



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

UNIDAD MONTERREY

Herramientas computacionales para el estudio de la dinámica de
infección de *T. cruzi* en cultivo celular

Tesis que presenta

Daniel Alejandro Hernández Mendoza

para obtener el Grado de

Maestro en Ciencias

en Ingeniería y Física Biomédicas

Directores de Tesis:

Dr. Moisés Santillán Zerón

Dr. Jesús Manuel Santana Solano

Apodaca, Nuevo León

agosto de 2023

Para mi familia.

Sin ellos, yo no sería la persona que soy hasta hoy.

Agradecimientos

Agradezco a mis padres por su apoyo incondicional, cariño y amor. Por que siempre me han alentado en alcanzar mis objetivos, e inspirado a ser una mejor persona cada día.

A mis hermanas, porque nuestra amistad y cariño siempre ha perdurado, por estar siempre unidos y contar con su apoyo en todo momento, aún cuando hemos comenzado a tomar caminos diferentes.

A mis asesores, el Dr. Moisés Santillán y el Dr. Jesús Santana, por darme la oportunidad de hacer y aprender de este proyecto, y por preocuparse de mi formación profesional y nunca dejar de lado también la parte personal. Por tenerme siempre paciencia y amabilidad, incluso en momentos complicados. Por darme la libertad de encontrar mi forma de trabajar y aprender, y también enseñarme el camino de la investigación y la ciencia.

A mis amigos del CINVESTAV Monterrey, por todas las tardes de reuniones, salidas, pláticas entretenidas, consejos, y su bonita amistad.

A los profesores del CINVESTAV Monterrey, por su pasión al enseñar y fomentar el aprendizaje, su amabilidad y consejos para la ciencia y la vida.

A todos los miembros del CINVESTAV Monterrey, por hacer de esta institución un gran lugar para trabajar.

A la Dra. Rebeca Manning por recibirme en su laboratorio durante mi estancia de investigación, y a su grupo de trabajo, Claudia, David, Eloy, Anahí e Itzel, por enseñarme de todo en tan breve periodo de tiempo y tratarme como uno más del grupo.

A CONAHCYT (antes CONACYT), por el apoyo económico que me permitió desarrollar por completo la maestría y realizar la estancia de investigación.

Índice general

Resumen	1
Abstract	3
1. Introducción	4
2. Antecedentes	7
2.1 La enfermedad de Chagas	7
2.1.1 <i>Trypanosoma cruzi</i>	7
2.1.2 Vectores triatomíneos	9
2.1.3 Cuadro clínico	10
2.1.4 Dinámica de infección de <i>T. cruzi</i>	12
2.2 Análisis y Procesamiento de Imágenes	13
2.3 Modelos basados en agentes y autómatas celulares	16
3. Justificación	19
4. Hipótesis	20
5. Objetivo General	20
6. Objetivos particulares	20
7. Metodología	21
7.1 Datos de muestras biológicas	21
7.2 Desarrollo de un algoritmo de procesamiento de imágenes para la cuantificación de parásitos intracelulares	22
7.2.1 Localización de núcleos celulares	23
7.2.2 Algoritmo de segmentación y conteo de parásitos	30
7.3 Desarrollo de un algoritmo de simulación de crecimiento e infección de cultivo celular	34
7.3.1 Algoritmo de crecimiento	35
7.3.2 Algoritmo de infección	36
8. Resultados	42
9. Discusión	60
10. Conclusiones	72
11. Perspectivas	73

12.	Referencias	75
13.	Anexo	80

Índice de Figuras

Figura 1. Representación gráfica de una célula epimastigote (a), tripomastigote (b) y amastigote (c) de <i>T. cruzi</i> , con indicaciones de sus estructuras intracelulares (Díaz y González, 2014).	7
Figura 2. Esquema sobre el ciclo reproductivo e infeccioso del agente etiológico de la enfermedad de Chagas, <i>Trypanosoma cruzi</i> (modificado de CDC, 2019).	9
Figura 3. Representación de la digitalización de una imagen. Izq.: Imagen continua proyectada en un sensor. Der.: Resultado de la imagen digitalizada. (González y Woods, 2002).	14
Figura 4. Esquema de la aproximación al estudio de la dinámica de infección intracelular mediante el problema inverso.	16
Figura 5. Representación gráfica del espacio de un autómatas celular, donde se representan la vecindad (azul) de von Neumann (izquierda) y de Moore (derecha) de un elemento (rojo) (Lehotzky y Zupanc, 2019).	18
Figura 6. Micrografía de fluorescencia de un cultivo de infección de <i>T. cruzi</i> a los 11 días de infección de la línea celular H9c2(2-1) (Arias del Ángel <i>et al.</i> 2020).	22
Figura 7. Esquema general del procesamiento de imágenes para la cuantificación de parásitos intracelulares.	23
Figura 8. Esquema representativo del mejoramiento de imagen para cuantificación de parásitos y los criterios de conteo.	31
Figura 9. Esquema representativo del módulo de segmentación general. Este módulo, con ligeras modificaciones, sirve para la segmentación de núcleos y de parásitos.	32
Figura 10. Representación gráfica del espacio del autómatas y de los estados ausente y presente de las células en el mismo.	34
Figura 11. Esquema del algoritmo de crecimiento celular en cultivo. Los parámetros incluyen: tamaño N de la matriz NxN, tamaño M de la población inicial, valor de probabilidad de división y tiempo total de cultivo o simulación.	36
Figura 12. Representación gráfica del espacio de simulación con células infectadas (rojo).	37

Figura 13. Esquema de los elementos de infección simulados en el modelo, numerados en el orden en que ocurren en el programa. Para los pasos 2 y 3, se indicaron con círculos verdes las celdas/células afectadas.	39
Figura 14. Ejemplos de resultados de segmentación de núcleos para cada línea celular analizada. Estas imágenes no son representativas de todas las analizadas debido a la heterogeneidad de estas.	46
Figura 15. Gráficos de núcleos detectados por campo a cada día de cultivo de infección de cada línea celular analizada, las barras de error representan la desviación estándar.	47
Figura 16. Imagen representativa de un cultivo de infección de 11 días, con secciones marcadas para el conteo manual y mediante el algoritmo de conteo.	48
Figura 17. Ejemplificación del proceso de asignación de parásitos a cada núcleo celular. Se puede observar que en algunos casos no se cuantifican parásitos, ya que el área celular (amarillo, algunos ejemplos) asignada es inferior a la real, en otros casos se cuentan parásitos de las células aledañas. Izq.: Imagen antes del procesamiento. Der.: Imagen con el resultado de segmentación y conteo.....	50
Figura 18. Histogramas de función de densidad de probabilidad de parásitos por célula en el día 18 de infección de las líneas analizadas (20 intervalos).	51
Figura 19. Resultados de simulación de crecimiento de las líneas celulares con los parámetros optimizados.....	52
Figura 20. Resultados de simulación de los tipos de infección analizada para las líneas H9c2(2-1) (superior) y 3T3 NIH (inferior). Izq.: Infección por Contacto (IC). Der.: Infección por Parásito Libre (IPL).	55
Figura 21. Resultados de simulación de ambos tipos de infección (IPL e IC) para las líneas celulares H9c2(2-1) (izq.) y 3T3 NIH (der.).	56
Figura 22. Distribución de parásitos por célula normalizados en los días 3, 5 y 9 de las líneas celulares H9c2(2-1) (izq.) y 3T3 NIH (der.) con los parámetros de infección optimizados (n = 100).	58
Figura 23. Comparación de la distribución de parásitos por célula para el día 9 de infección obtenido a partir de imágenes (izq.) y simulaciones (der.) para las líneas H9c2(2-1) y 3T3 NIH.	59

Índice de Tablas

Tabla 1. Resultados de conteo manual contra el conteo realizado por el programa para la línea H9c2(2-1).	43
Tabla 2. Resultados de conteo manual contra el conteo realizado por el programa para la línea 3T3 NIH.	44
Tabla 3. Resultados de conteo manual contra el conteo realizado por el programa para la línea 3T3 S.	44
Tabla 4. Resultados de conteo manual contra el conteo realizado por el programa para la línea Caco2.....	45
Tabla 5. Resultados de la prueba del algoritmo de conteo contrastado con conteo manual en una imagen representativa.....	49
Tabla 6. Resultados de la prueba del algoritmo de conteo contrastado con conteo manual en una imagen representativa en el canal azul.....	49
Tabla 7. Parámetros de crecimiento optimizados para cada línea celular analizada.....	53
Tabla 8. Parámetros de infección global optimizados para las líneas H9c2(2-1) y 3T3 NIH.	57

Resumen

Durante la fase crónica de la enfermedad de Chagas (EC), los pacientes desarrollan complicaciones en el corazón e intestino en los casos más avanzados de la enfermedad. A pesar de que *T. cruzi*, el agente etiológico de la EC es capaz de infectar prácticamente todas las células nucleadas, aún no se conoce con claridad porqué estos dos órganos se ven especialmente afectados. En este trabajo se desarrollaron herramientas computacionales para estudiar la dinámica de infección a nivel de cultivo celular, a partir de resultados experimentales de trabajos previos, e intentar elucidar el papel de los elementos de infección: por parásito libre, por interacción entre células infectadas-no infectadas y la tasa de crecimiento intracelular de los parásitos. Una de las herramientas, un programa de análisis de imágenes de microscopía de fluorescencia tomadas de cultivos celulares infectados permitió cuantificar los núcleos de células de mamífero y los parásitos intracelulares, así como las distribuciones de parásitos por célula, aunque la precisión del programa no se evaluó bajo criterios similares a los de otros trabajos. La otra herramienta, un modelo computacional de tipo autómatas celular, permitió replicar las cinéticas de infección de cultivos celulares y obtener distribuciones de parásitos por célula a partir de las simulaciones. Los resultados de las simulaciones sugieren que la infección por interacción de cercanía entre células infectadas y no infectadas podría tener un papel más relevante que la infección por parásito libre en la cinética de infección en cultivo celular. Las distribuciones de parásitos permitieron obtener un valor asociado a la tasa de crecimiento intracelular de parásitos, sin embargo, no se encontraron diferencias evidentes entre dos líneas celulares con alta eficiencia de infección. Estas herramientas resultarán útiles para estudiar los resultados derivados de futuros experimentos en la búsqueda de comprender los elementos que dan lugar a las manifestaciones clínicas durante la etapa crónica de la EC.

Abstract

In the chronic phase of the Chagas Disease (CD), patients develop heart and gut complications in advanced cases of the disease. Although *T. cruzi*, etiologic agent of the CD, can infect almost every nucleated cell, it is not clear the reason these two organs are specially affected. In this work, we develop computational tools for the study of infection dynamics at cell culture level, from the use of previous experimental data, and try to elucidate the role of these infection elements: infection by free parasite, infected to non-infected cell infection and parasite intracellular growth rate. One of the tools, a fluorescence microscopy image analysis program, allowed to quantify mammal cell nuclei and intracellular parasites, as well as parasite per cell distributions, although program precision was not evaluated by similar criteria as from other works. The other tool, a cellular automata computational model, allowed to replicate cell culture infection kinetics and obtain parasite per cell distributions from simulations. Simulations results suggest that infected to non-infected cell infection might be more relevant than free parasite infection in cell culture infection kinetics. Parasite per cell distributions allowed to obtain a parasite intracellular growth rate-associated value, however, we couldn't find evident differences between two cell lines with high infection efficiency. These tools will be useful for the analysis of results from future experiments in the understanding of elements that give place to clinical manifestations in chronic phase of CD.

1. Introducción

La enfermedad de Chagas o tripanosomiasis americana es una de las enfermedades tropicales desatendidas más importantes en América Latina. La enfermedad recibe su nombre del médico investigador brasileño Carlos Ribeiro Justiniano Chagas en 1909. En la última década, el agente etiológico, *Trypanosoma cruzi*, distribuido a través de sus vectores triatomíneos, se ha expandido de forma global, con un estimado de 8 a 11 millones de personas infectadas. Se encuentra de forma endémica principalmente en 21 países de América Latina. Debido a la movilización a nivel global, la detección de la infección se ha incrementado en Estados Unidos, y países europeos, africanos, del Este Mediterráneo y del Pacífico Oeste (WHO, 2022; CDC, 2022). En México, se estima que cerca de 4 – 6 millones de personas están infectados con el agente etiológico, y casi 30 millones de personas están en riesgo de infección, basado en muestreos de donaciones de sangre, en las tasas de natalidad, en los casos por año, y en la distribución estimada del vector, aunque la información epidemiológica a nivel nacional es escasa, y la revisión de la enfermedad en pacientes no se incluye en las encuestas de salud seroepidemiológicas nacionales (Ramsey *et al.*, 2015; Arnal *et al.*, 2019).

Durante el proceso infectivo en mamíferos, todos los tipos de células nucleadas en el hospedero son blancos potenciales de infección, sin embargo, se observa una infección y respuesta inflamatoria exacerbada de forma común en el miocardio y el tracto intestinal. Se desconocen las causas y mecanismos precisos de la afectación particular de estos tejidos durante la etapa crónica de la enfermedad de Chagas.

Además de las aproximaciones experimentales, se han desarrollado diferentes estrategias teóricas y computacionales para el estudio del proceso infectivo de *T. cruzi*, por ejemplo, usando modelos de ecuaciones diferenciales o modelos basados en agentes, con el objetivo de estudiar diversos aspectos como la

interacción con el sistema inmune, la distribución entre sistemas de órganos, e incluso la distribución en poblaciones humanas (de Freitas *et al.*, 2018). En particular, los modelos basados en agentes pueden resultar interesantes para el estudio de procesos a nivel de células individuales. Estos consisten en modelar un sistema como una colección de entidades capaces de tomar decisiones de forma autónoma denominadas agentes. Cada agente evalúa de forma individual su situación y toma decisiones con base en un conjunto de reglas. Los agentes pueden ejecutar comportamientos diversos que sean apropiados para el sistema que deben representar (Bonabeau, 2002). Estos modelos son útiles ya que a partir de la interacción de agentes individuales surgen comportamientos que difícilmente pueden ser analizados cuando se estudian las partes del sistema por separado. Debido a la complejidad multifactorial de la enfermedad de Chagas, el uso de estos modelos puede resultar de suma utilidad para el estudio de esta enfermedad a diferentes niveles.

A pesar de la utilidad de los modelos teóricos y computacionales en la indagación y entendimiento de los procesos que simulan, resulta imperativo que se basen en datos experimentales. Una de las herramientas de laboratorio más útiles en la investigación biomédica durante las últimas décadas es la microscopía de fluorescencia. Esta tecnología permite aprovechar la epifluorescencia para diversas aplicaciones, como estudios de expresión y coexpresión de proteínas, localización de biomoléculas membranales o intracelulares, estudio de procesos infecciosos (López-Macay *et al.*, 2016), entre otros. En este último caso particular, la microscopía de fluorescencia puede resultar de suma utilidad para generar datos experimentales de los procesos infectivos de *T. cruzi*, ya sea *in vivo* o *in vitro*, con los que entrenar a los modelos computacionales. Sin embargo, además de la generación de imágenes de fluorescencia, es necesario el desarrollo de metodologías de procesamiento de imágenes, que involucren su mejoramiento, restauración,

procesamiento de colores, procesamiento morfológico, segmentación y reconocimiento (Gonzalez y Woods, 2002), entre otros.

Tomando en cuenta esta información, en este proyecto se propone el desarrollo de herramientas computacionales, específicamente un modelo basado en agentes del tipo autómata celular para simular la dinámica de infección, y una metodología de procesamiento de imágenes de microscopía de fluorescencia generadas a partir de cultivos de infección de *T. cruzi*, para entrenar el modelo, y estudiar así los procesos de infección de *T. cruzi* en cultivo celular.

2. Antecedentes

2.1 La enfermedad de Chagas

2.1.1 *Trypanosoma cruzi*

El agente etiológico de la enfermedad de Chagas es el parásito protista *Trypanosoma cruzi*, un miembro de la familia Trypanosomatidae. La principal característica celular de *T. cruzi*, de la familia Trypanosomatidae y del orden Kinetoplastida es el cinetoplasto. Esta estructura es una región especializada de la mitocondria que porta el DNA mitocondrial más complejo e inusual encontrado en la naturaleza. Se localiza cerca del cuerpo basal del flagelo, y la posición relativa del cinetoplasto-flagelo al núcleo permite clasificar los estadios de vida de la célula (Figura 1) (Cavalcanti y de Souza, 2018).



Figura 1. Representación gráfica de una célula epimastigote (a), tripomastigote (b) y amastigote (c) de *T. cruzi*, con indicaciones de sus estructuras intracelulares (Díaz y González, 2014).

Las tripanosomátides (células de *T. cruzi*) pasan por cambios de hospedero entre insectos y mamíferos a lo largo de su ciclo de vida, con cambios en el estadio de desarrollo en un proceso que se denomina diferenciación protozoaria o transformación (de Souza *et al.*, 2010). El ciclo de vida se resume en la Figura

2, comenzando por el escenario donde un insecto infectado pica a un hospedero y deposita sus heces con tripomastigotes metacíclicos en la herida o mucosas del individuo después de ingerir la sangre. Los tripomastigotes metacíclicos penetran a las células en el sitio de la herida y se transforman en amastigotes. Aquí los amastigotes se multiplican por fisión binaria en las células de los tejidos infectados. A partir de cierto punto, los amastigotes intracelulares se transforman en tripomastigotes no replicativos, que se liberan de la célula y entran en el flujo sanguíneo. Estos tripomastigotes pueden infectar otras células repitiendo el ciclo, lo que deriva en las manifestaciones clínicas. La infección se propaga en las poblaciones cuando un insecto triatomino se alimenta de un individuo infectado. Aquí, los tripomastigotes que sobreviven a la digestión entran en el hospedero invertebrado y se transforman en la forma replicativa epimastigote en el intestino anterior, donde se reproducen. Posteriormente, en el intestino posterior, los epimastigotes se transforman en tripomastigotes metacíclicos infectivos que serán depositados en otro sitio de picadura, para reiniciar el ciclo de propagación e infección (CDC, 2019).

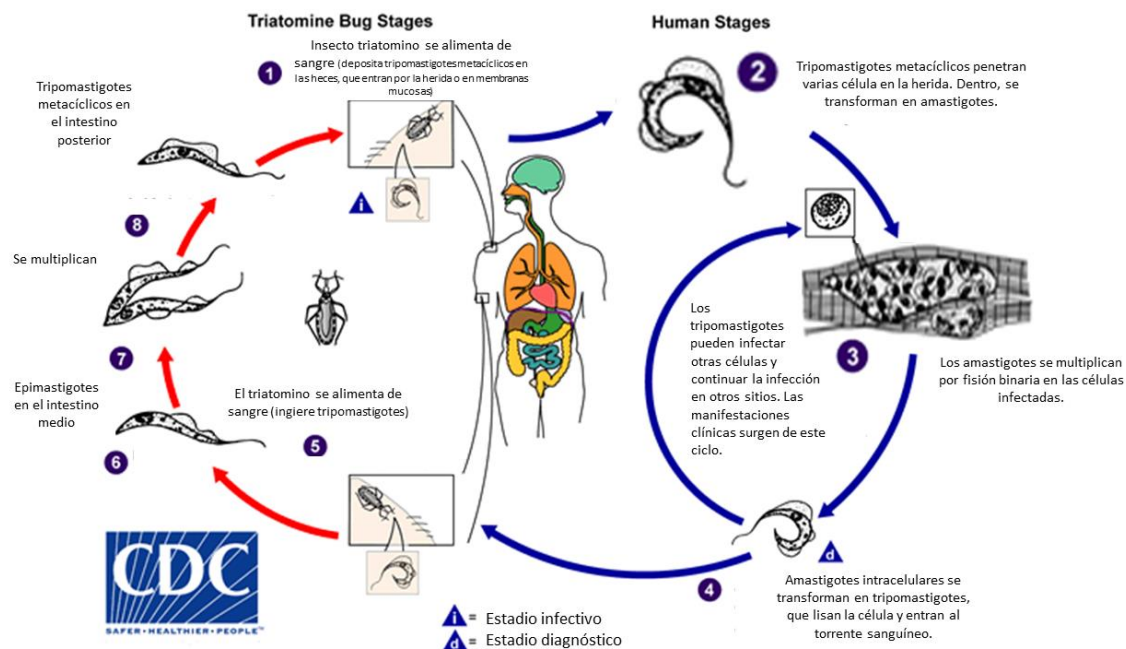


Figura 2. Esquema sobre el ciclo reproductivo e infeccioso del agente etiológico de la enfermedad de Chagas, *Trypanosoma cruzi* (modificado de CDC, 2019).

Se ha demostrado que todos los estadios de *T. cruzi* son capaces de realizar una infección exitosa *in vitro*, aunque con diferencias en la eficiencia. *In vivo*, se ha demostrado que solo los tripomastigotes y amastigotes son capaces de establecer una infección, y que utilizan mecanismos diferentes para la entrada a la célula durante la primera interacción (Rodríguez-Bejarano *et al.*, 2021).

2.1.2 Vectores triatominos

Para completar el ciclo antes mencionado, *T. cruzi* requiere de ciertos insectos para fungir de vectores y permitir llegar a su hospedero mamífero. Se han identificado tres principales insectos que fungen de vectores, pertenecientes a la subfamilia Triatominae: *Triatoma infestans*, *Triatoma dimidiata* y *Rhodnius prolixus*, los cuales son insectos chupasangre de mamíferos, incluidos humanos. Debido a que sus hábitats no se encuentran lejos de asentamientos humanos, suelen picar en la noche, depositando las heces en el lugar de picadura y

comenzando el proceso infectivo (Hidayat *et al.* 2017). Con base en estudios de nicho ecológico, se ha encontrado que las 3 especies más relevantes para la transmisión del agente etiológico en México son *Triatoma longipennis*, *Triatoma mexicana* y *Triatoma barberi* (Ramsey *et al.*, 2015).

2.1.3 Cuadro clínico

2.1.3.1 General

Una vez que el parásito cruza del vector hospedero al humano, se puede desarrollar la patología. La enfermedad de Chagas se diferencia en dos etapas principales, aguda y crónica, y una intermedia donde hay ausencia de síntomas denominada indeterminada durante la cual se detectan pocos o ningún parásito en la sangre y seropositividad para *T. cruzi*. Muchas personas permanecen asintomáticas de por vida y nunca desarrollan síntomas relacionados con la enfermedad. Sin embargo, hasta un 30 – 40% de las personas en etapa crónica desarrollarán problemas severos y que pongan en riesgo la vida durante su vida, sobre todo manifestaciones cardíacas o gastrointestinales (CDC, 2019; García-Huertas y Cardona-Castro, 2021).

