.

Silva, R. K., Pacheco, F. T., Martins, A. S., Menezes, J. F., Costa-Ribeiro Jr, H., Ribeiro, T. C., Mattos, A., Oliveira, R., Soares, N. y Teixeira, M. C. (2016). Performance of microscopy and ELISA for diagnosing *Giardia duodenalis* infection in different pediatric groups. *Parasitology International*, 65(6), 635-640.

Singh, G., Arora, A., Mangat, S. S., Rani, S., Kaur, H., Goyal, K., Sehgal, R., Kumar Maurya, I., Tewari, R., Choquesillo-Lazarte, R., Sahoo, S. y Kaur, N. (2016). Design, synthesis and biological evaluation of chalconyl blended triazole allied organosilatrane as giardicidal and trichomonocidal agents. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 108, 287-300.

Strober, W. (1997). Trypan blue exclusion test of cell viability. *Current protocols in immunology*, 21(1), A-3B.

Tarín Tera, R. (2016). Adaptación del método colorimétrico del MTT a los ensayos de actividad sobre *Phytomonas sp.* (Tesis de Maestría). Universidad Autónoma de Madrid, España.

Tolosa, L., Donato, M. T. y Gómez-Lechón, M. J. (2015). General cytotoxicity assessment by means of the MTT assay. *Protocols in in vitro hepatocyte research*, 333-348.

Recibido: 9 de junio de 2023

Aceptado: 25 de septiembre de 2023