



**Centro de Investigación y de Estudios Avanzados
del Instituto Politécnico Nacional**

Unidad Monterrey

Programa de Ingeniería y Física Biomédicas

**Patrones de motilidad y dinámica de infección de
tripomastigotes de *Trypanosoma cruzi* en presencia
de diferentes líneas celulares de mamífero**

Tesis que presenta

Jorge Adrián Arias del Angel

para obtener el grado de

Doctor en Ciencias

con especialidad en

Ingeniería y Física Biomédicas

Director de Tesis:

Dr. Moisés Santillán Zerón

Codirectora de Tesis:

Dra. Rebeca Georgina Manning Cela

*A mi hermano Juan,
por ser la estrella más brillante que ilumina mi cielo.*

II

Agradecimientos

A CONACYT, por el financiamiento para mi proyecto, así como por la beca que me proporcionaron durante mi doctorado.

A Dios, por su inmensa sabiduría, compañía y apoyo a lo largo de toda mi vida. Por nunca dejarme solo y levantarme en cada tropiezo.

A mis asesores, el Dr. Moisés Santillán y a la Dra. Rebeca Manning por ayudarme a crecer tanto en lo personal como en lo profesional. Por contagiarme su pasión por la ciencia y hacerme partícipe de sus proyectos. Gracias por motivarme a seguir adelante en la investigación e impulsarme a llegar más allá de lo pensado.

A mis sinodales, los doctores Bruno Escalante, Jesús Santana y Roxana Gutiérrez por sus comentarios y apoyo en el desarrollo de este trabajo.

A mis compañeros de laboratorio: Óscar, Judith, Brenda, Abel y Armando por hacer de mi trabajo en el laboratorio toda una gran experiencia, por confiar en mi para apoyarles en sus proyectos y por los gratos momentos en el laboratorio, así como por todo el apoyo en cuestiones técnicas y de análisis para mi proyecto.

A mis amigos de la unidad Monterrey y fuera de ella: Elisa, Alberto, Lalo, Richie, Humberto, Alberto Cruz, Héctor, Ilse, Daniel, Tere y Virus, por incluirme en su grupo, por ser siempre críticos ante mi trabajo y motivarme a incursionar en el deporte.

A mi familia, mis padres y mis hermanos quienes a lo largo de mi vida han estado a mi lado dándome todo su apoyo incondicional sin importar el rumbo que he decidido tomar. Por todas las penas y alegrías que hemos compartido y las que nos esperan. Por ser modelo de vida a seguir y por todo lo que he aprendido de cada uno de ellos y que me han conducido a quien soy hoy.

Índice general

Resumen	1
1. Introducción	2
1.1. Estadios de <i>T. cruzi</i>	3
1.2. Ciclo de vida	4
1.3. Antecedentes	6
1.4. Justificación	8
1.5. Hipótesis	8
1.6. Objetivos	8
1.6.1. Objetivo General	8
1.6.2. Objetivos particulares	8
2. Metodología	10
2.1. Líneas celulares	10
2.1.1. Cultivo de células de mamífero	10
2.2. Parásitos	12
2.2.1. Cultivo de epimastigotes	12
2.2.2. Infección primaria y obtención de tripomastigotes derivados de células en cultivo (T.C.C.)	12
2.3. Ensayos de motilidad	13
2.3.1. Estrategia general	13

2.3.2.	Desarrollo del dispositivo	14
2.3.3.	Preparación de la muestra	16
	Grupo control	16
	Grupo experimental	17
2.3.4.	Toma de videos	17
2.3.5.	Cálculo de la confluencia celular	18
2.3.6.	Procesamiento de las imágenes y reconstrucción de las trayectorias .	18
2.3.7.	Análisis de las trayectorias	19
2.4.	Ensayos de infección celular	19
2.4.1.	Preparación de la muestra	21
	Fijación de las células	21
	Tinción con DAPI	22
2.4.2.	Toma de las imágenes	22
2.4.3.	Procesamiento de las imágenes	23
2.5.	Curvas de crecimiento celular	23
2.5.1.	Preparación de la muestra	23
2.5.2.	Toma y análisis de las imágenes	24
2.6.	Desarrollo del modelo	25
3.	Resultados	28
3.1.	Ensayos de motilidad	28
3.2.	Ensayos de infección	36
3.3.	Patrones de correlación	38
3.4.	Modelo matemático	40
3.4.1.	Curvas de crecimiento celular	40
3.4.2.	Cinéticas de infección y aplicación del modelo	41

<i>ÍNDICE GENERAL</i>	V
-----------------------	---

4. Discusión y conclusiones	48
------------------------------------	-----------

4.1. Perspectivas	52
-----------------------------	----

Bibliografía	53
---------------------	-----------

.1. Dinámica con retardo de las células infectadas	64
--	----

.2. Distribuciones <i>a priori</i> y <i>a posteriori</i>	66
--	----

Índice de figuras

1.1. Morfología de los diferentes estadios de <i>T. cruzi</i> : a) Epimastigote, b) Amastigote y c) Tripomastigote.	4
1.2. Ciclo de vida bifásico de <i>Trypanosoma cruzi</i>	5
2.1. Estrategia general para los ensayos de motilidad.	14
2.2. a) Vista lateral del dispositivo indicando las dimensiones de sus diferentes componentes. b) Vista superior, se pueden apreciar tanto la cámara de examinación, así como los dos canales conectados al exterior. c) Vista en perspectiva.	15
2.3. Metodología utilizada para el seguimiento de una cinética de infección. . .	21
2.4. Arreglo experimental para las curvas de crecimiento celular.	24