2.1.3.2 Etapa aguda

La fase aguda ocurre inmediatamente posterior a la infección, y puede durar desde semanas hasta meses. Durante la etapa aguda, se puede presentar una lesión en la piel con endurecimiento retrasado (chagoma) en el sitio de inoculación del hospedero inmunocompetente, pero no en pacientes inmunocomprometidos carentes de respuesta inmune celular. Los síntomas posibles incluyen fiebre, fatiga, dolores corporales, dolor de cabeza y sarpullido, los cuales no son exclusivos de la enfermedad de Chagas e incluso pueden no presentarse, por lo que puede pasar desapercibido. Los signos que se pueden presentar incluyen agrandamiento leve del hígado o bazo, y el más reconocido es el signo de Romaña, o inflamación del párpado en el lado de la cara cerca de la picadura o el contacto con las heces. Rara vez se presenta

inflamación severa del músculo cardíaco o el cerebro y su recubrimiento durante la infección aguda. Las muertes en pacientes con enfermedad de Chagas en etapa aguda usualmente se reportan debido a fallas cardíacas y/o meningitis o encefalitis. Los parásitos se pueden encontrar en la sangre circulante (Teixeira *et al.*, 2006; CDC, 2022).

2.1.3.3 Etapa indeterminada

Una vez que merma la etapa aguda, se entra en la etapa indeterminada. Algunos criterios de esta fase son i) ensayo positivo para anticuerpos IgG o demostración parasitológica, ii) ausencia de síntomas y signos de la enfermedad, iii) ausencia de anormalidades del ECG, iv) tamaño regular del corazón, esófago y colon por rayos X. La mayoría de los pacientes en etapa indeterminada abarcan de los 20 a 50 años, implicando cerca de 12 millones de personas con pruebas inmunológicas positivas para el parásito, y normalmente se identifican durante las entrevistas de trabajo y muestreos de bancos de sangre. Los individuos infectados de forma crónica permanecen como una fuente de parásitos de por vida como una fase intermediaria de reservorio. De estos individuos, un tercio desarrollará la enfermedad crónica (Teixeira *et al.*, 2006).

2.1.3.4 Etapa crónica

Cuando un individuo entra en la fase crónica de la enfermedad, las manifestaciones que ponen en riesgo la vida son el fallo cardíaco, arritmias y tromboembolismo. El agrandamiento del corazón es un signo ominoso en pacientes de Chagas, que conlleva un mal pronóstico (Teixeira *et al.*, 2006). Las complicaciones cardíacas más comunes son la dilatación ventricular y disfunción del ventrículo izquierdo, aneurisma, insuficiencia cardíaca congestiva, tromboembolismo, arritmias ventriculares y muerte cardíaca súbita (Mora, 2016), mostrando síntomas como fatiga, disnea, edema en piernas, tobillos, pies o abdomen, dolor de pecho y palpitaciones fuertes y/o rápidos del

corazón (MayoClinic, 2022). También se pueden presentar complicaciones intestinales como megaesófago o megacolon, que causan dificultades para comer o defecar (CDC, 2022).

2.1.4 Dinámica de infección de *T. cruzi*

El desarrollo de la patología es producto de la reproducción intracelular del parásito, la lisis celular y de la interacción con el sistema inmune en todo el organismo. *T. cruzi* posee la capacidad de infectar la gran mayoría de células nucleadas (Fernandes y Andrews, 2012). Sin embargo, la enfermedad suele derivar en complicaciones cardíacas, digestivas o ambas, sobre lo cual no se tiene claro por qué estos dos órganos tienen este desarrollo exacerbado en la enfermedad.

Con el objetivo de estudiar la dinámica de la infección, Arias del Ángel *et al.* (2020) realizaron un estudio donde analizaron cinéticas de infección de *T. cruzi* en diversas líneas celulares, utilizando un modelo matemático para entender las posibles componentes de esta relación. A partir de sus resultados, observaron, entre otros aspectos, que hay una componente de infección por interacción célula infectada – célula no infectada que podría ser relevante para el avance global de la infección a nivel de cultivo. Otro resultado interesante observado en este trabajo es que las líneas celulares se infectaron con diferencias notables, en particular la línea Caco2, que se origina de cáncer colorrectal humano y es un tipo de célula epitelial, alcanzó un porcentaje de infección total muy bajo en comparación a la línea H9c2(2-1), que corresponde a mioblastos embrionarios de rata. Estos resultados no se corresponden del todo con lo que se esperaría a partir de los reportes clínicos, donde el corazón y el intestino se ven muy dañados. Esto puede deberse a diversas razones, aquí sugerimos dos: que la infección sola de las células no explica en gran medida la evolución patológica, o que esa línea en particular no es el mejor modelo para el estudio de este proceso infeccioso. Una vez identificada la línea celular de mejor

representación, acorde con las observaciones clínicas, puede surgir el cuestionamiento de si los parásitos crecen a tasas significativamente diferentes entre diferentes tipos celulares, y si esto puede tener un impacto en la patología general. Para esto, en primer lugar, se requiere poder rastrear la cantidad de parásitos por célula durante el tiempo de infección, lo cual supone una tarea complicada y laboriosa, debido a la necesidad de analizar durante 18 días, tomando como ejemplo la aproximación del trabajo antes mencionado, en el cual, utilizaron una cepa recombinante de *T. cruzi* (CL Brener) generada en el trabajo de Florencio-Martínez *et al.* (2010), que expresa de forma constitutiva el gen de la proteína verde fluorescente mejorada (enhanced Green Fluorescent Protein, eGFP), aprovechando esta fluorescencia y la tinción del DNA con 4',6-diamino-2-fenilindol (DAPI) para generar las imágenes de microscopía de fluorescencia con las cuales obtener datos de cinéticas de infección. Sin embargo, para extraer la información de las imágenes, realizaron un conteo manual rudimentario, lo cual puede ser extenuante o inviable, especialmente cuando se trata del conteo de los parásitos presentes a lo largo del tiempo del cultivo de infección. La mejor aproximación a esta tarea es mediante el procesamiento de imágenes.

2.2 Análisis y Procesamiento de Imágenes

Para entender cómo el procesamiento de imágenes puede servir para la cuantificación de parásitos, es necesario entender la composición de las imágenes. Estas pueden tratarse como una función $f(x,y)$ de dos variables continuas x y y , que digitalmente se transforman en una matriz de números discretos, donde cada elemento de la matriz (pixel) tiene una posición y valor (nivel de gris) definida (Figura 3).

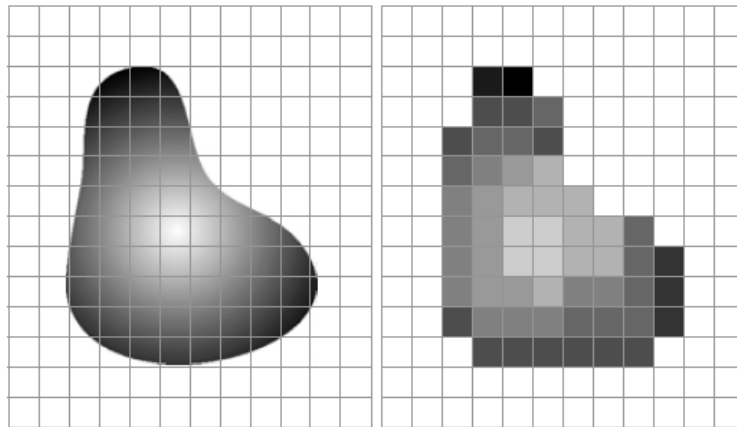


Figura 3. Representación de la digitalización de una imagen. Izq.: Imagen continua proyectada en un sensor. Der.: Resultado de la imagen digitalizada. (González y Woods, 2002).

El procesamiento de imágenes se divide en diversas clases, como el mejoramiento, identificación morfológica, la segmentación y reconocimiento. Las técnicas de análisis de imágenes permiten procesar numerosas imágenes de forma que la información se extraiga de la forma más automática posible (da Silva y Mendonça, 2005). Las imágenes pueden ser de suma utilidad para obtener información de procesos biológicos que pueden ser imposibles de apreciar para el ojo humano, ya sea por su escala espacial o temporal, o por la densidad de información que pueden contener. Para extraer esta información, es posible requerir de un mejoramiento previo, lo que permite resaltar características que son relevantes para el análisis. El procesamiento morfológico provee de herramientas que permiten extraer componentes de la imagen útiles para representar y describir la forma de los objetos de la imagen, como puede ser células o estructuras subcelulares. Los procedimientos de segmentación parten la imagen en sus constituyentes u objetos, y en general, es una de las tareas más complicadas del procesamiento de imágenes. Finalmente, el reconocimiento permite asignar etiquetas a un objeto basado en la descripción que se le pueda hacer, por ejemplo, diferenciar entre tipos celulares

diferentes con base en su morfología o estructura interna (González y Woods, 2002).

Gracias a las amplias posibilidades de las imágenes y del procesamiento de imágenes para extraer información, la bioimagineología ha explotado en los últimos años como un recurso para obtener datos biológicos que de otra forma sería imposible observar o analizar, en particular apoyado de la microscopía. Sin embargo, el desarrollo de algoritmos y software usualmente se ve limitado en la utilidad o aplicabilidad, llevando a un malgasto de tiempo y recursos, pues el desarrollo suele ser aplicable solo al caso de estudio de un grupo de trabajo particular (Carpenter *et al.*, 2012). Por esta razón, el desarrollo de herramientas generales y que puedan ser utilizadas en diversas aplicaciones es de suma importancia en el avance de la investigación.

Obtener una herramienta que permita cuantificar la cantidad de parásitos por célula a partir de las imágenes de microscopía de cultivos de infección permitiría obtener las distribuciones de parásitos por célula, sin embargo, aún queda identificar cuál es la tasa de crecimiento que permite observar estas distribuciones.

A pesar de contar con dichas distribuciones, es imposible deducir directamente a partir de estas la tasa de crecimiento de los parásitos, ya que provienen de cultivos diferentes. Esto puede ser resuelto a partir de la concepción del *problema inverso* (Figura 4), donde, a partir de un conjunto de datos experimentales, se desarrolla un modelo que permita emular interacciones en el sistema (en este caso, el cultivo celular en infección), se optimiza sus parámetros a partir de los datos, y, finalmente, se interpreta el significado real de esos parámetros y el papel de las interacciones emuladas en la dinámica del sistema real. Por lo tanto, el modelo utilizado debe ser uno que permita obtener las distribuciones de parásitos por célula a lo largo del cultivo.

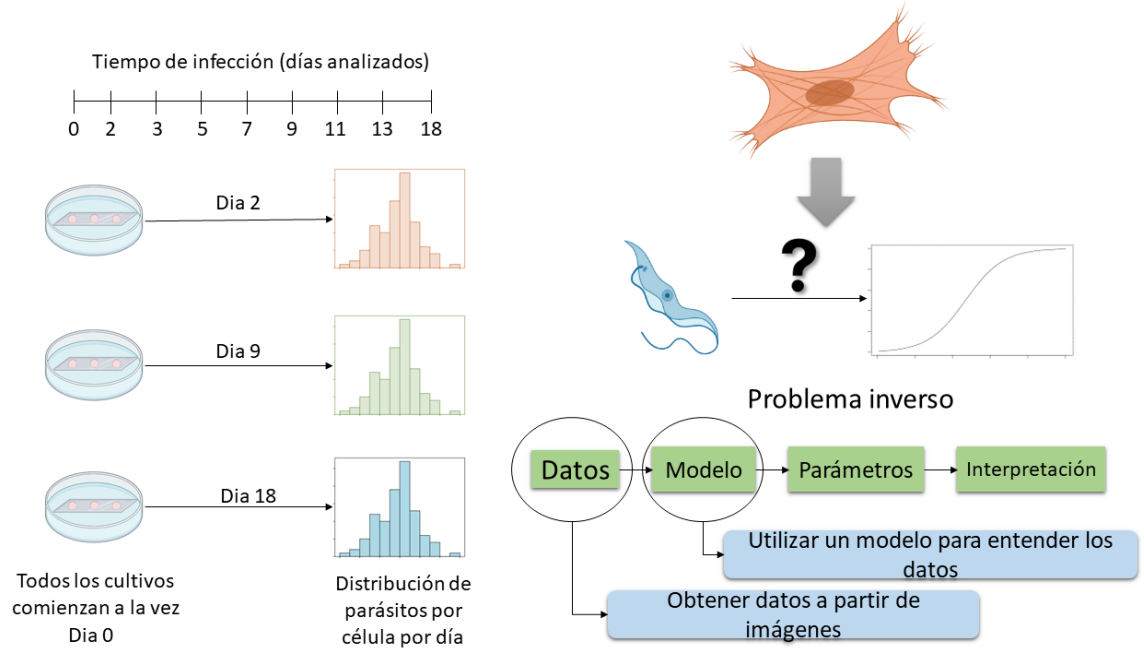


Figura 4. Esquema de la aproximación al estudio de la dinámica de infección intracelular mediante el problema inverso.

Un tipo de modelaje que facilitaría extraer información de los datos de estos experimentos, entre otros, es el modelaje basado en agentes, en particular, el modelo del autómatas celular.

2.3 Modelos basados en agentes y autómatas celulares

En el modelaje basado en agentes, el sistema de estudio se modela como una colección de agentes, entidades individualmente capaces de evaluar su situación y tomar decisiones con base en reglas establecidas. Este tipo de modelaje depende del poder computacional para explorar una dinámica que puede ser difícil de observar en los modelos matemáticos puros, y permite observar comportamientos que solo pueden surgir cuando los agentes interactúan. Por ejemplo, el comportamiento individual es no lineal, y puede caracterizarse con umbrales, reglas si-entonces, o acoplamiento no lineal, y en general, la discontinuidad en el comportamiento individual es difícil de modelar con

ecuaciones diferenciales. En ocasiones el comportamiento individual requiere memoria, dependencia del camino tomado y correlaciones temporales. Las ecuaciones diferenciales tienden a suavizar las fluctuaciones. El promedio, en ocasiones, no es de utilidad, y amplificar las fluctuaciones puede ser útil, ya que un sistema puede ser linealmente estable pero inestable a grandes perturbaciones (Bonabeau, 2002). En el modelaje de sistemas celulares, como puede ser un cultivo celular o un tejido, el modelo debe tomar en cuenta las interacciones de células individuales en su ambiente local y de forma global (Lehotzky y Zupanc, 2019). Los modelos de ecuaciones diferenciales, en particular los que se basan en la ley de acción de masas, asumen que el sistema está bien mezclado, lo cual no siempre se cumple, como en un cultivo celular donde las células están estáticas. Las células tienen limitada el área o las células con las que pueden interactuar, por lo que esta suposición es errónea.

Los autómatas celulares son un tipo de modelo matemático de naturaleza discreta en tiempo, espacio y estado. La forma más común de representar el espacio es una malla que contiene a los agentes (de forma discreta), los cuales pueden tomar uno de un conjunto finito de valores determinados por reglas que involucran el estado de otros agentes en la vecindad. En general, un autómata celular puede reproducir el mismo comportamiento global que un modelo continuo de ecuaciones diferenciales, pero provee una mejor percepción de los principios de interacción local que conducen al comportamiento global (Lehotzky y Zupanc, 2019). Sin embargo, el análisis matemático mediante ecuaciones diferenciales está mucho más desarrollado que las estrategias de análisis basadas en autómatas celulares, por lo que es más fácil entender las relaciones entre los parámetros del sistema y el comportamiento global en los primeros.

En la Figura 5 se muestra una representación gráfica de autómatas celulares. En particular, se puede observar los tipos de vecindad que se pueden seleccionar al

momento de realizar un modelo. El estado que tendrá la celda o célula central dependerá de los estados de la vecindad y de las reglas establecidas, por lo que el comportamiento puede ser heterogéneo en distintas zonas del sistema.

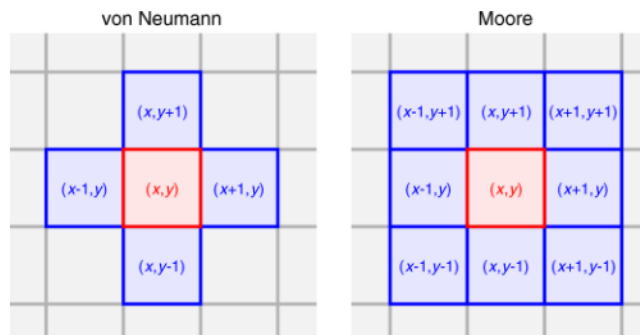


Figura 5. Representación gráfica del espacio de un autómata celular, donde se representan la vecindad (azul) de von Neumann (izquierda) y de Moore (derecha) de un elemento (rojo) (Lehotzky y Zupanc, 2019).

Por lo tanto, mediante un autómata celular se podría emular tanto el proceso de infección de células por cada parásito libre en el medio, la interacción entre células infectadas y no infectadas sugerida por Arias del Ángel *et al.* (2020), y obtener las distribuciones de parásitos por célula durante cada instante de tiempo.

3. Justificación

El incremento en la propagación de la enfermedad de Chagas a nivel global pone en riesgo a la población en general. Al ser una enfermedad tropical desatendida, las investigaciones sobre la misma son limitadas, y, por lo tanto, también el desarrollo de estrategias de prevención y atención basadas en datos confiables sobre la fisiopatología de esta, en comparación de otras enfermedades presentes en países desarrollados. Aportar herramientas útiles para la investigación de los procesos asociados a la infección y la evolución de la enfermedad es de suma relevancia para facilitar el desarrollo de dichas estrategias.

La aproximación de Arias del Ángel *et al.* (2020) en el estudio de la dinámica de infección de *T. cruzi* resultó en conclusiones y perspectivas interesantes. Este trabajo pretende desarrollar herramientas que permitan obtener y analizar información de datos experimentales de dicho trabajo y de otros a futuro, y, de ser posible, aportar indicios o evidencia sobre los elementos de infección que explican la cinética y dinámica de infección en cultivo celular de *T. cruzi*.

4. Hipótesis

La infección por interacción entre células infectadas-no infectadas y la tasa de replicación intracelular de parásitos tienen un papel relevante en la cinética y dinámica de infección de *T. cruzi* a nivel de cultivo.

5. Objetivo General

Analizar el papel de la infección por interacción entre células infectadas-no infectadas y la tasa de replicación intracelular de parásitos en la infección global de *T. cruzi* en cultivo celular.

6. Objetivos particulares

1. Cuantificar la distribución de parásitos por célula en imágenes de cultivos de infección de *T. cruzi*.
2. Simular las cinéticas de cultivos de infección de *T. cruzi* y analizar el papel de interacción entre células infectadas-no infectadas y la tasa de replicación intracelular en la infección global a nivel de cultivo.

7. Metodología

7.1 Datos de muestras biológicas

Para el desarrollo del algoritmo de procesamiento de imágenes para la cuantificación de parásitos intracelulares, se utilizarán las imágenes generadas en el trabajo de Arias del Ángel et al. (2020), que abarcan un lapso de 18 días de infección. Debido a que en los últimos días de infección resulta imposible asignar los parásitos a una célula en particular, solo podrán aprovecharse algunos días para la distribución de parásitos por célula. En la Figura 6 se muestra un ejemplo de micrografía de cultivo de infección. Cada color, o canal según el sistema RGB (Red, Green, Blue), en la imagen corresponde a la micrografía tomada al excitar el agente fluorescente, en este caso, azul para DAPI (canal B), y verde para la GFP de los parásitos (canal G). Las estructuras circulares grandes en el canal azul corresponden al DNA nuclear (los núcleos) de las células, mientras que las estructuras más pequeñas corresponden al DNA de los parásitos, o posiblemente artefactos de la tinción. Por otro lado, cada estructura circular en el canal verde corresponde a un parásito, visible por la GFP que expresa, por lo que, como se ve en la Figura 6, una célula contiene una gran cantidad de parásitos. Además, algunas células, y principalmente en etapas avanzadas de la infección, contienen tripomastigotes de *T. cruzi* cuya forma se esquematizó en la Figura 1a. Esta etapa resulta particularmente difícil de cuantificar, incluso de forma manual. Aquí usaremos el término ‘célula’ para los núcleos y células de mamífero en las imágenes, y el término ‘parásito’ para referirnos ya sea al DNA o a la GFP de las células del parásito.

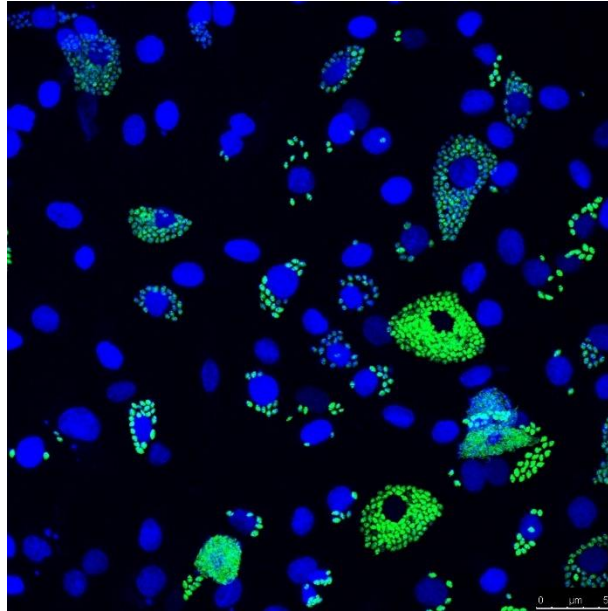


Figura 6. Micrografía de fluorescencia de un cultivo de infección de *T. cruzi* a los 11 días de infección de la línea celular H9c2(2-1) (Arias del Ángel *et al.* 2020).

7.2 Desarrollo de un algoritmo de procesamiento de imágenes para la cuantificación de parásitos intracelulares

El programa de análisis de imágenes se desarrolló en el lenguaje de programación IDL. Las imágenes en formato JPEG se separaron en sus componentes del sistema RGB.

En la Figura 7 se muestra, de forma general, el procesamiento aplicado para la cuantificación de parásitos intracelulares por célula. Inicialmente, se localizaron las coordenadas en la imagen de cada núcleo celular, se identificó la vecindad de la célula (o el área tentativa que abarca la célula) y se cuantificaron los posibles parásitos intracelulares. Este proceso se desarrolló de forma automática (sin requerir de intervención una vez que se introducen los parámetros) y procesando múltiples imágenes.

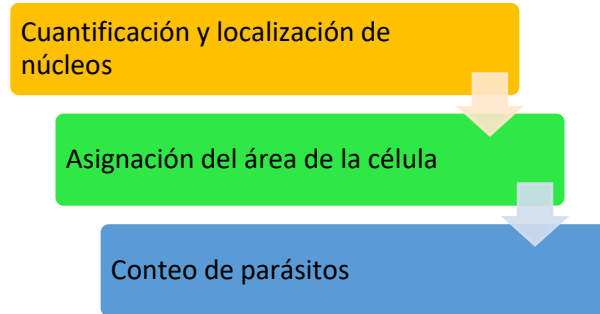


Figura 7. Esquema general del procesamiento de imágenes para la cuantificación de parásitos intracelulares.

7.2.1 Localización de núcleos celulares

Para identificar la posición en la imagen de los núcleos celulares, se requiere segmentarlos para poder identificar el punto central de los mismos. Esto requiere a su vez un mejoramiento previo de la imagen, que facilite la segmentación. La mayoría de las imágenes de microscopía tienen un ruido de fondo, inherente a los dispositivos de adquisición del microscopio. Para eliminar este ruido, se aplicaron una variedad de filtros, los cuales se especifican a continuación para cada conjunto de imágenes provenientes de diferentes líneas celulares, ya que sus propiedades de calidad digital varían.

Los tratamientos utilizados para el mejoramiento de las imágenes son los siguientes (González y Woods, 2002):

Binarización: Se utiliza un umbral específico en la escala de 0 a 255, por lo que todos los píxeles con nivel de gris inferior a ese valor se volverán 0, y los restantes 1. Esto generará una imagen en blanco y negro.

Erosión: Con la imagen binarizada, se cambia el nivel de gris de 1 a 0, de los píxeles cuya vecindad se ajuste a una máscara definida, en este caso de 3x3 con los vecinos de Von Neuman con valor de 1. Para una imagen a blanco y negro, aplicar la erosión elimina la capa de píxeles más externa de una colección continua de píxeles, utilizando la máscara anterior.

Corrección gama: A cada píxel se le aplica la siguiente operación de coma flotante:

$$f(x, y) = g(x, y)^\gamma$$

donde γ es el valor de corrección. Aplicar la corrección gama permite modificar los niveles de gris o de brillantez de los píxeles más o menos brillantes respecto al resto de píxeles. Por ejemplo, en el caso de los núcleos, que se espera sean más brillantes que el fondo, aplicar una corrección gamma permite volver aún más brillantes los núcleos respecto al fondo, pero también aumenta la brillantez del fondo.

Filtro contra armónico: A cada píxel se le aplica la siguiente operación:

$$f(x, y) = \frac{\sum_{(s,t) \in S_{xy}} g(s, t)^{Q+1}}{\sum_{(s,t) \in S_{xy}} g(s, t)^Q}$$

donde f es la imagen procesada, (x, y) son coordenadas de píxeles en la imagen, g es la imagen original, (s, t) son coordenadas de píxeles contenidos en la subimagen S_{xy} alrededor de (x, y) con tamaño de matriz 3X3. Q es la potencia que determina el nivel de filtrado de la imagen. Aplicar el filtro contra armónico permite eliminar el ruido de tipo sal y pimienta, en particular, el ruido tipo sal con Q negativo, y el ruido tipo pimienta con Q positivo. El ruido tipo sal genera puntos blancos aleatorios en la imagen, mientras que el ruido tipo pimienta genera puntos negros aleatorios en la imagen.

Filtro de histograma: Reasignar el valor de 0 a todos los píxeles cuyo nivel de gris sea el más alto en un histograma de niveles de gris dentro de un rango de niveles de gris. Ej.: si en el rango de niveles de gris de 1 – 200, el nivel de gris más alto en el histograma es 188, todos los píxeles con ese nivel de gris se reasignan a 0. Aplicar el filtro de histograma permite eliminar los píxeles más abundantes de un nivel o rango de niveles de gris dado.

Filtro de mediana: A cada píxel se le aplica la siguiente operación:

$$f(x, y) = \underset{(s, t) \in S_{xy}}{\text{mediana}} \{g(s, t)\}$$

Aplicar el filtro de mediana ocasiona que los niveles de gris de una vecindad sean más homogéneos (tengan la mediana de la vecindad, incluido el píxel a modificar), por lo que se “suaviza” la imagen. Es útil para ruido de tipo sal y pimienta.

Resta de canales: Se realiza la resta del valor de cada pixel de la misma posición en ambas matrices (canal azul – canal verde), previa conversión de la matriz en números de punto flotante, lo que permite obtener valores negativos. Los valores negativos se reasignan a 0 y la matriz se reconvierte en bytes.

A cada conjunto de imágenes de las 4 líneas celulares se les aplicaron uno o más de los tratamientos anteriores. El orden y las especificaciones se describen a continuación:

Línea celular H9c2

1. Resta de canales.
2. Corrección gama con $\gamma = 0.25$.
3. Filtro de histograma con rango de 1 – 200 aplicado 5 veces.
4. Filtro contra armónico con $Q = -2.5$.
5. Binarización con umbral 0.
6. Erosión aplicada 4 veces.

Línea celular 3T3 NIH

1. Identificar en el histograma delimitado en el rango de 1 – 255 el nivel de gris con mayor frecuencia.
2. Si este valor es mayor a 250,000:
 - a. Resta de canales.

- b. Filtro de histograma con rango de 1 – 50 aplicado 15 veces.
 - c. Filtro contra armónico con $Q = -1.5$.
3. De lo contrario:
- a. Resta de canales.
 - b. Filtro de histograma con rango de 1 – 50 aplicado 15 veces.
 - c. Corrección gama con $\gamma = 0.25$.

Línea celular 3T3 S

1. Identificar en el histograma delimitado en el rango de 1 – 255 el nivel de gris con mayor frecuencia.
2. Si este valor es mayor a 150,000:
 - a. Resta de canales.
 - b. Filtro de histograma con rango de 1 – 200 aplicado 15 veces.
 - c. Filtro contra armónico con $Q = -1.5$.
3. De lo contrario:
 - a. Resta de canales.
 - b. Filtro de histograma con rango de 1 – 50 aplicado 15 veces.
 - c. Filtro de mediana.
 - d. Corrección gama con $\gamma = 0.25$.

Línea celular Caco2

1. Identificar en el histograma delimitado en el rango de 1 – 255 el nivel de gris con mayor frecuencia.
2. Resta de canales.
3. Si el valor obtenido en el paso 1 es mayor a 59,000:
 - a. Filtro de histograma con rango de 1 – 150 aplicado 15 veces.
4. De lo contrario:
 - a. Filtro de histograma con rango de 1 – 50 aplicado 15 veces.
5. Corrección gama con $\gamma = 0.25$.

Segmentación de núcleos en el canal azul

Una vez que la imagen fue mejorada, se utilizó un algoritmo creado por John C. Crocker (Universidad de Chicago, 1996), el cual permite identificar y medir estructuras medianamente circulares en una imagen. A grandes rasgos, el algoritmo consiste en identificar la posición de todos los máximos locales (píxeles con el mayor nivel de gris) definidos en una vecindad circular con diámetro determinado en la imagen. Alrededor de cada máximo, se coloca una máscara circular de diámetro determinado y se calculan las coordenadas del centroide, la suma de todos los píxeles, el radio de giro y la excentricidad de los píxeles en la máscara. Si el máximo local inicial se encuentra a más de 0.5 píxeles del centroide, la máscara se mueve y se recalculan los datos, lo cual es útil para datos ruidosos. Si las restricciones anteriores se siguen, y las características varían a lo largo de 5 píxeles, los valores de (x,y) tendrán errores del orden de 0.1 píxeles para imágenes razonablemente libres de ruido (Crocker y Grier, 1996). A este algoritmo se le añadieron algunos filtros adicionales:

- Para cada posición (x,y) se calcula la distancia entre esa posición y todas las demás. En caso de que esta distancia sea menor que un valor de separación entre núcleos determinado, esa posición (o núcleo) no se cuenta, esto para evitar que aglomerados de núcleos generen falsos positivos. A esta distancia se le denominó *separación*.
- Cualquier posición (x,y) que se encuentre en un área de exclusión de la imagen determinada, no se cuenta, ya que se pueden detectar núcleos que están cortados en las orillas de la imagen. Esta área está determinada por el diámetro utilizado para la segmentación, y se define como el área resultada de la resta de un rectángulo concéntrico a la imagen con el tamaño de lado de la imagen menos un diámetro.
- Para cada posición (x,y) , se determina el histograma de la subimagen (círculo concéntrico) en el rango de 1 – 255, y si el nivel de gris con la

frecuencia máxima es inferior a un umbral determinado, esa estructura no se cuenta.

Los parámetros que requiere este algoritmo son los siguientes:

- **Imagen:** la imagen mejorada que se utilizará ya sea binaria o en escala de grises.
- **Diámetro:** el tamaño promedio en pixeles del diámetro de los núcleos de las células de mamífero. Este parámetro también determina el área tentativa que abarca la célula en su totalidad, y a partir de la cual se asociarán los parásitos detectados a dicha célula.
- **Masscut:** es el valor umbral de la suma de los niveles de gris de todos los pixeles dentro de un círculo de tamaño *diámetro* alrededor del punto (x,y) bajo el cual no se toma en cuenta un posible núcleo.
- **Separación:** distancia mínima en pixeles permitida para la cercanía de dos puntos (x,y) .
- **Umbral de histograma:** es el valor umbral del nivel de gris en el rango de 1 – 255 con la mayor frecuencia en el histograma de la subimagen determinada por un cuadro de lado *diámetro* alrededor del punto (x,y) , bajo el cual no se toma en cuenta un posible núcleo.

Los parámetros utilizados para cada línea celular son los siguientes:

Línea H9c2(2-1)

Para los días 1 – 3:

- Diámetro = 21 px ($\approx 16.15 \mu\text{m}$).
- Masscut = 12000.
- Separación = 21 px ($\approx 16.15 \mu\text{m}$).
- Umbral de histograma = 0.

Para los días restantes:

- Diámetro = 57 px ($\approx 21.4 \mu\text{m}$).
- Masscut = 35000.
- Separación = 35 px ($\approx 21.4 \mu\text{m}$).
- Umbral de histograma = 0.

Línea 3T3 NIH

- Diámetro = 57 px ($\approx 21.4 \mu\text{m}$).
- Masscut = 9000.
- Separación = 15 px ($\approx 5.6 \mu\text{m}$).
- Umbral de histograma = 0.

Línea 3T3 S

- Diámetro = 37 px ($\approx 13.9 \mu\text{m}$).
- Masscut = 10000.
- Separación = 23 px ($\approx 8.6 \mu\text{m}$).
- Umbral de histograma = 0.

Línea Caco2

- Si en el histograma delimitado en el rango de 1 – 255 de niveles de gris, la frecuencia más alta es mayor a 59000:
 - Si la frecuencia para el nivel de gris de 255 en el histograma es de 0:
 - Diámetro = 29 px ($\approx 10.9 \mu\text{m}$).
 - Masscut = 18000.
 - Separación = 15 px ($\approx 5.6 \mu\text{m}$).
 - Umbral de histograma = 130.
 - De lo contrario:

- Diámetro = 27 px ($\approx 10.2 \mu\text{m}$).
- Masscut = 10000.
- Separación = 20 px ($\approx 7.5 \mu\text{m}$).
- Umbral de histograma = 130.
- De lo contrario:
 - Diámetro = 27 px ($\approx 10.2 \mu\text{m}$).
 - Masscut = 20000.
 - Separación = 22 px ($\approx 8.3 \mu\text{m}$).
 - Umbral de histograma = 140.

A partir del procesamiento anterior, se obtuvieron las posiciones (x,y) tentativas de los centroides de los núcleos de las células de mamífero en las imágenes. Para determinar el área tentativa que abarca una célula, se calculó un área circular con centro en (x,y) de dos veces el diámetro utilizado para ese análisis, para todas los núcleos de una imagen.

Para probar la capacidad del programa de identificar correctamente una estructura en la imagen como un núcleo, se realizó un conteo manual de los núcleos en el 10% del total de las imágenes de cada línea celular, delimitando a los núcleos que aparecieran completos en la imagen (es decir, ignorando aquellos en los extremos de la imagen que no están completos). Posteriormente, se calculó el error relativo porcentual entre el programa y el conteo manual. Cabe mencionar que todos los parámetros antes mencionados, tanto los de mejoramiento como procesamiento de las imágenes, se optimizaron para minimizar este valor al menos a un 10%.

7.2.2 Algoritmo de segmentación y conteo de parásitos

Con las coordenadas del círculo con centro en (x,y) de dos veces *diámetro* se obtuvo una subimagen del canal verde (G) de la imagen original. Esta nueva imagen se sometió a un proceso de mejoramiento previo a la segmentación,

utilizando la binarización para eliminar el ruido de fondo. Después, se recuperaron los niveles de gris originales, utilizando las posiciones de todos los píxeles con nivel de gris de 1 en la imagen previamente binarizada, y se calculó un nuevo umbral a partir del promedio de los niveles de gris de todos los píxeles en la imagen menos la mitad de la desviación estándar de los niveles de gris. Esta binarización permitió que el umbral dependa de las propiedades de la imagen misma, y que, en promedio, se rescataran la misma cantidad de píxeles por parásito. Una vez aplicada esta binarización, resumida en la Figura 8, se utilizó el módulo de segmentación desarrollado en este trabajo, que segmentará cada posible parásito o grupo de parásitos contiguos en la imagen, según se describe a continuación:

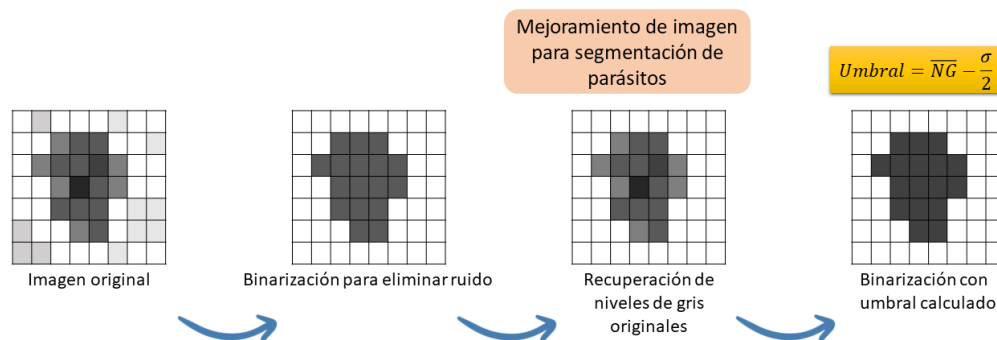


Figura 8. Esquema representativo del mejoramiento de imagen para cuantificación de parásitos y los criterios de conteo.

Segmentación de parásitos en el canal verde

En la imagen binarizada, se identifica la posición de todos los píxeles con valor de 1. De estas posiciones, se identifica la de menor valor en la coordenada (y), y si existe más de una, la de menor valor en la coordenada (x). A este píxel se le reasigna su nivel de gris a 255, para diferenciarlo del resto, y servirá de “semilla” para segmentar a su alrededor. La vecindad de Moore del píxel se copia en una máscara de 3x3, y en ésta, los píxeles con nivel de gris de 1 se reasignan a 255. La máscara se aplica a la imagen original, y además se aplica a

una imagen vacía del mismo tamaño, donde se almacenará la sección segmentada. Los nuevos pixeles con nivel de gris de 255 sirven como nuevas semillas, repitiendo el proceso hasta que se segmentan todos los pixeles con nivel de gris de 1 por lo menos a 1 píxel de distancia de la zona que se está segmentando. Finalmente, en la imagen original se tiene con nivel de gris de 255 a toda la zona segmentada, de la cual se eliminarán estos pixeles para iniciar otro ciclo de segmentación, y en la imagen copia se tiene esta zona segmentada de forma individual. A partir de esta imagen copia se realizó el conteo: se cuentan el número de pixeles, y si su valor es inferior al número de pixeles promedio que posee un parásito aislado, este se cuenta como 1; si su valor es superior, se dividió el total de pixeles contados entre el promedio de pixeles por parásito aislado. Este proceso se esquematiza en la Figura 9.

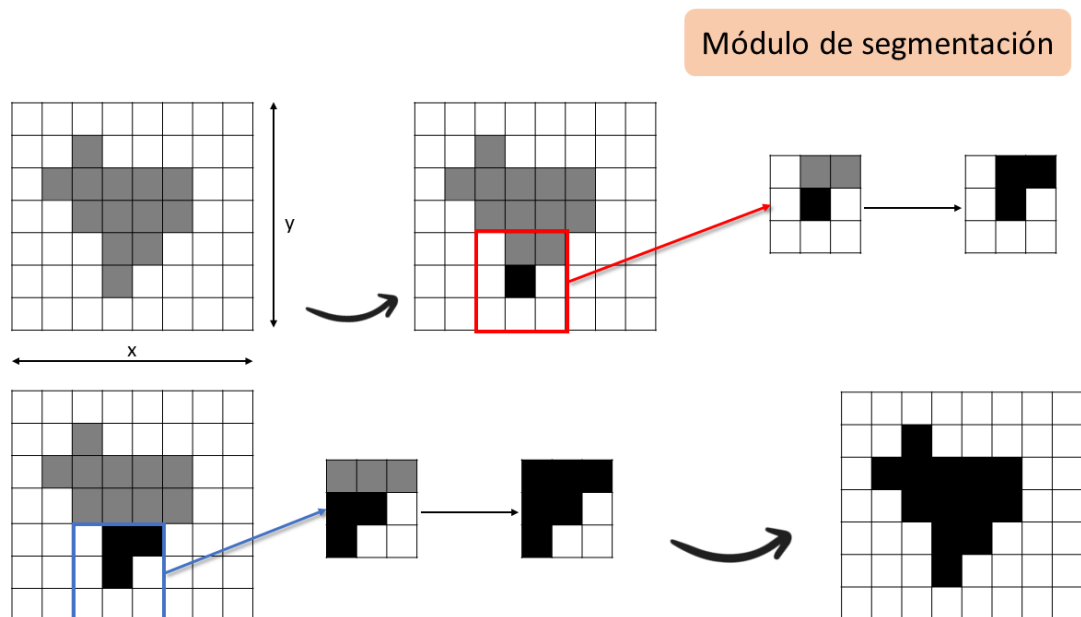


Figura 9. Esquema representativo del módulo de segmentación general. Este módulo, con ligeras modificaciones, sirve para la segmentación de núcleos y de parásitos.

Cada vez que una zona es segmentada se elimina de la imagen original, hasta que la imagen queda sin zonas de parásitos potenciales.

Segmentación de parásitos en el canal azul

Para identificar los parásitos presentes en el canal azul de las imágenes, se utilizó el mismo procedimiento anterior, con algunos pasos previos adicionales:

1. Se eliminaron (volver a 0) los pixeles correspondientes al área segmentada como posible núcleo celular. Esto para evitar la sobreestimación de la cuenta debido al reconocimiento de una estructura que previamente se tomó como núcleo.
2. Se eliminaron los pixeles correspondientes al área de los parásitos en el canal verde, previa binarización total (umbral 0) de la imagen en el canal verde y aplicación del filtro dilatación dos veces. Esto para evitar contar los parásitos que han sido contados previamente en el canal verde.

Generación de histogramas de distribución de parásitos por célula

Una vez que se han analizado todas las imágenes, se generan los histogramas de distribución de parásitos por grupo de imágenes. Los histogramas se normalizaron para mostrar la función de densidad de probabilidad según la siguiente ecuación:

$$p_i = \frac{N_i}{N_T \Delta a_i}$$

Donde p_i es la densidad de probabilidad para el intervalo i , N_i es la cantidad de células con parásitos en el intervalo i , N_T es el total de células del grupo de imágenes, Δa_i es el rango del intervalo de parásitos $i - i+1$. En estos histogramas se excluyeron las células con 0 parásitos, para diferenciar entre la población infectada y no infectada.

7.3 Desarrollo de un algoritmo de simulación de crecimiento e infección de cultivo celular

Para el estudio de la dinámica de infección a nivel de cultivo celular, se utilizó un modelo basado en agentes, en particular, un autómata celular. Para el desarrollo del programa se utilizará el lenguaje de programación Python 3.11. Para el espacio de simulación se utilizará una matriz de tamaño $N \times N$ donde N es el número de celdas por lado de la matriz. En la matriz, cada celda representará una célula o el espacio que puede ocupar una célula, por lo que, la capacidad (o población) máxima del sistema será de $N \times N$ células. Se representará mediante 0 y 1 la ausencia y presencia de una célula en cada celda, respectivamente. Esta representación se puede visualizar en la Figura 10. Se utilizará una variable de tipo entero para representar el tiempo, que avanzará de forma discreta y representará el tiempo de cultivo. Una vez establecido el espacio de simulación y la representación de las células, se describe a continuación el algoritmo de crecimiento celular que operará en el programa.

0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
0	0	0	0	0	0	1	1	0	0
0	0	0	0	0	0	1	1	0	0
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0	1	0	0	0	0	1	0	0	0
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0	0	0	1	0	0	0	1	0	0
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Figura 10. Representación gráfica del espacio del autómata y de los estados ausente y presente de las células en el mismo.

7.3.1 Algoritmo de crecimiento

Antes de iniciar la simulación y de comenzar el tiempo de cultivo, se establecerá un inóculo o población inicial M , definido por el usuario, que consiste en elegir M celdas de forma aleatoria y asignar su valor a 1. El ciclo de iteraciones para el crecimiento se describe a continuación y se ejemplifica en la Figura 11:

1. Se asignan valores entre 0 y 1 de forma aleatoria a todas las células activas (celdas con valor de 1).
2. Se compara el valor asignado contra un valor de probabilidad de división (alfa o α) preestablecido, y entonces:
 - a. Si es igual o mayor, la célula no se divide en este ciclo, y se procede al punto 4.
 - b. Si es menor, se procede al punto 3.
3. Para las células en división, se identifican las celdas vecinas, y se elige de forma aleatoria una de ellas:
 - a. Si la celda elegida está ocupada por una célula, la célula en división no se dividirá.
 - b. Si la celda elegida está vacía, la célula se divide y esta celda elegida se reasigna a 1.
4. Una vez que todas las células se han probado para división. Se registra el total de la población (celdas de la matriz con valor de 1) en ese tiempo de cultivo o simulación.
5. Se aumenta en 1 el valor del tiempo:
 - a. Si el valor es igual al tiempo total de simulación o cultivo asignado, termina la simulación.
 - b. Si el valor es menor al tiempo total de simulación o cultivo asignado, regresar al punto 1.

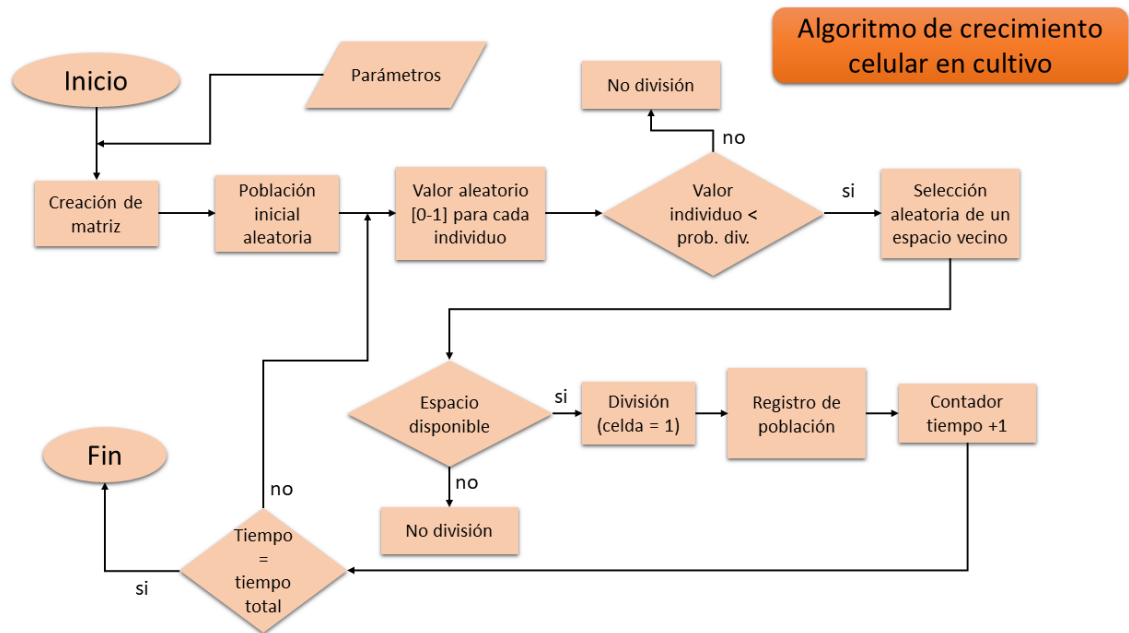


Figura 11. Esquema del algoritmo de crecimiento celular en cultivo. Los parámetros incluyen: tamaño N de la matriz NxN, tamaño M de la población inicial, valor de probabilidad de división y tiempo total de cultivo o simulación.

7.3.2 Algoritmo de infección

Para representar la infección y la población de parásitos intracelulares, se aumentará en 1 el valor de cada célula activa (celda con valor de 1) por cada parásito presente, como se muestra en la Figura 12. Por lo tanto, la cantidad de parásitos intracelulares de cada célula es el valor de la celda menos 1.

0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
0	0	0	0	0	0	1	1	0	0
0	0	0	0	0	0	9	1	0	0
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0	2	0	0	0	0	1	0	0	0
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0	0	0	5	0	0	0	1	0	0
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Figura 12. Representación gráfica del espacio de simulación con células infectadas (rojo).

Para la infección, se establece una variable que indique la población total de parásitos libres en el medio, la cual se irá modificando cada vez que una célula se lise o un parásito se internalice. Al igual que con la población inicial de células, se puede asignar la población inicial de células infectadas con 1 parásito, y la cantidad inicial de parásitos libres. También se establece un valor de probabilidad de infección por parásitos libres (beta o β), un valor de probabilidad de infección por contacto con células infectadas (gama o γ), un valor de carga máxima de parásitos intracelulares por célula (delta o δ), un valor de crecimiento logístico de los parásitos (a) y los valores de probabilidad de lisis (n y k). El ciclo de iteraciones de infección se describe a continuación y se ejemplifica en la Figura 13:

1. **Crecimiento de parásitos intracelulares:** para cada célula infectada, los parásitos en esa célula se reproducen de acuerdo con la ecuación logística discreta:

$$N(t + 1) = (1 + a)N(t) - b(N(t))^2$$

donde N es la población, t el tiempo actual, a una constante de crecimiento y b una constante de competencia. El valor de a se determina por ajuste, mientras que b equivale a:

$$b = \frac{a}{\delta}$$

donde δ es la carga máxima de parásitos intracelulares por célula.

2. **Infección por contacto:** para cada célula no infectada, se identifican las celdas vecinas. Se calcula un valor de peso, que es la suma de todas las células vecinas infectadas (con valor de 2 o más) menos 1 por cada célula infectada (ya que 1 es el valor que indica que la célula está viva).

Este valor de peso se multiplica por la probabilidad de infección por contacto base.

- a. Si el valor de probabilidad asignado a la célula no infectada es menor al valor de probabilidad ajustado, la célula se infecta (se reasigna a 2).
- b. Si la condición anterior no se cumple, no se infecta la célula.

3. **Infección por parásitos libres:** para cada célula no infectada, se le asigna un valor aleatorio entre 0 y 1:

- a. Si su valor es menor al producto entre la cantidad de parásitos libres y la probabilidad de infección por parásito libre, entonces la célula se infecta y la cantidad de parásitos libres pierde 1 parásito.
- b. Si la condición anterior no se cumple, no se infecta la célula.

4. **Liberación de parásitos al medio:** a cada célula infectada (≥ 2), se le asigna un valor aleatorio entre 0 y 1:

- a. Se calcula la probabilidad de lisis ajustada a la función de Hill:

$$P_{lisis}(x) = \frac{x^n}{x^n + k^n}$$

donde x es la cantidad de parásitos dentro de la célula en el instante analizado, k es la carga mitad de la carga máxima ($\delta/2$) y n el valor del exponente.

- b. Si el valor de la célula es menor a la probabilidad de lisis calculada, la cantidad de parásitos se libera al medio y la célula muere. De lo contrario, la célula no se lisa.

5. Se registra el total de células infectadas y no infectadas, y la distribución de parásitos por célula.

6. Se aumenta en 1 el valor del tiempo y continúa otro ciclo hasta que se alcance el tiempo de simulación establecido.

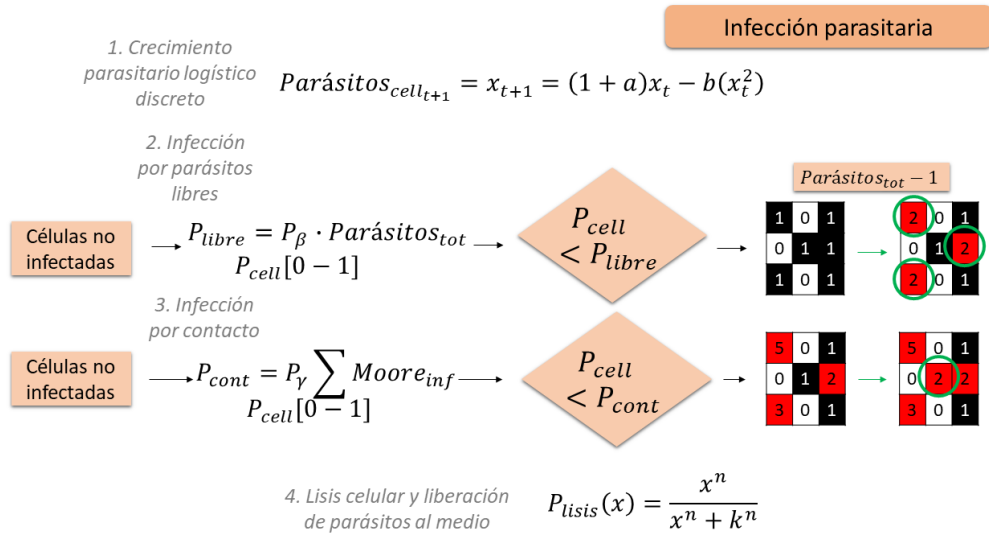


Figura 13. Esquema de los elementos de infección simulados en el modelo, numerados en el orden en que ocurren en el programa. Para los pasos 2 y 3, se indicaron con círculos verdes las celdas/células afectadas.

El módulo de crecimiento es independiente del módulo de infección, por lo que este último se puede desactivar para ajustar valores de crecimiento celular. Primero se ejecuta el módulo de crecimiento, y antes del paso 4 en ese módulo, se inicia el módulo de infección. Justo antes de iniciar tanto el módulo de crecimiento como de infección (en cada ciclo), se simula el cambio de medio que se describe en el protocolo de Arias del Ángel et al. (2020), reasignando el valor del contador de parásitos libres en el medio al 10% de su valor en los instantes de tiempo mencionados en dicho protocolo. Este valor es arbitrario, si bien es razonable asumir que una cantidad de parásitos permanece adherido a las células o en las paredes del recipiente, aunque este valor no está cuantificado experimentalmente por Arias del Ángel ni por otro trabajo en la literatura revisada.

Para este modelo, se realizaron las siguientes simplificaciones o presuntos:

1. No se considera la muerte natural de las células de mamífero ni de los parásitos.
2. Las células de mamífero están constantemente en la fase exponencial de crecimiento, limitado solo por el espacio disponible para el crecimiento, ya que la probabilidad de división no cambia.
3. Las células pueden nacer, infectarse e infectar en el mismo ciclo o unidad de tiempo.
4. No hay distinción entre amastigotes y tripomastigotes. Solamente los parásitos intracelulares pueden dividirse, por lo que los parásitos libres no se dividen.
5. Una fracción de los parásitos permanece en el cultivo al realizar el cambio de medio, se asume que el 10%.
6. Se inicia con el 1% de las células infectadas con 1 parásito.
7. Las células infectadas solo pueden transmitir 1 parásito a una célula no infectada cuando ocurre la infección por contacto. No se resta el parásito que perdió la célula que infectó.
8. No se toma en cuenta la distribución espacial de los parásitos en el medio, se considera bien mezclado, pues cada parásito tiene la misma probabilidad de infectar.
9. La frontera del espacio del autómatas celular es de tipo circular, por lo que las células de las fronteras interactúan con las vecinas próximas y las del extremo opuesto del espacio.

Optimización de parámetros de simulación

Para encontrar el conjunto de parámetros que mejor ajustan las simulaciones a los datos experimentales disponibles, se utilizó una aproximación del método de mínimos cuadrados no lineales, el cual se basa en la minimización de la suma de cuadrados (Burden y Faires, 2002) S entre un conjunto de m puntos de

datos $(x_1, y_1), (x_2, y_2), \dots, (x_m, y_m)$, y la curva o función modelo $\hat{y} = f(x, \beta)$ que depende de la variable x y de n parámetros $\beta = (\beta_1, \beta_2, \dots, \beta_n)$, tal que:

$$S = \sum_{i=1}^m r_i^2 \text{ donde } r_i = y_i - f(x_i, \beta) \text{ para } i = 1, 2, \dots, m$$

El valor mínimo de S ocurre cuando el gradiente es cero, y ya que el modelo contiene n parámetros, hay n ecuaciones de gradiente:

$$\frac{\partial S}{\partial \beta_j} = 2 \sum_i r_i \frac{\partial r_i}{\partial \beta_j} = 0 \text{ para } j = 1, 2, \dots, n$$

Ya que estas ecuaciones generalmente no tienen solución exacta, se deben elegir valores iniciales para los parámetros y refinarlos iterativamente por aproximación:

$$\beta_j \approx \beta_j^{k+1} = \beta_j^k + \Delta \beta_j$$

Donde k es un número de iteración y el vector de incrementos $\Delta \beta$, se conoce como vector de cambio. Sin embargo, ya que en este caso no se trabaja sobre ecuaciones explícitas, esta aproximación se realizó calculando S al variar β y buscando el valor mínimo en cada variación. Para cada iteración se realizaron 3 repeticiones y se calculó el promedio y la desviación estándar de las mismas.

8. Resultados

Programa de cuantificación de núcleos celulares

Se desarrolló el algoritmo y el programa para la cuantificación de núcleos de células de mamíferos y de parásitos intracelulares. Para corroborar la capacidad del programa de identificar los núcleos en las imágenes, se compararon los resultados del programa con el conteo manual del 10% del total de las imágenes, a excepción de la línea celular Caco2, la cual fue la que presentó la mayor variabilidad, tanto en el tamaño de núcleos como en la calidad de las imágenes. En este último caso, se utilizaron imágenes representativas que contuvieran parásitos, para ajustar los parámetros para estas imágenes, las cuales son de interés para el estudio. Los resultados de estas comparaciones se presentan en las Tablas 1 – 4. Cada fila de las Tablas representa una de las imágenes de muestreo para esa línea. Se colocó, para facilitar la visualización, una columna indicada como “desvío”, para indicar si el error se da por encima o por debajo del valor de referencia, y cuál fue la ocurrencia promedio al final, lo que indica si la cuantificación, en general, si se están presentando abundantes falsos positivos o abundantes falsos negativos. Se observa que en la mayoría de las líneas celulares se presentan en promedio falsos negativos como causas del error de cuantificación. En algunos casos, se observa que se logra un error de 0%, sin embargo, esto no implica que se hayan localizado con exactitud los núcleos, pues puede deberse a que se contrarrestan los falsos positivos con los falsos negativos, aunque no siempre será el caso. En particular, la línea H9c2 presentó el mayor error relativo porcentual, debido tanto a la dificultad de encontrar los parámetros que minimizaran este error como a la necesidad de usar dos conjuntos de parámetros para días diferentes (1 – 3), ya que estos

difieren en la escala utilizada al momento de tomar la fotografía (1 px = 0.769 μm para días 1 – 3, 1 px = 0.376 μm para los demás días).

Conteo manual	Conteo programa	Error relativo porcentual	Desvío
18	18	0.00	▬
205	193	5.85	↓
334	269	19.46	↓
19	18	5.26	↓
33	32	3.03	↓
82	65	20.73	↓
63	67	6.35	↑
55	52	5.45	↓
21	28	33.33	↑
Promedio		11.05	↓

Tabla 1. Resultados de conteo manual contra el conteo realizado por el programa para la línea H9c2(2-1).

Conteo manual	Conteo programa	Error relativo porcentual	Desvío
187	231	23.53	↑
84	76	9.52	↓
161	159	1.24	↓
190	210	10.53	↑
192	219	14.06	↑
182	204	12.09	↑
186	198	6.45	↑
205	201	1.95	↓
207	176	14.98	↓
219	215	1.83	↑
199	214	7.54	↑

26	24	7.69	↓
7	7	0.00	≡
Promedio		8.57	↑

Tabla 2. Resultados de conteo manual contra el conteo realizado por el programa para la línea 3T3 NIH.

Conteo manual	Conteo programa	Error relativo porcentual	Desvío
65	68	4.62	↑
87	87	0.00	≡
245	229	6.53	↓
258	254	1.55	↓
514	416	19.07	↓
275	274	0.36	≡
230	264	14.78	↑
367	332	9.54	↓
233	322	9.30	↑
351	319	9.12	↓
325	325	0.00	≡
324	393	21.30	↑
363	335	7.71	↓
117	113	3.42	↓
Promedio		7.99	↓

Tabla 3. Resultados de conteo manual contra el conteo realizado por el programa para la línea 3T3 S.

Conteo manual	Conteo programa	Error relativo porcentual	Desvío
458	468	2.18	↑
398	415	4.27	↑
466	409	12.23	↓

470	424	9.79	↓
494	440	10.93	↓
401	384	4.24	↓
375	316	15.73	↓
367	362	1.36	↓
453	369	18.54	↓
Promedio		8.81	↓

Tabla 4. Resultados de conteo manual contra el conteo realizado por el programa para la línea Caco2.

En cuanto a la capacidad del programa para identificar con exactitud el centro del núcleo de la célula de mamífero, no se determinó de forma cuantitativa, sin embargo, se muestran en la Figura 14 imágenes que ejemplifican el resultado de la segmentación de los núcleos, si bien no son representativas debido a la amplia heterogeneidad de las imágenes. En estas imágenes se puede observar en azul la tinción con DAPI del DNA presente en la muestra, tanto de células de mamíferos como de parásitos, en rojo el área circular que delimita el programa, cuyo centro se asume como centro del núcleo, y en verde la fluorescencia de los parásitos debido a la excitación de la eGFP.

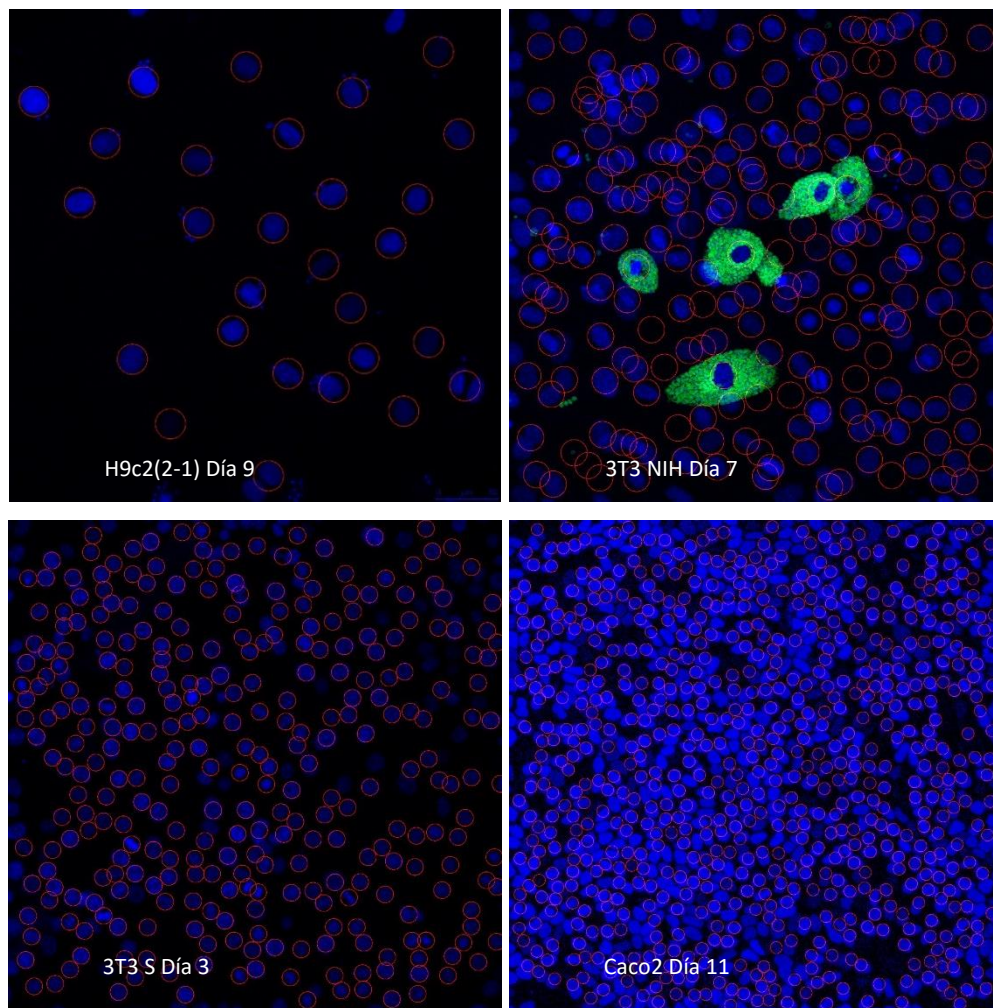


Figura 14. Ejemplos de resultados de segmentación de núcleos para cada línea celular analizada. Estas imágenes no son representativas de todas las analizadas debido a la heterogeneidad de estas.

A partir de este análisis sobre las capacidades del programa en la detección de núcleos, se determinó la cantidad de células promedio por campo a lo largo de cada día, para cada línea celular, como se muestra en la Figura 15. De forma general, se observa en las gráficas una desviación estándar relativamente baja para el tamaño de la barra, con excepción de los días 2 y 9 de la línea H9c2(2-1) y los días 1 y 18 de la línea 3T3 NIH, que resaltan sobre las demás. Esta variabilidad en los resultados de cuantificación está también presente en las

imágenes, es decir, algunos campos tienen más o menos núcleos visibles que el resto, revisando mediante inspección (no mostrado), y no se le puede atribuir completamente a los errores del programa durante el procesamiento. En cuanto al comportamiento de las gráficas, el de las líneas 3T3 S y Caco2 se observa relativamente similar, con una subida, una meseta y una ligera caída. La línea 3T3 NIH difiere en que le toma más tiempo alcanzar la meseta, mientras que la línea H9c2(2-1) es la que más difiere debido al día 5, donde se observan pocos núcleos tanto en la gráfica como en las imágenes por inspección (no mostrado).

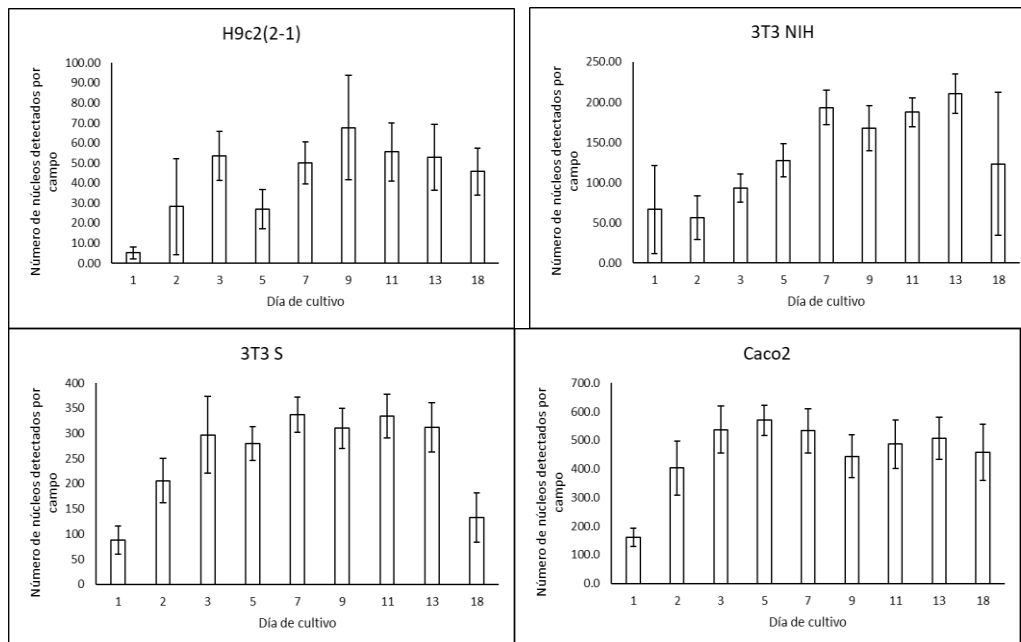


Figura 15. Gráficos de núcleos detectados por campo a cada día de cultivo de infección de cada línea celular analizada, las barras de error representan la desviación estándar.

Programa de cuantificación de parásitos intracelulares

Una vez que se logró cuantificar y localizar los núcleos de las células de mamífero con un error relativamente bajo, se procedió a verificar la capacidad de cuantificación del programa de conteo de parásitos. Para esto, se comparó el conteo del programa contra el conteo manual de zonas que contuvieran

parásitos claramente identificables y suficientemente separados. La Figura 16 muestra una imagen de la línea celular H9c2(2-1) al día 11 de infección, donde se delimitaron zonas (marcadas en blanco) para el conteo manual, y posteriormente estas mismas zonas se analizaron mediante el programa de conteo. Los resultados comparativos se muestran en la Tabla 5. De la misma forma que en las Tablas anteriores, se añadió la columna de “desvíos” para facilitar visualmente si el valor calculado está por debajo o encima de la referencia. En este caso, se obtuvo un error medio del 7.12% y en promedio el error se debe a falsos negativos, que nos da una idea de la capacidad del programa de identificar a los parásitos. También se comparó la capacidad del programa de segmentar parásitos en el canal azul, que en general será más complicada por un ruido más heterogéneo y el tratamiento que debe realizarse para eliminar tanto núcleos como los parásitos que ya están contados en el canal azul en esa posición, resultados que se muestran en la Tabla 6.

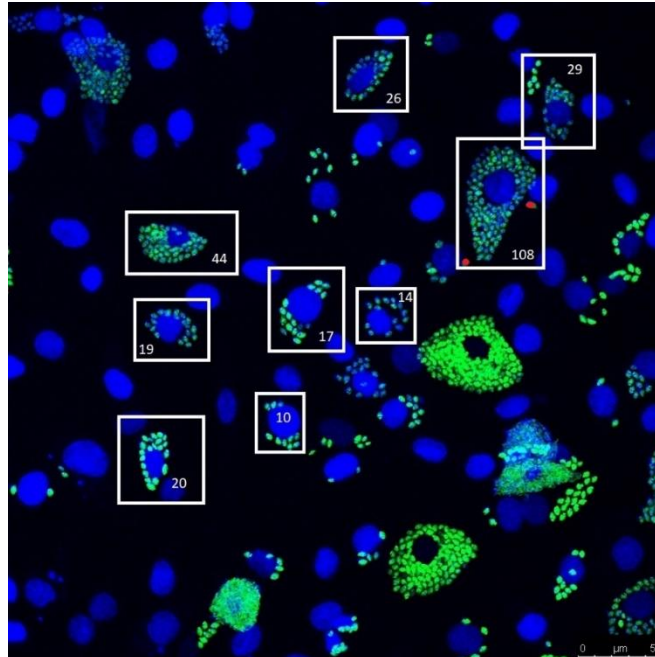


Figura 16. Imagen representativa de un cultivo de infección de 11 días, con secciones marcadas para el conteo manual y mediante el algoritmo de conteo.

Conteo manual	Conteo algoritmo	Error porcentual	Desvío
44	45	2.27	↑
19	16	15.79	↓
17	19	11.76	↑
10	10	0.00	=
20	19	5.00	↓
26	23	11.54	↓
29	31	6.90	↑
108	104	3.70	↓
14	13	7.14	↓
Error porcentual medio		7.12	↓

Tabla 5. Resultados de la prueba del algoritmo de conteo contrastado con conteo manual en una imagen representativa.

Manual	Programa	Error relativo (%)	Desvío
55	52	5.45	↓
44	44	0.00	=
40	26	35.00	↓
25	31	24.00	↑
44	45	2.27	↑
27	26	3.70	↓
43	43	0.00	=
27	29	7.41	↑
62	68	9.68	↑
	Promedio	9.72	↑

Tabla 6. Resultados de la prueba del algoritmo de conteo contrastado con conteo manual en una imagen representativa en el canal azul.

Debido a la falta de información sobre la delimitación espacial de cada célula, no fue posible analizar la capacidad del programa de asignar correctamente los parásitos correspondientes a cada célula, ya que se utilizó una medida arbitraria para el área que se asigna a cada núcleo (dos veces el diámetro del núcleo), por lo que se dan casos en los que se sobreestima el área real de la célula, abarcando parásitos que no le corresponden, o se subestima, faltando parásitos que cuantificar. Un ejemplo de estos resultados se muestra en la Figura 17.

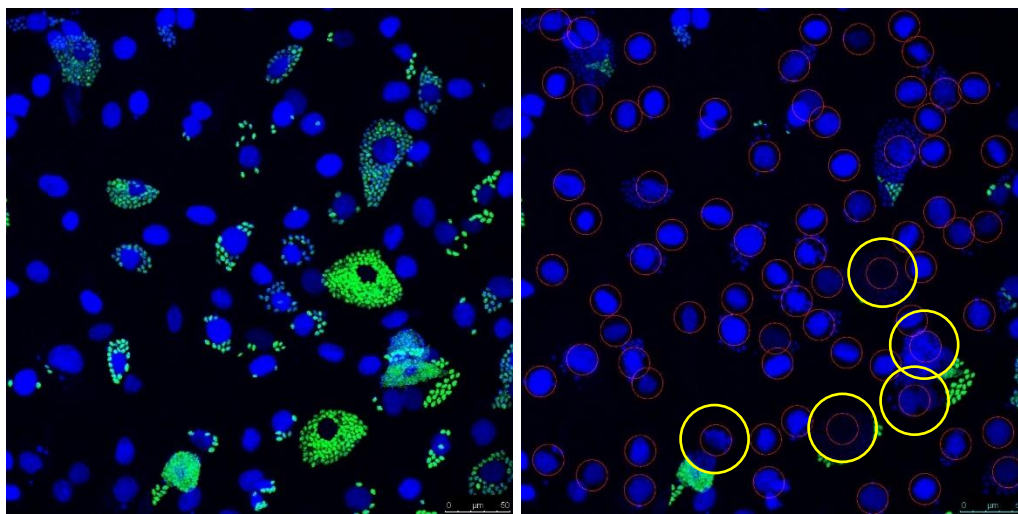


Figura 17. Ejemplificación del proceso de asignación de parásitos a cada núcleo celular. Se puede observar que en algunos casos no se cuantifican parásitos, ya que el área celular (amarillo, algunos ejemplos) asignada es inferior a la real, en otros casos se cuentan parásitos de las células aledañas. Izq.: Imagen antes del procesamiento. Der.: Imagen con el resultado de segmentación y conteo.

Distribuciones de parásitos por célula

A partir de ambos algoritmos optimizados y probados, se determinaron las distribuciones de parásitos por célula en cada conjunto de imágenes correspondientes al mismo día de infección, es decir, los histogramas abarcan el total de células infectadas y no infectadas en todas las imágenes de un mismo día. En la Figura 18 se muestran resultados (a modo de ejemplificación) de la

distribución de parásitos por célula en cada línea celular al día 18 de infección (los resultados de los días analizados se muestran en el anexo). Ya que la probabilidad está normalizada con el tamaño de intervalo, es posible comparar entre los diferentes histogramas. Es importante remarcar que las probabilidades mostradas en los histogramas no representan todas las probabilidades (el área total bajo la curva no equivale a 1), ya que no se están mostrando las probabilidades de 0 parásitos, pero sí se toma en cuenta a toda la población, infectada o no.

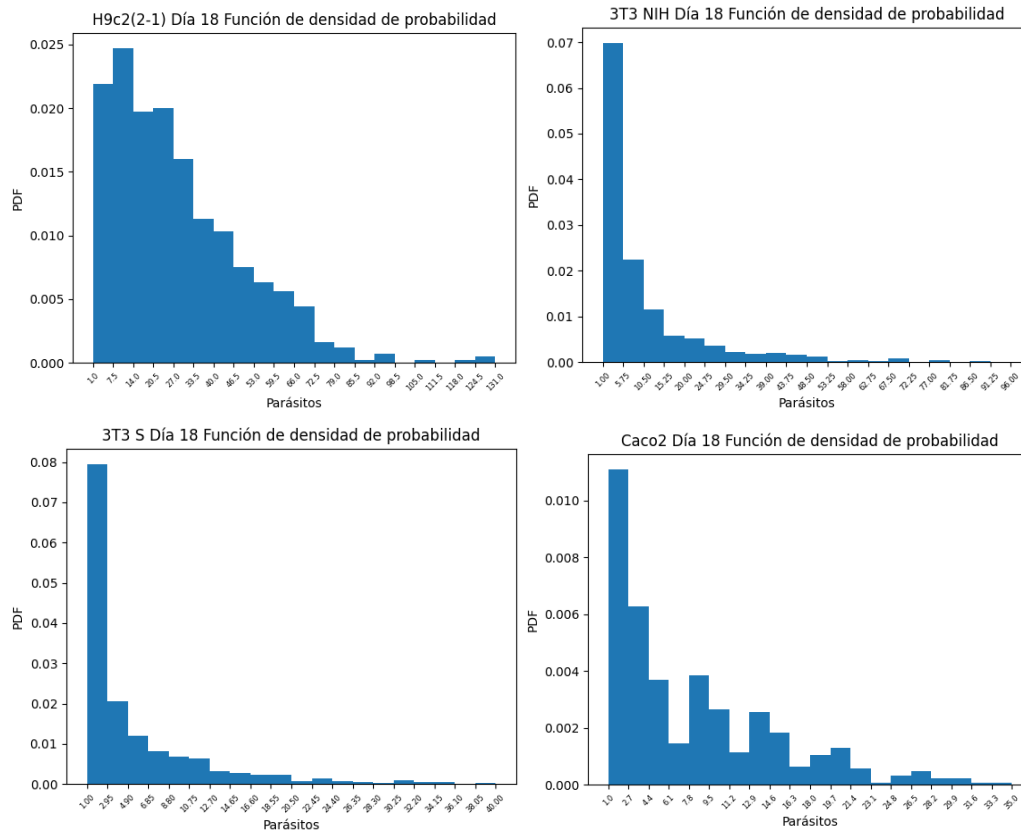


Figura 18. Histogramas de función de densidad de probabilidad de parásitos por célula en el día 18 de infección de las líneas analizadas (20 intervalos).

Una vez obtenidas las distribuciones de parásitos por célula, se procedió al desarrollo del modelo computacional de tipo autómatas celulares, para poder

replicar las distribuciones antes generadas y analizar las componentes de infección en cultivo celular. En primera instancia, se desarrolló el modelaje del crecimiento celular en cultivo, y posteriormente se añadieron las componentes de infección.

Curvas de crecimiento celular simulado

Para corroborar la capacidad del modelo de replicar el crecimiento celular en cultivo (sin infección), se optimizaron los parámetros mediante el método de mínimos cuadrados no lineales. Los resultados de las simulaciones se pueden observar en la Figura 19.

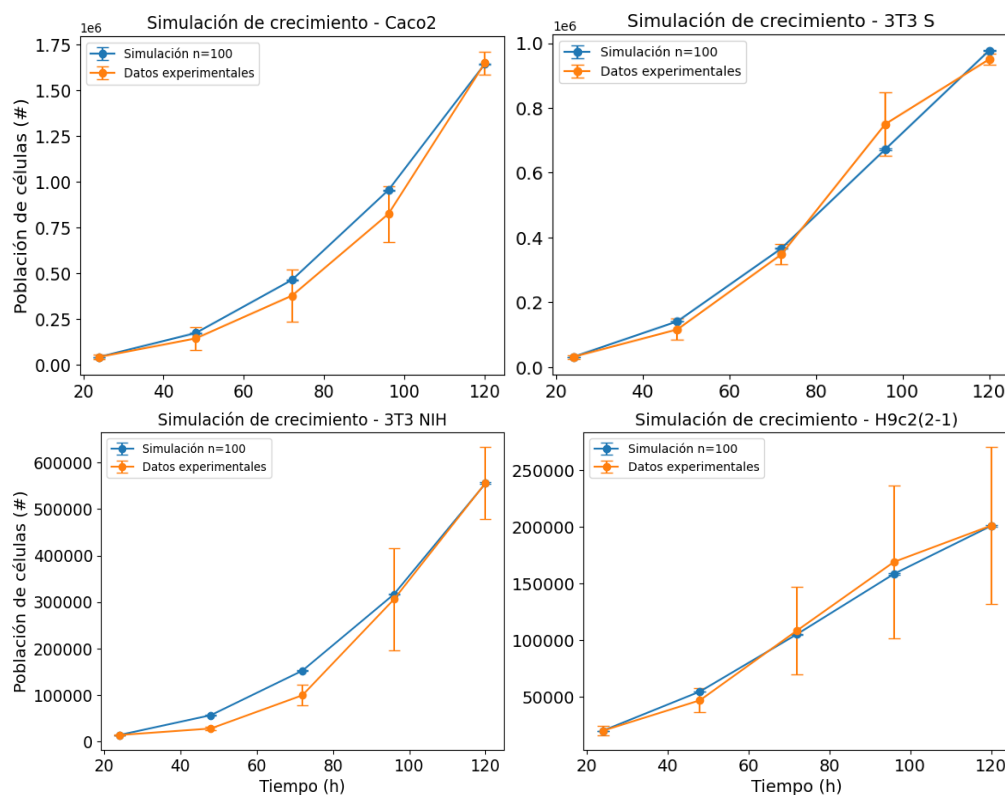


Figura 19. Resultados de simulación de crecimiento de las líneas celulares con los parámetros optimizados.

Los valores de los parámetros que dan lugar a los resultados de simulación de crecimiento para cada línea celular se muestran en las Tabla 7.

Parámetro/Línea	H9c2(2 – 1)	3T3 NIH	3T3 S	Caco2
N (tamaño de matriz)	499	2101	1600	2900
α (propensión de crecimiento)	0.056 h ⁻¹ célula ⁻¹	0.0731 h ⁻¹ célula ⁻¹	0.07 h ⁻¹ célula ⁻¹	0.0742 h ⁻¹ célula ⁻¹
M (población inicial)	20151	13804	31737	41600

Tabla 7. Parámetros de crecimiento optimizados para cada línea celular analizada.

Cabe mencionar que la población inicial se tomó como la población a las 24 h de cultivo de los resultados de Arias del Ángel *et al.*, y no a las 0 h, donde la población es de 20,000 en todos los casos. Esto debido a que, en general, esas 24 h iniciales corresponden al periodo de adaptación y adhesión al ambiente de cultivo, y la etapa de crecimiento no es exponencial. En el modelo diseñado, las células inician todas en la etapa exponencial y no se programaron reglas de adaptación. Esto se puede notar en particular en la línea 3T3 NIH, la cual tarda más en alcanzar la fase exponencial plena en comparación de las demás líneas, y, para las primeras 72 h, no se reproduce con exactitud el crecimiento, sin embargo, debido a que para las siguientes 48 h la variación reportada es considerablemente mayor, se considera suficiente ya que el comportamiento global se logra reproducir, y no queda claro a partir de los experimentos el curso real que llevan los cultivos.

Curvas de infección simulada

De la misma manera, para verificar la capacidad de replicar la infección en cultivo celular, se optimizaron los parámetros de infección, en primera instancia, por separado para cada tipo de infección (Infección por Parásito

Libre, IPL; Infección por Contacto, IC), cuyos resultados de simulación para las líneas H9c2(2-1) y 3T3 NIH se muestran en la Figura 20. A partir de este punto, se decidió solo analizar estas líneas, que fueron las que presentaron la mayor infección a lo largo de los ensayos de Arias del Ángel. Todas las simulaciones de infección inician con el 1% de la población infectada, ya que Arias del Ángel reportó que, a las 18 h, las diferentes líneas celulares presentaron entre 0 y 3% de infección, con un máximo de 1.4 amastigotes por célula en promedio, por lo que cada célula infectada al iniciar la simulación contiene 1 parásito. Se puede observar que la infección por parásito libre muestra resultados similares a los obtenidos por Arias del Ángel, donde se observa un comportamiento escalonado, en este caso, debido a la sincronización de los parásitos dentro de las células, ya que los parásitos crecen al mismo ritmo en cada célula, y solo cuando estos lisan la célula hay infección, debido a la simulación de los lavados. Cabe mencionar que, en estas dos etapas, aún no se implementa la lisis en función de los parásitos intracelulares, sino que se lisan cuando alcanzan un umbral de parásitos establecido por la cantidad máxima de parásitos detectada por el programa de conteo (parámetro δ). Por otro lado, la infección por contacto en sí misma se comporta de forma logística, ya que en principio es la misma dinámica, donde solo se puede dar lugar a una célula infectada a partir de otra ya existente. Además, en este caso, es irrelevante la cantidad de parásitos que se liberan, ya que solo depende de la cantidad de parásitos intracelulares.

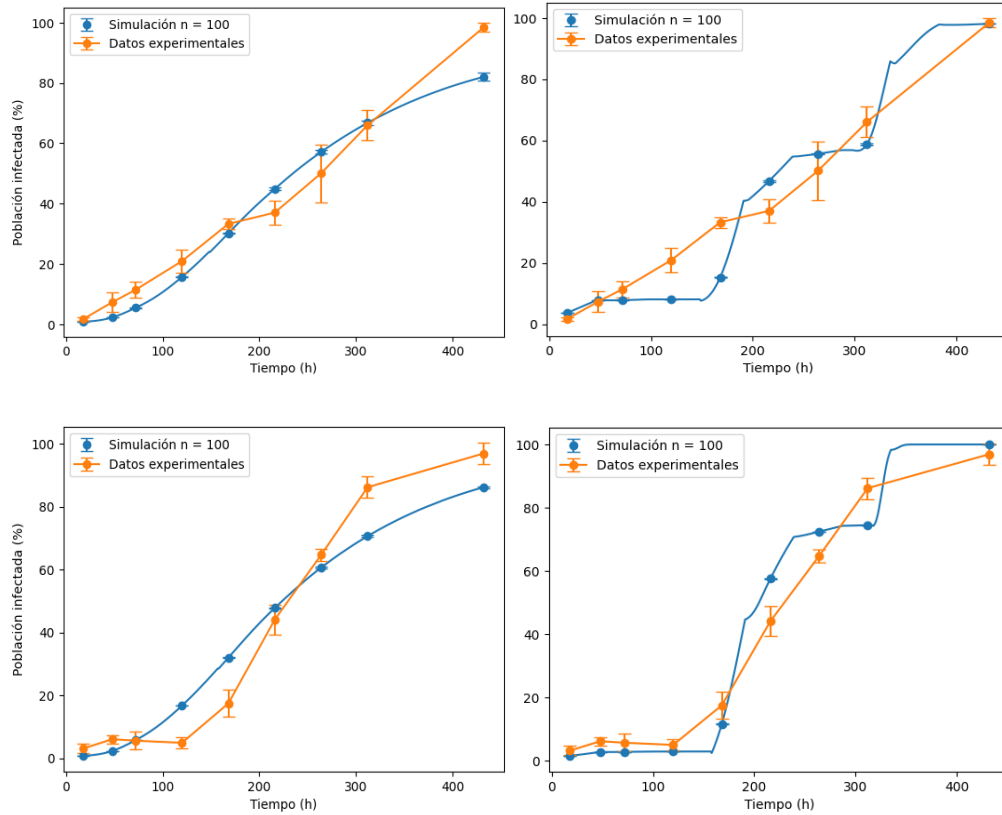


Figura 20. Resultados de simulación de los tipos de infección analizada para las líneas H9c2(2-1) (superior) y 3T3 NIH (inferior). Izq.: Infección por Contacto (IC). Der.: Infección por Parásito Libre (IPL).

Ya que ninguno de los tipos de infección logró reproducir por sí solo satisfactoriamente el comportamiento observado por los experimentos de Arias del Ángel, y de manera similar a la aproximación en su modelo, se realizó la integración de ambos tipos de infección, mostrando los resultados en la Figura 21, después de haber optimizado los parámetros de infección en conjunto. Una vez obtenido un buen ajuste incorporando ambos tipos de infección, al comparar las distribuciones de parásitos por célula obtenidos a partir de las imágenes y de las simulaciones, se observó un comportamiento similar para los intervalos menores, pero conforme avanzaban los días de infección, había un alza en las probabilidades para mayores intervalos de parásitos. Esto se

discutirá en la siguiente sección, pero para intentar solucionar esta tendencia, se añadió la lisis celular y liberación de parásitos con probabilidad ajustada a la ecuación de Hill en función de la cantidad de parásitos, y se re-optimizaron los parámetros hasta minimizar el error. Los parámetros optimizados correspondientes se muestran en la Tabla 8.

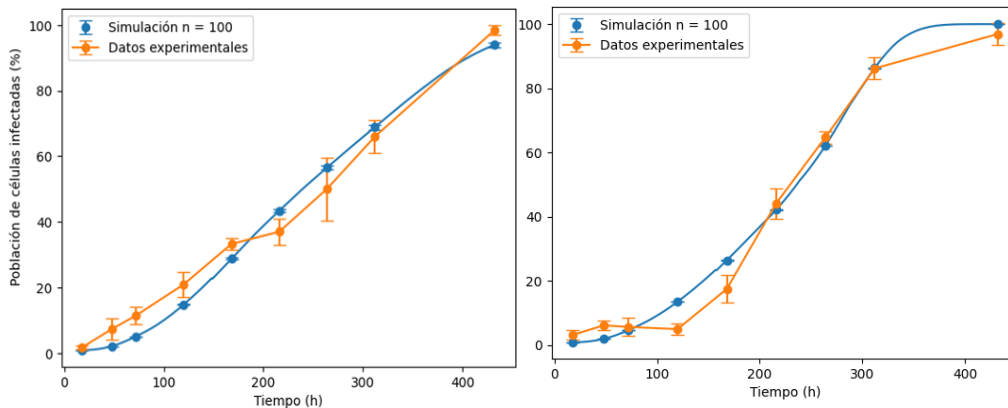


Figura 21. Resultados de simulación de ambos tipos de infección (IPL e IC) para las líneas celulares H9c2(2-1) (izq.) y 3T3 NIH (der.).

Parámetros/Línea	H9c2(2-1)	3T3 NIH
β (propensión de IPL)	$1 \times 10^{-9} \text{ h}^{-1} \text{ célula}^{-1}$	$5.67 \times 10^{-10} \text{ h}^{-1} \text{ célula}^{-1}$
γ (propensión de IC)	$9.7 \times 10^{-4} \text{ h}^{-1} \text{ parásito intracelular}^{-1}$	$8.89 \times 10^{-4} \text{ h}^{-1} \text{ parásito intracelular}^{-1}$
δ (cantidad máxima de parásitos intracelulares)	151	125
a (tasa de crecimiento de parásitos intracelulares)	0.029 h^{-1}	0.02835 h^{-1}
n (Exponente de Hill)	10	10
k (Cantidad de parásitos a la que hay	75	62

la mitad de probabilidad de lisis)		
---	--	--

Tabla 8. Parámetros de infección global optimizados para las líneas H9c2(2-1) y 3T3 NIH.

Distribución de parásitos por célula infectada simulada

Una vez obtenidos los parámetros optimizados, se obtuvo la distribución de parásitos por célula. Debido a que se espera que el programa de conteo tenga más incertidumbre en los últimos días de infección, se analizaron únicamente los días 0.75, 2, 3, 5, 7 y 9, tanto en el caso de los datos de imágenes como de simulaciones. El resto de los días se pueden observar en las figuras del anexo. En la Figura 22 se muestran algunos ejemplos. Se puede observar que, para todos los días mostrados, la mayor probabilidad cae en el menor de los intervalos de parásitos por célula, indicando que, aunque progrese la infección, la mayoría de las células tendrán la menor cantidad de parásitos posibles, y progresivamente aumenta el rango máximo de parásitos por célula al que llega el cultivo en cada día. También es notable que ambas líneas celulares presentan comportamientos similares, aunque la línea H9c2(2-1) alcanza un rango de parásitos mayor en el último día mostrado, lo que puede atribuirse a que todos los parámetros de infección son ligeramente mayores en esta línea que en la 3T3 NIH.

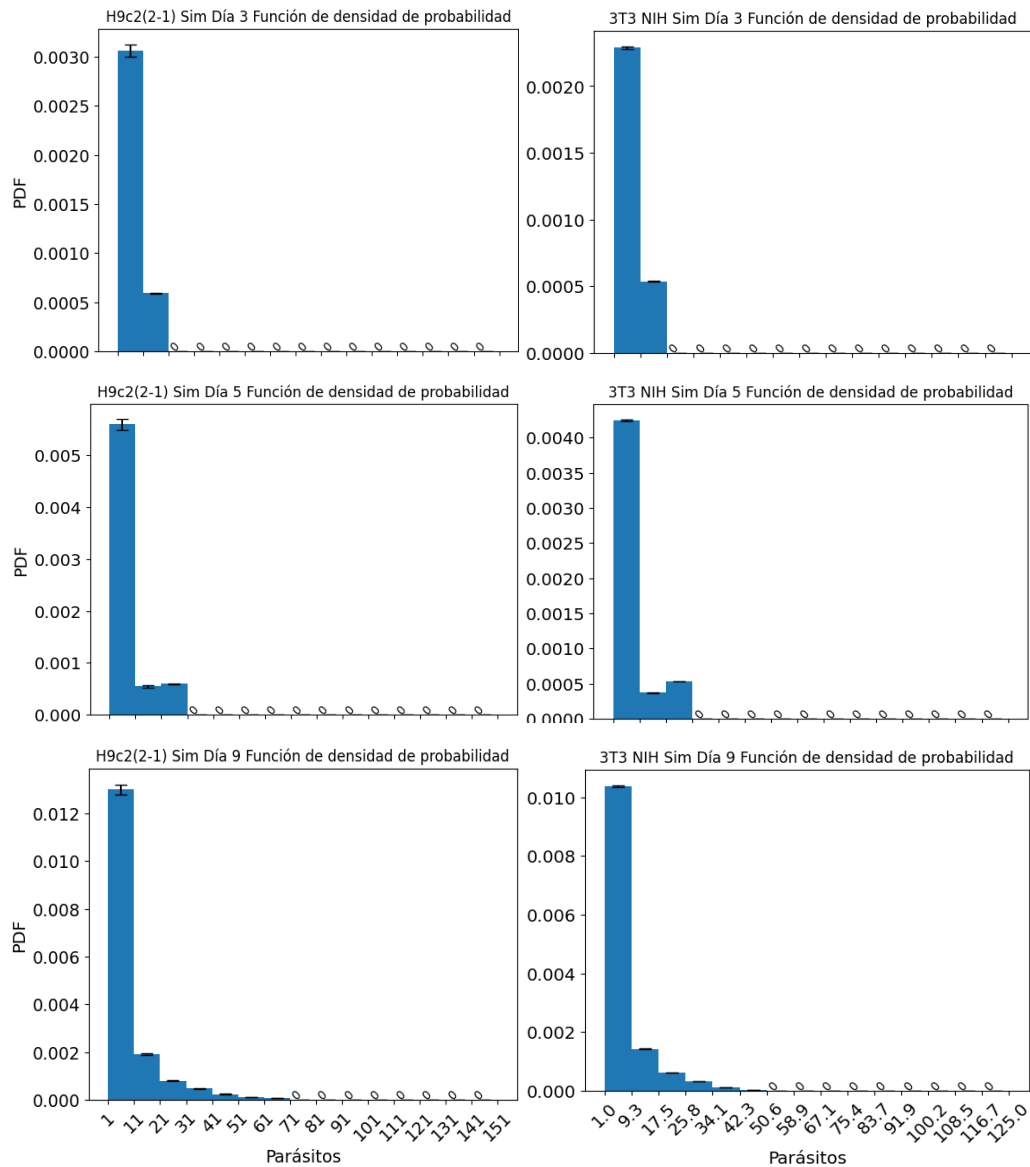


Figura 22. Distribución de parásitos por célula normalizados en los días 3, 5 y 9 de las líneas celulares H9c2(2-1) (izq.) y 3T3 NIH (der.) con los parámetros de infección optimizados ($n = 100$).

Finalmente, en la Figura 23 se muestran comparaciones (solamente visuales) entre las distribuciones obtenidas a partir de las imágenes de cultivo de infección y de las simulaciones para las líneas analizadas al día 9. Lo más rescatable es que, en ambos casos, la distribución es bastante similar, aunque en

general las distribuciones obtenidas a partir de imágenes alcanzan mayores rangos de infección, los cuales tienen probabilidades muy bajas en comparación al resto. También es notable que las probabilidades en sí son bastante diferentes entre datos experimentales y simulaciones, siendo menor la probabilidad para las simulaciones, lo cual puede deberse, por un lado, a imprecisiones del programa de conteo, por otro, a que la cantidad de células consideradas en la simulación puede no corresponderse a la cantidad de células en cultivo durante la infección, la cual no se reportó en el trabajo de Arias del Ángel.

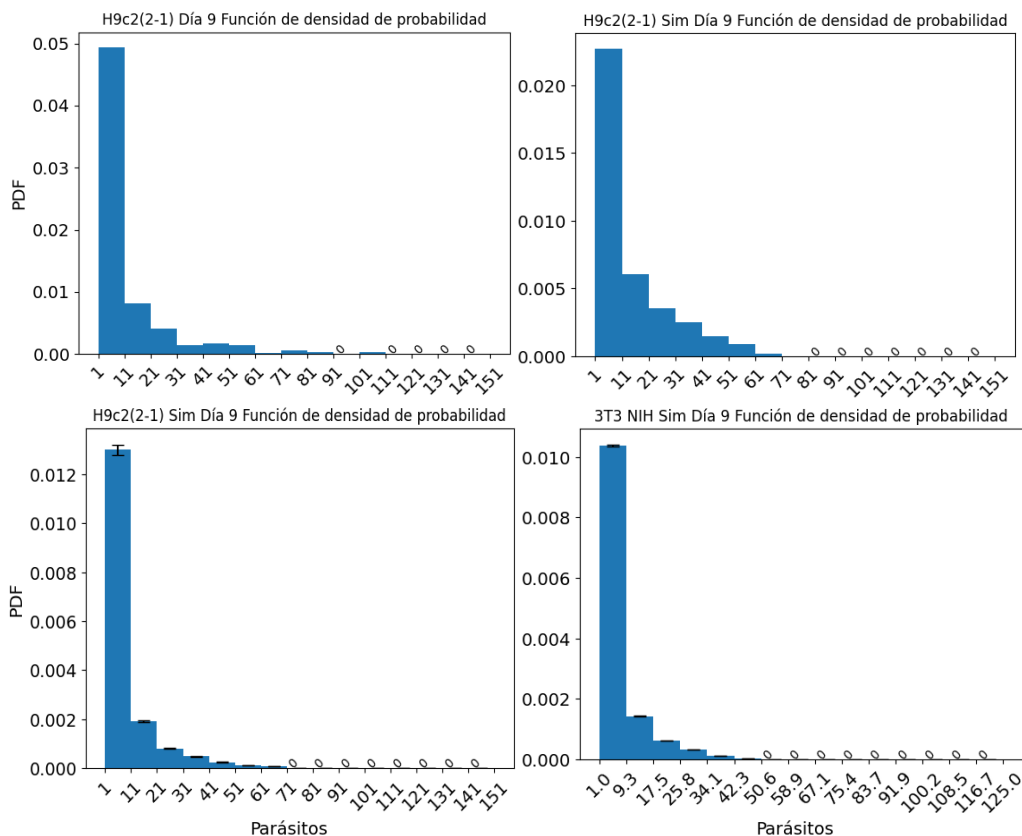


Figura 23. Comparación de la distribución de parásitos por célula para el día 9 de infección obtenido a partir de imágenes (izq.) y simulaciones (der.) para las líneas H9c2(2-1) y 3T3 NIH.

9. Discusión

En este trabajo se analizó la cinética y dinámica de infección de *T. cruzi* en cultivo celular, por medio del análisis de imágenes y de simulaciones computacionales, tomando como base los resultados experimentales reportados por Arias del Ángel *et al.* (2020); en particular, se estudió si la cinética de infección reportada se puede explicar dinámicamente por tres componentes: la infección por parásitos libres, la infección por interacción entre célula infectada y no infectada, y la tasa de crecimiento intracelular de los parásitos. Para analizar este último componente, se utilizaron las imágenes de microscopía de fluorescencia tomadas a cultivos celulares infectados con *T. cruzi* a diversos tiempos por Arias del Ángel, y se desarrolló una herramienta de procesamiento de imágenes para el conteo automatizado de parásitos por célula. A partir de esta herramienta, se obtuvieron las posibles distribuciones de parásitos por célula a cada tiempo de análisis. Para analizar la dinámica de infección, se diseñó un modelo computacional de tipo autómatas celular, donde se establecieron las reglas de simulación para las tres componentes de infección. Con este modelo se logró simular las cinéticas de infección de las líneas celulares H9c2(2-1) y 3T3 NIH, las cuales presentaron los mayores porcentajes de infección, por lo cual se eligieron para este estudio. Finalmente, a partir de las comparaciones entre las distribuciones de parásitos por célula obtenidas mediante el análisis de imágenes, y las obtenidas mediante simulación, se obtuvieron las posibles tasas de crecimiento intracelular del parásito para dichas líneas celulares.

En primer lugar, se desarrolló y probó la herramienta de cuantificación de parásitos por célula. La capacidad de este programa para cuantificar correctamente las células y parásitos en las imágenes depende en gran medida de las características de estas últimas. Por ejemplo, durante el mejoramiento de las imágenes, se notó que había una heterogeneidad considerable en el brillo de

fondo de una misma imagen y dentro del conjunto de imágenes de una misma línea celular, lo que hace complicado establecer un tratamiento general para todas las imágenes. Además, la variación en los tamaños y formas de los núcleos, y en especial su superposición, particularmente en las líneas H9c2(2-1) y 3T3 NIH, representó un reto para el mejoramiento. Con estas consideraciones, se buscó que los filtros usados eliminen la mayor cantidad de ruido sin afectar a las estructuras de interés. Existen programas para el procesamiento científico de imágenes como ImageJ (desarrollado por Wayne Rasband, NIH), un programa tipo *suite* de herramientas para el mejoramiento y procesamiento de imágenes, que se utiliza en la institución para, por ejemplo, el conteo de células. Si bien este programa ya contiene como funciones muchos de los filtros utilizados en este trabajo, se optó por realizar un nuevo programa (el cual incluye el algoritmo creado por John C. Croker, como se describió en la sección de Metodología) para poder ajustar los parámetros finamente y poder acoplar el algoritmo de conteo de células al algoritmo de conteo de parásitos.

Una vez mejoradas las imágenes, se procedió al desarrollo de dichos algoritmos. En primer lugar, se desarrolló el algoritmo de conteo celular. Este se basa en la forma, tamaño y separación de las estructuras, que, como ya vimos, es uno de los grandes retos en el análisis de estas imágenes. La presencia del DNA de los parásitos, particularmente cuando están cerca del núcleo, también puede aumentar la variación en los resultados.

Otros trabajos han abordado la tarea de cuantificar células y parásitos a partir de imágenes de fluorescencia. Nohara *et al.* (2010), utilizaron DAPI para la tinción del DNA y transfectaron las células de mamífero para expresar GFP y poder visualizar el área de la célula y delimitar el espacio. Para la segmentación de núcleos, utilizaron umbrales de brillantez para definir las regiones celulares, sin embargo, no describen el proceso de segmentación como tal. El programa utilizado en este trabajo utiliza los diferentes niveles de brillantez de los

núcleos, ya que la alta variación del brillo de fondo, y la presencia de artefactos de tinción, dificulta utilizar la binarización en la mayoría de los casos. Estos autores no reportan la precisión del programa en la cuantificación de núcleos, por lo que no se pueden realizar comparaciones en este sentido. Noguera *et al.* (2013) desarrollaron un algoritmo complejo para el conteo de núcleos y parásitos, utilizando diversos filtros para el mejoramiento de la imagen, como dilatación, erosión, mediana, operadores de conjuntos, entre otros, y el algoritmo de watershed como algoritmo de segmentación. Este se basa en la concepción de una imagen en escala de grises como una superficie topográfica donde la intensidad de brillantez denota los picos, valles y mesetas. La principal diferencia entre las imágenes usadas por Noguera *et al.* y este trabajo es que las primeras son imágenes de microscopía de campo claro con tinción de Giemsa, que utiliza azul de metileno y eosina para teñir los núcleos y citoplasma de las células y parásitos. Por lo tanto, trabajan con las tres componentes del sistema RGB, mientras que, en nuestro caso, se utilizan las componentes B y G por separado para distintos objetivos. El algoritmo watershed se probó para la segmentación de núcleos en las imágenes utilizadas, sin embargo, resultó complicado aplicarlo debido a la heterogeneidad de brillantez dentro de un mismo núcleo, y a la superposición de éstos. Para mitigar este problema, Noguera *et al.* (2013) utilizaron marcadores para modificar el gradiente de la imagen por medio de la imposición de mínimos. Consideran dos tipos de marcadores, internos y externos, los internos representan las estructuras segmentadas, y los externos son píxeles a media distancia entre un marcador interno y otro. Esto les permite separar las estructuras, y determinar con mayor precisión el área del objeto segmentado. De esta forma pueden diferenciar entre núcleos y parásitos por el tamaño de área. Es interesante resaltar que, en nuestro caso, los parásitos teñidos por DAPI representan un porcentaje mucho menor de las estructuras en la imagen que los núcleos en general (a pesar de que en el canal de fluorescencia de GFP son abundantes), y en la mayoría de los casos se

eliminan con los filtros utilizados, a diferencia de Noguera *et al.*, quienes trabajan y segmentan parásitos y núcleos en el mismo canal. Para evaluar sus resultados, realizaron el conteo manual de núcleos y amastigotes, y compararon con su programa determinando el porcentaje de verdaderos positivos (parásitos contados correctamente), verdaderos negativos (núcleos celulares detectados y eliminados), falsos positivos (núcleos celulares o sus restos clasificados como parásitos), y falsos negativos (parásitos no clasificados como tal). Cabe mencionar que utilizaron personal cualificado para realizar el conteo, lo que aumenta la certidumbre de su análisis. En nuestro caso, la forma de evaluar el programa fue mediante el cálculo del error relativo porcentual, el cual no distingue entre positivos y negativos, verdaderos y falsos, solo considera qué tanto se aleja el valor de conteo del programa al del conteo manual. Además, cabe mencionar que en nuestro caso no se contó con personal cualificado para el conteo, por lo que este también tiene incertidumbre. Noguera *et al.* obtienen un 85.26% de verdaderos negativos (núcleos celulares detectados), que sería el dato más comparable al nuestro de 9.11% de error en promedio (90.89% de conteo correcto). El problema de utilizar el error relativo porcentual como única medida de evaluación es que los falsos positivos se compensan con los falsos negativos, por lo que puede ser engañosa esa cifra. Esto se abordó de forma superficial al indicar si había una sobreestimación o subestimación del número de núcleos (Tablas 1 – 4), donde en general se presenta una subestimación para la mayoría de los casos. Durante el ajuste de los parámetros de conteo, se buscó que no hubiera demasiados falsos negativos, pero esto solo es seguro para las imágenes de muestra, las demás imágenes se revisaron superficialmente. Liempi *et al.* (2015) también desarrollaron un sistema para el conteo de núcleos y parásitos en cultivo celular, donde utilizan DAPI para la visualización en las imágenes de los núcleos celulares y parásitos. Ellos también utilizaron el algoritmo de watershed para realizar la segmentación y discriminación por tamaño. Para la asignación de parásitos a las células, utilizaron un análisis de

diagrama de Voronoi (Pokojski y Pokojaska, 2018), el cual es similar al método utilizado por Noguera *et al.*, pero menos sofisticado. Para evaluar su programa, determinaron manualmente el porcentaje de células infectadas a diferentes horas, y compararon contra las medias del programa, sin encontrar diferencia significativa. Además, correlacionaron los resultados de ambos métodos, obteniendo una r^2 de 0.9159. Si bien en nuestro caso no se realizaron pruebas estadísticas para comparar entre el conteo manual y automático, se puede realizar una correlación. Para la línea H9c2(2-1), se tiene una r^2 de 0.9888, para 3T3 NIH una r^2 de 0.9409, para 3T3 S una r^2 de 0.8626, y para Caco2 una r^2 de 0.5039. En los primeros dos casos, la r^2 supera 0.9, y en el caso de la línea Caco2, es del 0.5, lo que indica que no es un buen estimador del número de células.

Siguiendo con el análisis de los trabajos antes mencionados, en cuanto a la cuantificación de los parásitos, Noguera *et al.* obtuvieron un 85.63% de verdaderos positivos (parásitos contados correctamente), mientras que en nuestro caso se obtuvo un 8.42% de error en promedio (Tablas 5 y 6, 91.58% de conteo correcto). Sin embargo, para este valor se aplican las mismas consideraciones que para el conteo de núcleos. Siguiendo con la forma de evaluación de Liempi *et al.*, (quienes obtuvieron una r^2 de 0.9159 en la correlación entre el porcentaje de células infectadas determinado manualmente y mediante su programa), el conteo en el canal de GFP muestra una r^2 de 0.9954, y el canal de DAPI una r^2 de 0.8205.

Finalmente, evaluar y comparar los resultados de asignación de parásitos a las células es complicado, ya que no contamos con la información del área de la célula, lo que hace sumamente complicado hacer un análisis comparativo entre el conteo manual y el automatizado, por lo que, en ese aspecto, la única evaluación realizada fue visual para algunas imágenes. De forma similar a lo realizado por Nohara *et al.*, visualizar el citoplasma o la membrana de la célula

es, probablemente, la mejor forma de asignar correctamente los parásitos a cada célula. Otra alternativa es el uso de los diagramas de Voronoi, sin embargo, puede que su aplicación sea limitada en las imágenes altamente saturadas de parásitos. Cabe mencionar que, dentro de la literatura revisada, no se han realizado análisis de infección para etapas avanzadas (más de 5 días), por lo que el problema del conteo de parásitos (amastigotes y tripomastigotes) en células evidentemente saturadas no se ha abordado. En nuestro caso, si bien se realizaron estimaciones para los casos difícilmente contables, tampoco se tiene una forma evidente de evaluar el conteo.

Ahora bien, a pesar de que el objetivo del programa de análisis de imágenes fue obtener las distribuciones de parásitos por célula, permítasenos discutir esos resultados en conjunto con los resultados de distribución obtenidos a partir de las simulaciones después de analizar las demás partes del modelo, con el fin de abordar la cuestión una vez se han esclarecido las limitantes y consideraciones de este.

En primera instancia, abordemos la base del modelo, que es el espacio del autómata celular, el cual tiene una frontera de tipo circular o periódica, donde las células en los extremos de la matriz tienen como vecinos las células del extremo opuesto, como si el plano se plegara. Esto implica que las células pueden crecer, infectar o infectarse como si se encontraran en la superficie de una esfera, a diferencia de una placa, donde las células del límite están incomunicadas por las paredes de ésta. Esto podría implicar que el crecimiento o la infección por interacción entre células avance más rápido que en el cultivo real, o que las probabilidades reales sean engañosas, ya que las células en los bordes están incomunicadas en la realidad. Bajo este orden de ideas, también es importante considerar la muerte celular, la cual no está implementada en el modelo, salvo la lisis en función de los parásitos intracelulares. Normalmente no se presenta muerte celular cuando los cultivos se encuentran en buen estado.

La muerte celular en general se puede dividir en tres tipos, necrosis, apoptosis y autofagia, que difieren en sus causas y mecanismos. En general, bajo las condiciones del cultivo celular (sin infección), ninguno de estos tipos de muerte celular debería activarse (Krampe y Al-Rubeai, 2010; Merck, 2023). En principio, las condiciones de estrés extremo como cambios bruscos de temperatura, osmolaridad y pH, infecciones (contaminación), compuestos tóxicos, falta de nutrientes, o adición de moléculas pro-apoptóticas, son posibles inductores de muerte celular. En nuestro caso, el crecimiento se ajusta a la ecuación logística, donde las células disminuyen su velocidad de crecimiento (global) conforme saturan el espacio disponible, sin embargo, en términos metabólicos, se podría considerar que las células se encuentran siempre en fase exponencial. Esto sería equivalente a realizar la resiembra durante la fase exponencial y a realizar un cultivo sin contratiempos.

Otro punto es que las células pueden nacer, infectarse e infectar a otras por contacto (lo correcto sería hacer referencia a la infección ocurrida por cercanía entre células, pero para acortar se mencionará como infección por contacto) durante el mismo ciclo de simulación, es decir, una hora. Si lo consideramos a nivel individual, no tiene mucho sentido que una célula se divida en una hora, ya que, por ejemplo, para las células H9c2(2-1) el tiempo de duplicación reportado es de aproximadamente 54 h (Dott *et al.* 2014). Sin embargo, en términos globales, esto no tiene mucha relevancia, ya que no interesa diferenciar a las células entre sí, solo hasta que la célula se ha infectado es cuando nos interesa analizar su evolución. Es poco probable que una célula recién dividida no pueda ser infectada, sin embargo, sí es poco probable que una célula recién infectada infecte a otra por contacto, lo cual no tiene inconveniente en la simulación si consideramos que la probabilidad de que una sola célula infectada infecte a otra por contacto es muy baja (aunque no nula), ya que entre más células infectadas con más parásitos haya alrededor de una

célula, más probable es que se infecte. Probablemente, en el cultivo, la infección se dé por una célula con abundantes parásitos, sin embargo, en el modelo no se registra qué célula transmitió el parásito ni se le resta ese parásito.

Otra consideración importante es que no hay distinción entre amastigotes ni tripomastigotes (no se consideran los epimastigotes ya que los cultivos de infección son de infecciones secundarias, es decir, solamente con tripomastigotes). En el modelo, los parásitos se dividen solo cuando están en la célula, lo cual se atribuye solo a los amastigotes; cuando están libres en el medio, pueden infectar a cualquier célula, lo cual se atribuye principalmente a los tripomastigotes (Fernandes y Andrews, 2012). Si bien se ha reportado que los amastigotes también pueden infectar a las células (Ley *et al.* 1988; Fernandez y Andrews, 2012), no son motiles como los tripomastigotes, por lo que tienen mucho mayor rango de infección. En la infección en mamíferos, la transición de amastigotes a tripomastigotes resulta crucial para la infección aguda, pues el daño celular y tisular es resultado de la lisis causada por los últimos, originando los síntomas (Texeira *et al.* 2006), mientras que, probablemente, la interacción entre el sistema inmune y el parásito induce la persistencia en la forma de amastigotes.

También es importante considerar que se está suponiendo de que todos los parásitos libres pueden interactuar con todas las células inmóviles, si bien esto es posible, lo más probable es que los parásitos liberados en determinado sitio infecten a las células más cercanas, y se vayan distribuyendo por su propia motilidad. La motilidad de los parásitos también fue abordada por Arias del Ángel *et al.* (2020), donde observaron que en ausencia de células de mamífero tienen un comportamiento difusivo, mientras que, en presencia de éstas, es subdifusivo, y varía dependiendo de la línea celular, y probablemente de la cepa de *T. cruzi*. Debido a esta observación, la idea de simular la distribución de parásitos en el medio, mediante la ecuación de difusión, por ejemplo, se vuelve

limitada, ya que la evidencia apunta a que los parásitos no se mueven de forma completamente aleatoria, sino que pueden tender a moverse hacia las células. Sin embargo, puede utilizarse como primera aproximación.

A pesar de que las simulaciones pueden reproducir las cinéticas de infección (porcentaje de población infectada), se utilizaron los valores de crecimiento y población máxima de las cinéticas de crecimiento (sin infección), y se inició con la mitad de este último (50% confluencia). Arias del Ángel utilizó cubreobjetos de 18 mm x 18 mm, y en ellos cultivó las células, por lo que la cantidad máxima de células difiere considerablemente. Si bien la probabilidad de crecimiento debería ser la misma independientemente del tamaño de la placa, la relación entre la cantidad de parásitos y células al iniciar la infección sí puede modificar los parámetros. Se reportó el uso de 1.95×10^5 parásitos, valor que se utilizó en las simulaciones, por lo cual, es de esperar que haya diferencias entre las probabilidades de infección reales y las calculadas. Para corregir esto, lo ideal sería realizar los cultivos de infección y determinar la cinética de crecimiento durante la infección, con lo que también se podría analizar si el crecimiento se ve afectado significativamente.

Ignorando de momento estas diferencias, cuyo peso sobre los resultados son desconocidos, comparemos los valores de propensión obtenidos por Arias del Ángel y en este trabajo. Para la línea H9c2(2-1), obtuvo una propensión de $2 \times 10^{-7} \text{ h}^{-1} \text{ parásitos}^{-1}$ para la infección por parásito libre y $4.08 \times 10^{-8} \text{ h}^{-1} \text{ célula}^{-1}$ para la infección por contacto, mientras que, en este trabajo, se obtuvo una propensión de $1 \times 10^{-9} \text{ h}^{-1} \text{ parásito}^{-1}$ y $9.7 \times 10^{-4} \text{ h}^{-1} \text{ parásito intracelular}^{-1}$, para la infección por parásito libre y por contacto, respectivamente. Entre estos valores hay algunos aspectos destacables. En primer lugar, entre ambos tipos de infecciones, Arias del Ángel observó poca diferencia entre sus propensiones, mientras que en este trabajo hay hasta 5 órdenes de magnitud de diferencia. En segundo lugar, en su trabajo obtuvo mayor propensión para la infección por

parásito libre, mientras que en nuestro caso fue al revés. Sin embargo, hay una diferencia que cabe resaltar, la propensión de infección por contacto en el modelo de Arias del Ángel mide la probabilidad de que una célula infectada infecte a una no infectada, sin importar la cantidad de parásitos intracelulares, y además, entre más células infectadas haya en cada intervalo, mayor probabilidad, sin embargo, hemos mencionado que aquí radica una debilidad de ese modelo, que la capacidad de infectar de las células infectadas (o de transmitir parásitos) es en esencia limitada. En nuestro caso, la probabilidad depende de la cantidad de parásitos intracelulares en la vecindad de la célula susceptible de infectarse, por lo cual, es de esperarse que la propensión sea mayor, ya que se requiere de más elementos en comparación del otro modelo. En realidad estos valores no son directamente comparables, pero, analizando estos resultados, nuestro modelo parece sugerir que la infección por contacto tendría un mayor peso que la infección por parásito libre en explicar la dinámica en el cultivo, no solo porque la propensidad de infección por contacto es mayor en comparación de la infección por parásito libre y del resultado de Arias del Ángel, sino porque, como se observa en la Figura 20, la infección por contacto se ajusta mejor por sí sola a los resultados que la infección por parásito libre. Este caso es el mismo para la línea 3T3 NIH.

Finalmente, al comparar las funciones de densidad de probabilidad de que una célula tenga un rango determinado de parásitos a cada instante de tiempo analizado entre las distribuciones obtenidas a partir de imágenes y de simulaciones, resalta a la vista que su comportamiento es similar, presentando una caída exponencial, siendo las distribuciones de imágenes las que alcanzan mayores rangos de parásitos en general. Sin embargo, al analizar los valores de las probabilidades, se observa que en general son mayores para las distribuciones de imágenes que en las simulaciones. En primer lugar, se podría considerar que puede deberse al programa de análisis de imágenes, cuya

precisión no se validó, por lo cual, asumiendo que esos resultados sean correctos, las diferencias con las simulaciones pueden deberse a la diferencia de cantidad de células utilizadas o variaciones en el crecimiento durante la infección, y que estas alteraciones respecto a la condición experimental alteren las distribuciones. La velocidad de crecimiento de parásitos intracelulares, representado por el parámetro (**a**) en la Tabla 8, muestra que la diferencia entre la línea H9c2(2-1) y 3T3 NIH es de apenas 0.00065 h^{-1} . Es difícil esclarecer si este valor es significativo, debido a las diferencias entre las distribuciones obtenidas de imágenes y de simulaciones. Una vez que se pueda confirmar que las distribuciones a partir de imágenes son correctas, se puede ajustar nuevamente los parámetros para que las simulaciones coincidan tanto en las cinéticas de infección como en las distribuciones de parásitos, y el parámetro de crecimiento de parásitos intracelulares nos permitirá comparar con mayor confianza entre líneas celulares e incluso cepas de parásitos. Con los datos actuales, aparentemente no hay diferencia entre la velocidad de crecimiento en la línea H9c2(2-1) y 3T3 NIH, sino que en general, la cepa CL Brener tiene menor capacidad infectiva sobre la línea 3T3 NIH, sin embargo, no es una diferencia probada de forma estadística, por lo que no se puede concluir rotundamente al respecto.

A modo de resumen de lo que se ha discutido arriba, se tiene que de forma general se han utilizado estrategias de mejoramiento de imágenes similares a las de la literatura. No se ha reportado el uso de ninguno de los algoritmos de segmentación utilizados, ya que el más ampliamente usado es el algoritmo de watershed, sin embargo, las comparaciones y observaciones indican que posiblemente los algoritmos usados son suficientes para la cuantificación. A diferencia de técnicas de agrupación como el diagrama de Voronoi, nuestro programa utiliza un área arbitraria para delimitar las células, con las limitantes que eso implica. Finalmente, la evaluación de la capacidad de conteo difiere

considerablemente de lo reportado, ya que la mayoría de los trabajos realizan un conteo manual exhaustivo y llevado a cabo por personal entrenado en el conteo de células de mamífero y de parásitos de *T. cruzi*. En el caso del modelo computacional, a pesar de las suposiciones o simplificaciones realizadas, es capaz de reproducir con cierta fidelidad la cinética de infección a partir de los elementos de infección que lo integran, por lo que, como primera aproximación mediante este modelo, permitió el estudio de la infección en cultivo celular. Finalmente, las distribuciones de parásitos por célula obtenidas a partir de imágenes cargan con cierta incertidumbre, particularmente en los días finales, y, a pesar de que para los primeros días el modelo reproduce el comportamiento de las primeras, solo se pueden dar indicios o sugerencias sobre las diferencias de la tasa de crecimiento de parásitos intracelulares entre las líneas celulares analizadas.

10. Conclusiones

- La herramienta computacional desarrollada para la cuantificación de parásitos intracelulares a partir del procesamiento de imágenes de fluorescencia de cultivo celular permitió obtener las distribuciones de parásitos por célula en cada instante de tiempo analizado, las cuales decaen exponencialmente a partir del rango mínimo hasta el máximo, de forma general, para los primeros 9 días de infección.
- El modelo computacional desarrollado para simular la infección de *T. cruzi* en cultivo celular, permitió analizar las componentes de infección: infección por parásito libre, infección por interacción entre células infectadas-no infectadas y velocidad de crecimiento de parásitos intracelulares, mostrando diferencias contra los resultados previamente reportados para los dos primeros elementos.
- Los resultados del análisis del modelo sugieren que la infección por interacción entre células infectadas-no infectadas posiblemente tenga un mayor peso en determinar la cinética de infección de *T. cruzi* en comparación con la infección por parásitos libres.
- A partir de los resultados no se puede determinar si hay diferencia significativa entre la velocidad de crecimiento intracelular de *T. cruzi* CL Brener en las líneas H9c2(2-1) y 3T3 NIH, o si ésta tiene mayor peso que las demás componentes de infección.

11. Perspectivas

Algunas mejoras que se pueden hacer tanto a la herramienta de cuantificación de células y parásitos y al modelo computacional, y experimentos para el estudio de la dinámica de infección de *T. cruzi* en cultivo celular, son los siguientes:

- Integrar algoritmos de agrupación como el diagrama de Voronoi para estimar el área que abarca una célula o asignarle los parásitos que más probablemente le pertenezcan.
- Facilitar la asignación utilizando células con algún agente revelador de su morfología, como algún fluoróforo unido a la membrana, citoesqueleto o presente en el citoplasma para diferenciar el área que abarca cada célula, en una longitud de onda de emisión diferente de la utilizada para visualizar los parásitos. Usar una línea celular que forme una monocapa, como células epiteliales, permitiría facilitar esta tarea, sin embargo, debe probarse su capacidad de ser infectada.
- Realizar un escaneo tridimensional mediante un microscopio de confocal de fluorescencia a las células más saturadas de parásitos, lo que permitiría tomar imágenes a distintos planos, y diseñar un programa para la reconstrucción de la célula o el conteo de los parásitos en las tres dimensiones. Sin embargo, es necesario analizar la viabilidad de esto para la cuantificación a gran escala.
- Añadir otros elementos, como la difusión y movimiento de los parásitos libres en el cultivo, apoyado con los datos obtenidos por Arias del Ángel, permitiría sopesar nuevamente el papel de los distintos elementos de infección. También la adición de elementos del sistema inmune podría permitir expandir la capacidad del modelo a estudiar la infección in vivo.

- Realizar experimentos de infección en cultivo celular y determinar la cinética de crecimiento celular con y sin infección, y determinar el grado en el que la infección afecta al crecimiento y añadirlo al modelo.

12. Referencias

- Arias del Ángel J.A., Santana-Solano J., Santillán M., Manning-Cela R.G. 2020. Motility patterns of *Trypanosoma cruzi* trypomastigotes correlate with the efficiency of parasite invasion *in vitro*. Scientific Reports. 10:15894. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-72604-4>.
- Arias del Ángel J.A., Santillán M., Manning-Cela R.G. 2020. Dynamics of Mammalian Cell Infection by *Trypanosoma cruzi* trypomastigotes. Frontiers in Microbiology. Vol. 11:559660. doi: 10.3389/fmicb.2020.559660.
- Arnal, A., Waleckx, E., Rico-Chávez, O., Herrera, C., & Dumonteil, E. (2019). Estimating the current burden of Chagas disease in Mexico: A systematic review and meta-analysis of epidemiological surveys from 2006 to 2017. PLoS neglected tropical diseases, 13(4), e0006859. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0006859>.
- Bonabeau, E. 2002. Agent-based modeling: Methods and techniques for simulating human systems. PNAS. Vol. 99: 7280 – 7287. Doi: 10.1073/pnas.082080899.
- Burden, R.L. & Faires, J.D. 2002. Capítulo 8 Teoría de la aproximación. 8.1 Aproximación discreta por mínimos cuadrados. En *Análisis numérico*. 7ª ed. Thomson Learning. México.
- Carpenter A., Kamensky L. & Eliceiri K. 2012. A call for bioimaging software usability. Nat. Methods. Vol. 9: 666–670. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2073>.
- Cavalcanti D. P., de Souza, W. 2018. The Kinetoplast of Trypanosomatids: From Early Studies of Electron Microscopy to Recent Advances in Atomic Force Microscopy. Scanning, 2018, 9603051. <https://doi.org/10.1155/2018/9603051>.

CDC. 2019. Biology. Parasites – American Trypanosomiasis (also known as Chagas disease). Revisado el 16 de abril de 2022 en <https://www.cdc.gov/parasites/chagas/biology.html>.

CDC. 2019. Disease. Parasites – American Trypanosomiasis (also known as Chagas disease). Revisado el 16 de abril de 2022 en <https://www.cdc.gov/parasites/chagas/disease.html>.

CDC. 2022. Enfermedad de Chagas – Hoja informativa detallada. Parásitos. Recuperado el 13 de septiembre de 2022 de <https://www.cdc.gov/parasites/chagas/es/informativa/detallada.html>.

Da Silva E.A.B., Mendonça G.V. 2005. Digital Image Processing. In (Ch. 4), The Electrical Engineering Handbook. Academic Press. Pag. 891. <https://doi.org/10.1016/B978-012170960-0/50064-5>.

De Freitas L. M., Maioli T. U., de Ribeiro H. A. L., Tieri P., Castiglione F. 2018. A mathematical model of Chagas disease infection predicts inhibition of the immune system. IEEE International Conference on Bioinformatics and Biomedicine (BIBM): 1374 – 1379. doi: 10.1109/BIBM.2018.8621389.

de Souza, W. 2019. Introductory Chapter: Biology of *Trypanosoma cruzi*. In (Ed.), Biology of *Trypanosoma cruzi*. IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/intechopen.88571>.

Díaz ML. González CI. Enfermedad de Chagas agudo: transmisión oral de *Trypanosoma cruzi* como una vía de transmisión re-emergente. 2014. Rev. Univ. Ind. Santander. Salud. Vol. 46(2): 177-188.

Dott W, Mistry P, Wright J, Cain K, Herbert KE. 2014. Modulation of mitochondrial bioenergetics in a skeletal muscle cell line model of mitochondrial toxicity. Redox Biol. Vol. 2:224–233. doi: 10.1016/j.redox.2013.12.028.

Fernandes M.C., Andrews N.W. 2012. Host Cell Invasion by *Trypanosoma cruzi*: A Unique Strategy that Promotes Persistence. *FEMS Microbiol Rev.* Vol. 36(3): 761 – 747. doi:10.1111/j.1574-6976.2012.00333.x.

García-Huertas P. y Cardona-Castro N. 2021. Advances in the treatment of Chagas disease: Promising new drugs, plants and targets. *Biomedicine & Pharmacotherapy.* Vol. 142:112020. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2021.112020>.

Gonzalez R.C. y Woods R.E. 2002. *Digital Image Processing*. 2a ed. Prentice Hall. USA. Págs.: 15 – 42, 75 – 134, 220 – 272.

Hidayat D., Nugraha E.S., Nuraini N. 2017. A Mathematical Model of Chagas Disease Transmission. *Smyposium on BioMathematics. AIP Conf. Proc.* 1937, 020008-1–020008-8; <https://doi.org/10.1063/1.5026080>.

Krampe, B., & Al-Rubeai, M. 2010. Cell death in mammalian cell culture: molecular mechanisms and cell line engineering strategies. *Cytotechnology*, 62(3), 175–188. <https://doi.org/10.1007/s10616-010-9274-0>.

Lehotzky D., Zupanc G.K.H. 2019. Cellular Automata Modeling of Stem-Cell-Driven Development of Tissue in the Nervous System. *Dev. Neurobiol.* Vol. 79(5): 497 – 517. <https://doi.org/10.1002/dneu.22686>.

Ley V, Andrews N W, Robbins E S, Nussenzweig V. 1988. Amastigotes of *Trypanosoma cruzi* sustain an infective cycle in mammalian cells. *J Exp Med.* Vol. 168 (2): 649–659. doi: <https://doi.org/10.1084/jem.168.2.649>.

Liempi A., Castillo C., Cerda M., *et al.* 2015. *Trypanosoma cruzi* infectivity assessment in “*in vitro*” culture systems by automated cell counting. *Acta Tropica.* Vol. 143: 47 – 50.

MayoClinic. 2022. Cardiomiopatía dilatada. Enfermedades y afecciones. Mayo Foundation for Medical Education and Research (MFMER). Revisado el 03 de octubre de 2022 en <https://www.mayoclinic.org/es-es/diseases-conditions/dilated-cardiomyopathy/symptoms-causes/syc-20353149>.

Merck. 2023. Cell death troubleshooting in cell culture. Revisado el 19 de junio de 2023 en <https://www.sigmaaldrich.com/MX/es/technical-documents/technical-article/cell-culture-and-cell-culture-analysis/mammalian-cell-culture/cell-culture-troubleshooting-cell-death>.

Mora G. 2016. Chagas cardiomyopathy. E-Journal of Cardiology Practice. Vol. 14(31). European Society of Cardiology. Revisado el 03 de octubre de 2022 en <https://www.escardio.org/Journals/E-Journal-of-Cardiology-Practice/Volume-14/Chagas-cardiomyopathy>.

NIH. s.f. ImageJ. Introduction. Revisado el 9 de junio de 2023 en <https://imagej.nih.gov/ij/docs/intro.html>.

Noguera J.L.V., Ayala H.L., Shaerer C.E. y Rolón M. 2013. Mathematical morphology for counting *Trypanosoma cruzi* amastigotes. XXXIX Latin American Computing Conference. (CLEI).

Nohara L.L., Lema C., Bader J.O., Aguilera R.J. y Almeida I.C. 2010. High-content imaging for automated determination of host-cell infection rate by the intracellular parasite *Trypanosoma cruzi*. Parasitology International. Vol. 59: 565 – 570. doi:10.1016/j.parint.2010.07.007.

OpenCV. 2023. Image Segmentation with Watershed Algorithm. Open Source Computer Vision. Revisado el 9 de junio de 2023 en https://docs.opencv.org/4.x/d3/db4/tutorial_py_watershed.html.

Pokojski W. y Pokojaska P. 2018. Voronoi diagrams – inventor, method, applications. *Polish Cartographical Review*. Vol. 50(3): 141 – 150.

Ramsey, J. M., Peterson, A. T., Carmona-Castro, O., Moo-Llanes, D. A., Nakazawa, Y., Butrick, M., Tun-Ku, E., la Cruz-Félix, K. d., & Ibarra-Cerdeña, C. N. 2015. Atlas of Mexican Triatominae (Reduviidae: Hemiptera) and vector transmission of Chagas disease. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, 110(3), 339–352. <https://doi.org/10.1590/0074-02760140404>.

Rodríguez-Bejarano O.H., Avendaño C., Patarroyo M.A. 2021. Mechanisms Associated with *Trypanosoma cruzi* Host Target Cell Adhesion, Recognition and Internalization. *Life*. Vol. 11: 534. <https://doi.org/10.3390/life11060534>.

Souza W., Carvalho T.M.U., Barrias E.S. 2010. Review on *Trypanosoma cruzi*: Host Cell Interaction. *International Journal of Cell Biology*. Vol. 2010:295394. doi:10.1155/2010/295394.

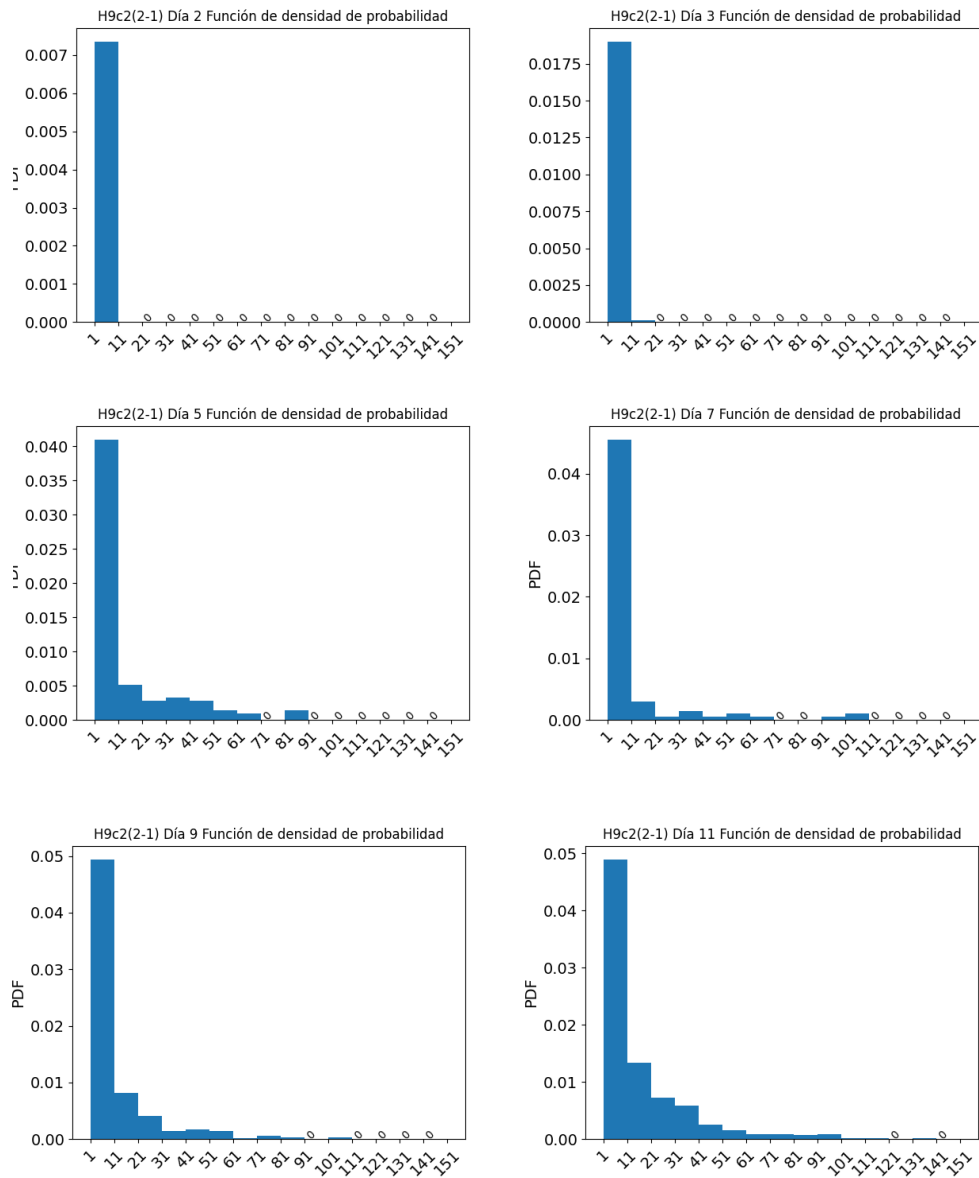
Teixeira ARL, Bascimento RJ, Sturm NR. 2006. Evolution and pathology in Chagas disease – A review. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. Vol. 101(5): 463 – 491.

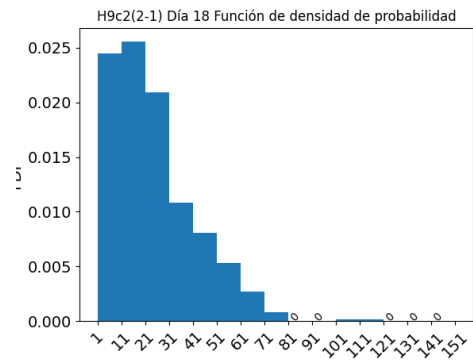
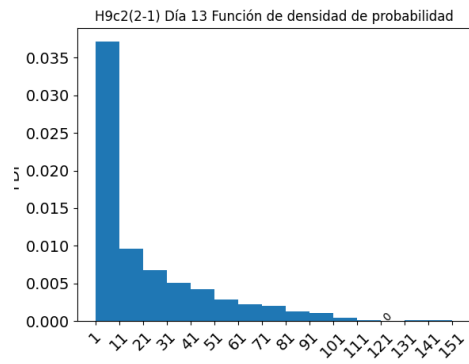
Teixeira E.D., Benchimol M., Crepaldi H.P., Souza W. 2012. Interactive Multimedia to Teach the Life Cycle of *Trypanosoma cruzi*, the Causative Agent of Chagas Disease. *PLOS Neglected Tropical Diseases*. Vol. 6(8): e1749. doi:10.1371/journal.pntd.0001749.

WHO. 2022. Chagas disease (also known as American trypanosomiasis). World Health Organization. Revisado el 07 de Agosto de 2022 en [https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/chagas-disease-\(american-trypanosomiasis\)](https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/chagas-disease-(american-trypanosomiasis)).

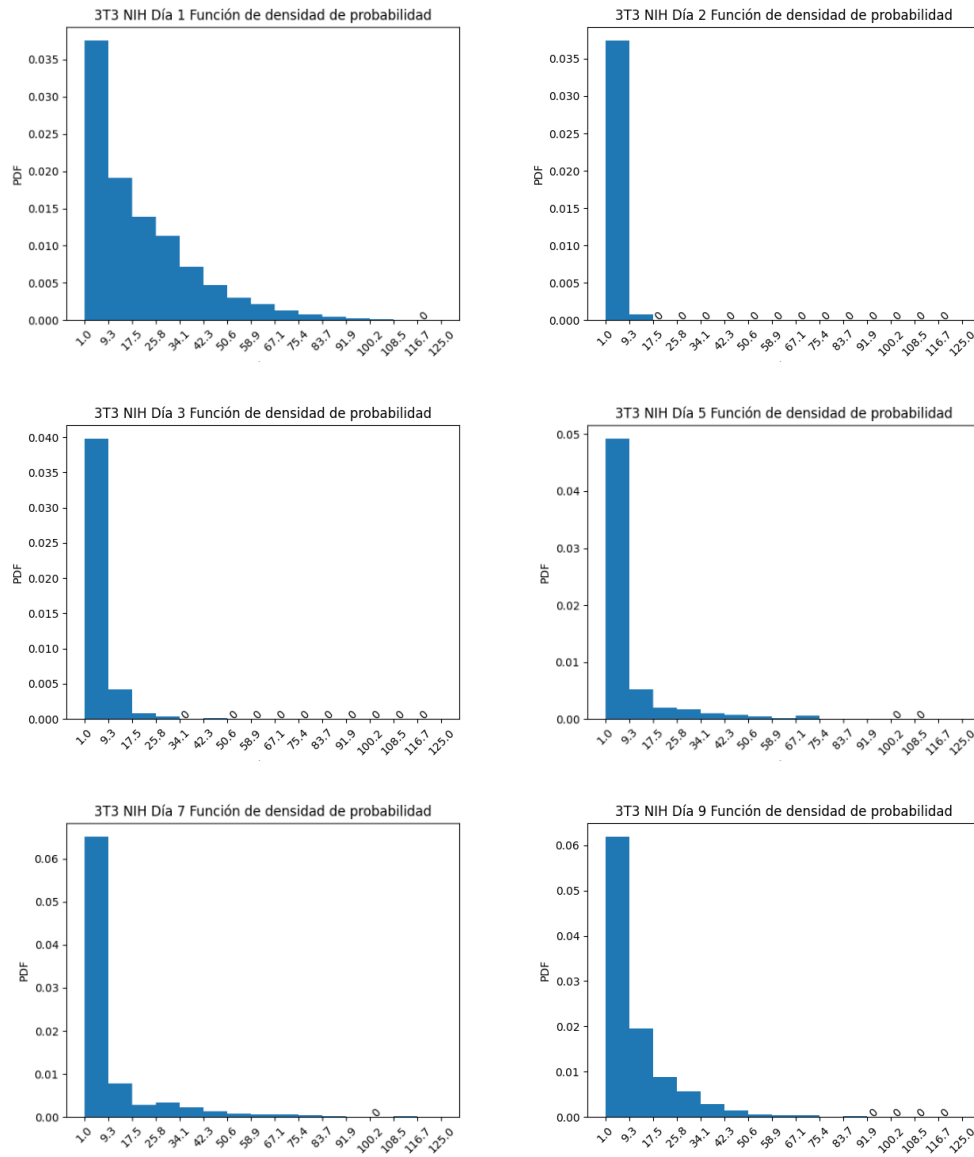
13. Anexo

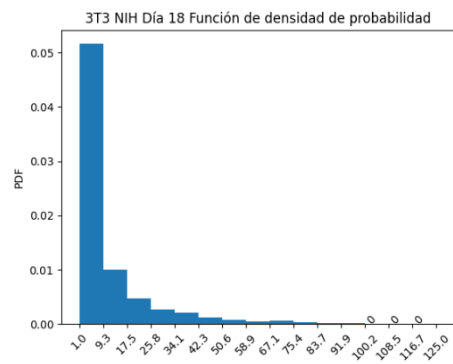
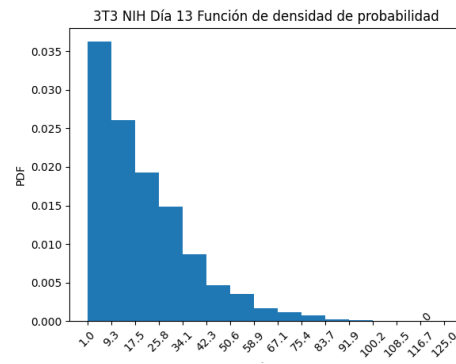
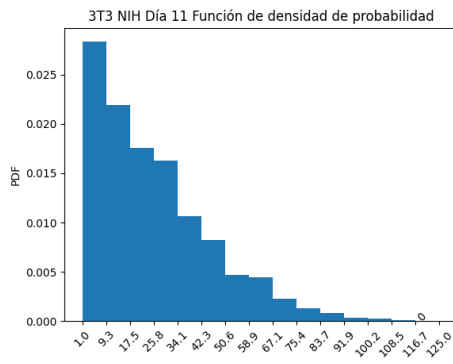
Gráficos de función de densidad de probabilidad de la distribución de parásitos por célula de la línea H9c2(2-1) en los días analizados obtenidos a partir de imágenes de fluorescencia (15 intervalos)



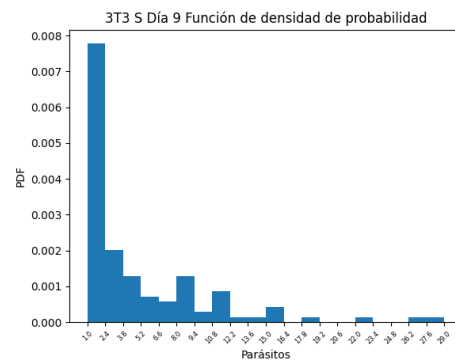
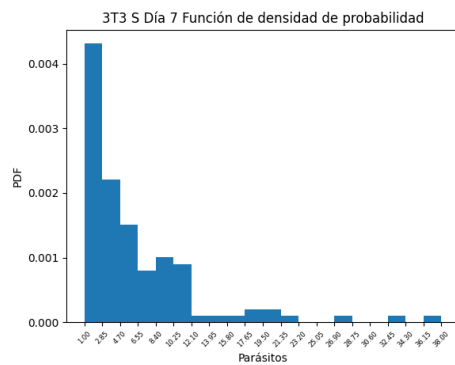
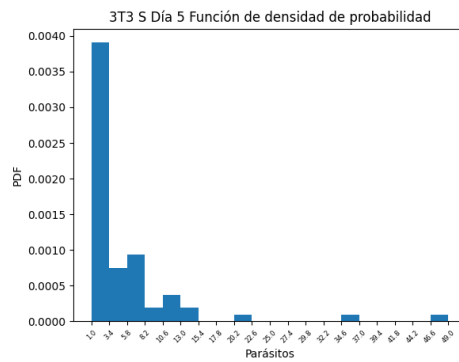
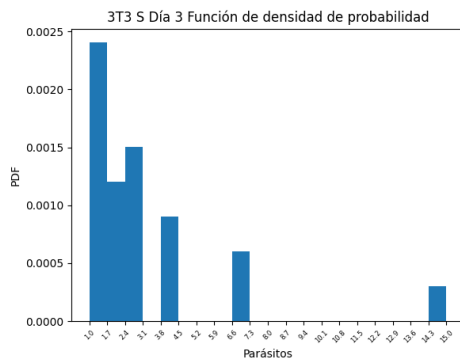
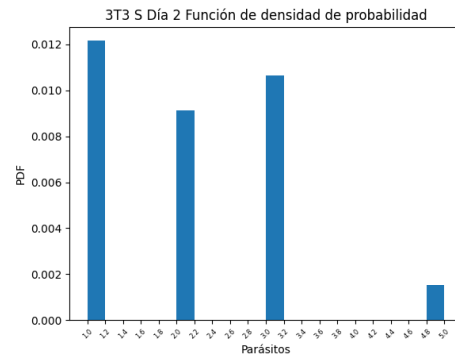
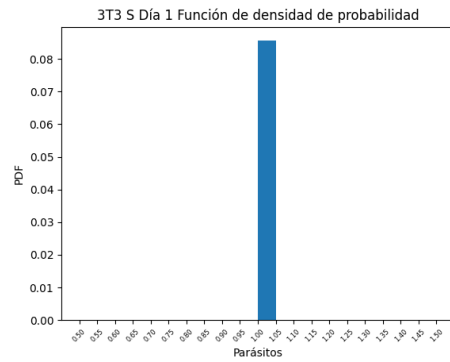


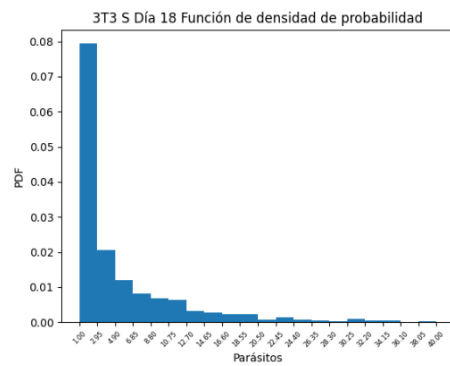
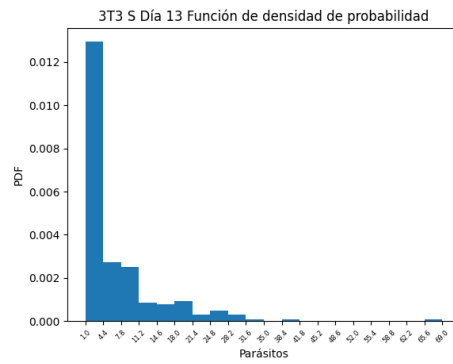
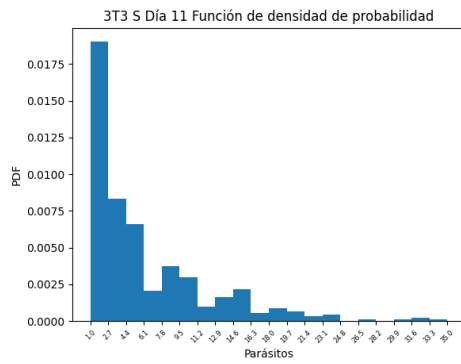
Gráficos de función de densidad de probabilidad de la distribución de parásitos por célula de la línea 3T3 NIH en los días analizados obtenidos a partir de imágenes de fluorescencia (15 intervalos)



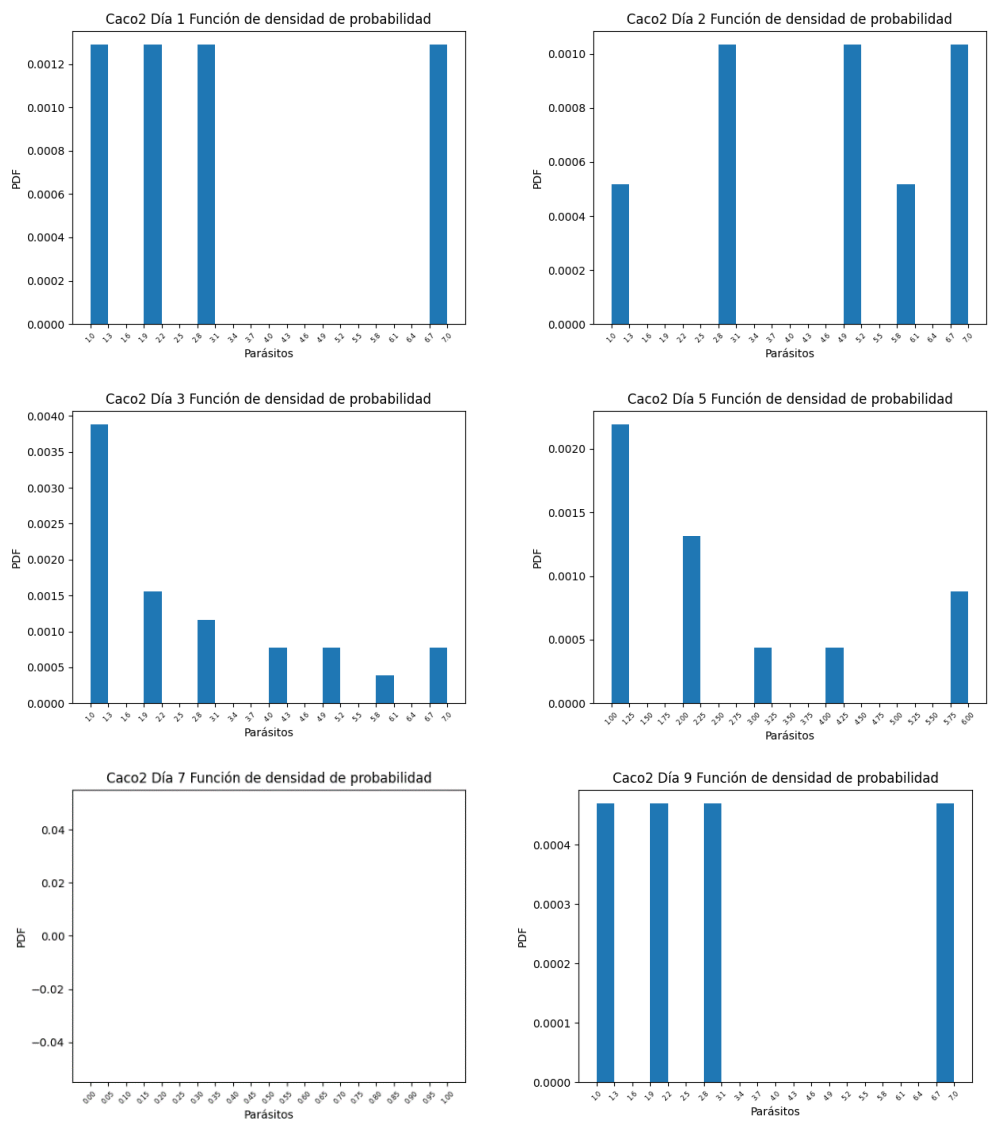


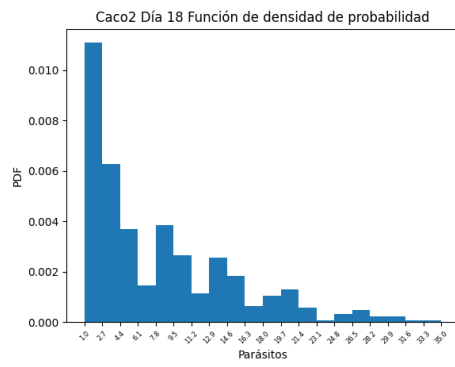
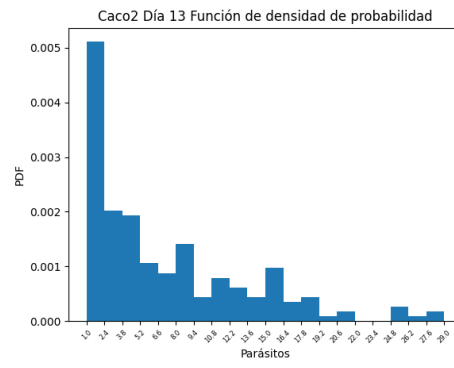
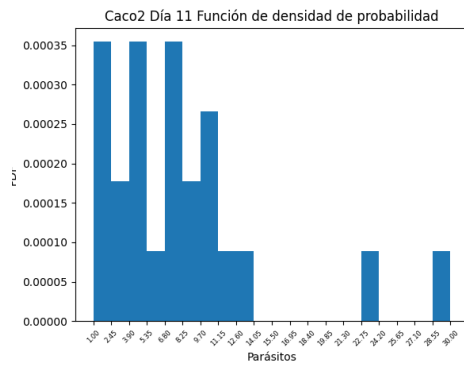
Gráficos de función de densidad de probabilidad de la distribución de parásitos
por célula de la línea 3T3 S en los días analizados obtenidos a partir de
imágenes de fluorescencia (20 intervalos)



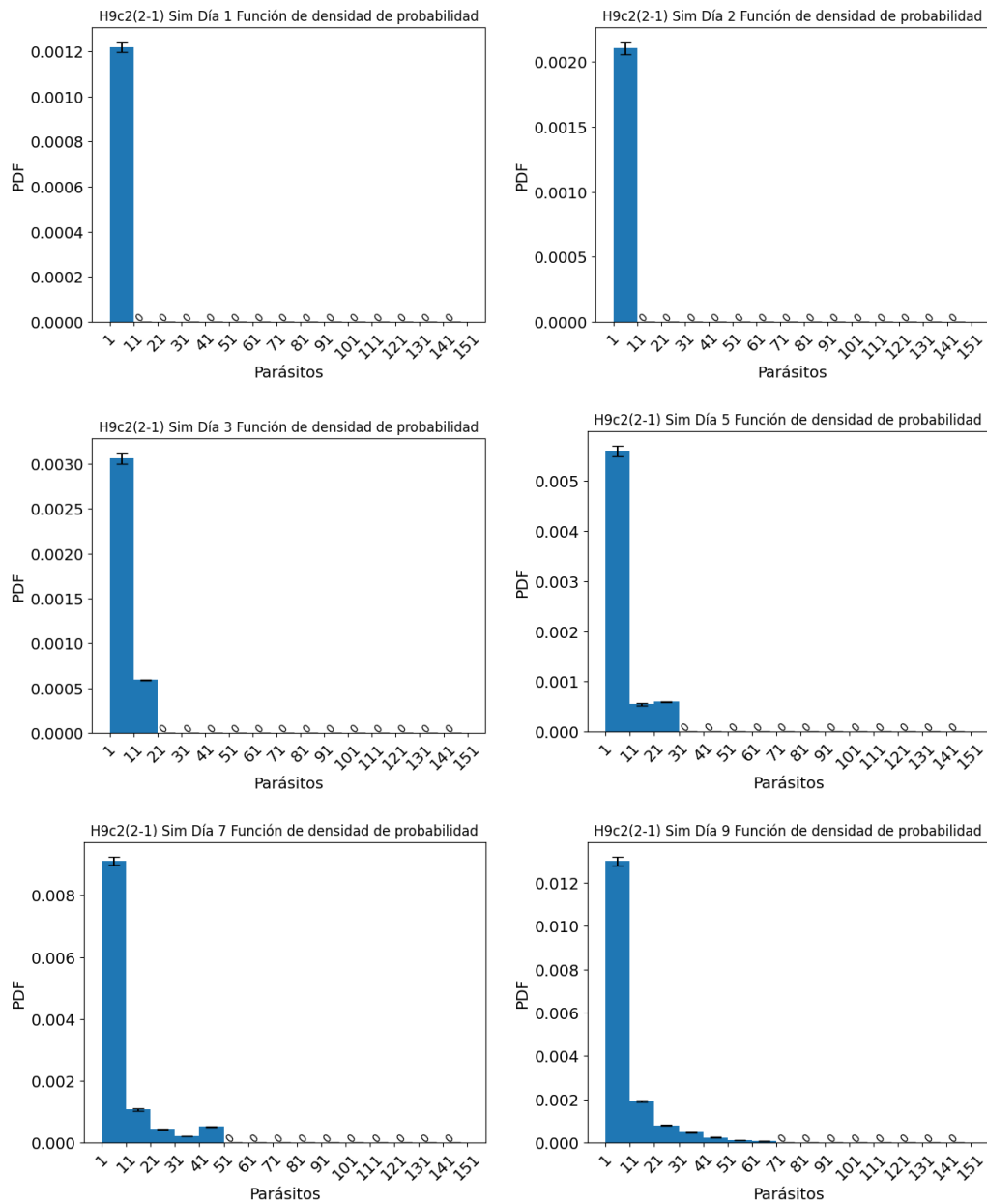


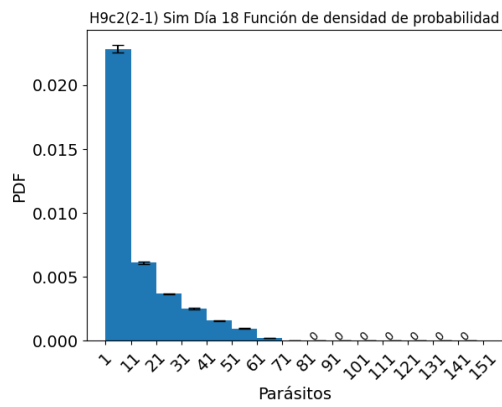
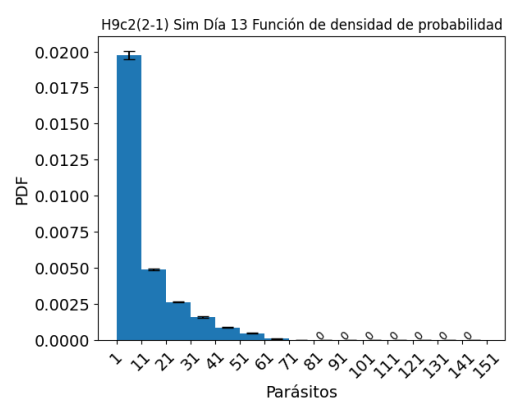
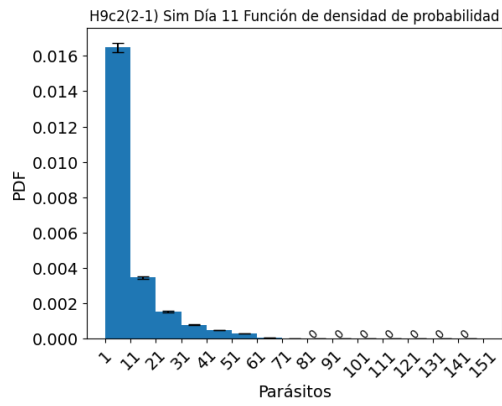
Gráficos de función de densidad de probabilidad de la distribución de parásitos
por célula de la línea Caco2 en los días analizados obtenidos a partir de
imágenes de fluorescencia (20 intervalos)





Gráficos de función de densidad de probabilidad de la distribución de parásitos por célula de la línea H9c2(2-1) en los días analizados obtenidos a partir de simulaciones (15 intervalos, $n = 100$)





Gráficos de función de densidad de probabilidad de la distribución de parásitos por célula de la línea 3T3 NIH en los días analizados obtenidos a partir de simulaciones (15 intervalos, $n = 100$)