- 2.5. Representación esquemática del modelo matemático para el estudio de la infección de células de mamífero por tripomastigotes de *T. cruzi*. *S*, *I*, y *P* representan la población de células susceptibles, células infectadas y parásitos libres respectivamente. Las diferentes flechas denotan las interacciones entre los compartimentos. Las células susceptibles pueden autorreplicarse. Estas pueden ser infectadas al interactuar con células infectadas o con parásitos. Contrario al resto de las variables, las células infectadas tienen una estructura de edad, indicado por la forma del compartimento correspondiente. Estas células conllevan un periodo de incubación con una duración τ , después del cual las células se lisan y liberan una gran cantidad de nuevos parásitos en el medio. Las células infectadas también pueden autorreplicarse. 26

- 3.1. a) Cuadro representativo de un video. Los amastigotes y tripomastigotes pueden ser observados debido a la presencia de la proteína GFP. b) Reconstrucción de las trayectorias de los tripomastigotes. Como se puede apreciar, dichas trayectorias pueden ser bastante larga, pero también mostrarse confinadas. 29

- 3.2. Valores de rapidez promedio de los tripomastigotes interactuando con diferentes líneas células y en ausencia de ellas. El número de experimentos independientes para cada condición fue como se indica a continuación: grupo control, $n = 5$; 3T3 S, $n = [4 \text{ (CB)}, 3 \text{ (CM)}, 3 \text{ (CA)}]$; Caco2, $n = [3 \text{ (CB)}, 3 \text{ (CM)}, 3 \text{ (CA)}]$; 3T3 NIH, $n = [3 \text{ (CB)}, 3 \text{ (CM)}, 3 \text{ (CA)}]$; y H9c2(2-1), $n = [4 \text{ (CB)}, 3 \text{ (CM)}, 4 \text{ (CA)}]$. CB, CM, y CA corresponden respectivamente a confluencia baja, media y alta. Las líneas negras indican el intervalo de confianza al 95 %. Los asteriscos denotan diferencias con significancia estadística respecto al grupo control, esto basado en sus intervalos de confianza. 31

- 3.3. Valores de λ obtenidos a partir de una regresión lineal a las curvas de desplazamiento cuadrático medio hasta los 2 segundos de análisis. El número de experimentos independientes para cada condición fue como se indica a continuación: grupo control, $n = 5$; 3T3 S, $n = [4 \text{ (CB)}, 3 \text{ (CM)}, 3 \text{ (CA)}]$, Caco2 $n = [3 \text{ (CB)}, 3 \text{ (CM)}, 3 \text{ (CA)}]$; 3T3 NIH, $n = [3 \text{ (CB)}, 3 \text{ (CM)}, 3 \text{ (CA)}]$; and H9c2(2-1) $n = [4 \text{ (CB)}, 3 \text{ (CM)}, 4 \text{ (CA)}]$. CB, CM, and CA corresponden respectivamente a confluencia baja, media y alta. Las líneas negras indican el intervalo de confianza al 95 %. Los asteriscos denotan diferencias con significancia estadística respecto al grupo control, esto basado en sus intervalos de confianza. 33
- 3.4. Mapas de densidad de probabilidad espacial. Fila superior: mapas representativos del grupo control. La influencia de las células 3T3 S, Caco2, 3T3 NIH y H9c2 (2-1) en la distribución espacial de los tripomastigotes está ilustrada en los mapas de la segunda, tercera, cuarta y quinta fila respectivamente. Para los mapas del grupo experimental, la primera, segunda y tercera columna corresponden a los experimentos de confluencia baja (alrededor de 25 %), media (alrededor de 50 %), y alta (alrededor de 100 %). Las áreas negras corresponden a la superficie ocupada por las células en los experimentos de confluencia baja y media. 35
- 3.5. Valores de ρ para los experimentos del grupo experimental trabajando en confluencia baja y media. Las barras negras indican los intervalos de confianza al 95 %. 36

3.6. Imágenes representativas de infecciones con tripomastigotes de la cepa CL Brener en células 3T3 NIH: <i>izquierda</i> , después de 18 horas de iniciada la interacción; <i>en medio</i> , después de 7 días; y <i>derecha</i> , después de 13 días. El núcleo de las células de mamífero, así como el núcleo del parásito y su cinetoplasto están teñidos en azul, mientras que los parásitos se identifican por la presencia de la proteína GFP.	37
3.7. a) Eficiencia de invasión de tripomastigotes ante las diferentes líneas celulares estudiadas. Las barras negras corresponden al intervalo de confianza al 95 % obtenida de 3-4 experimentos independientes. b) Número de amastigotes por célula a 18 hpi. Las líneas negras gruesas corresponden al número promedio de amastigotes por célula. Las líneas negras delgadas indican el intervalo de confianza al 95 %.	38
3.8. Gráficas de dispersión en las cuales se contrasta la eficiencia de invasión de los tripomastigotes y sus características mótils. El código de colores es como sigue: gris (control), 3T3 S (verde), Caco2 (naranja), 3T3 NIH (azul) y H9c2(2-1) (rosa). Las barras de colores indican el intervalo de confianza al 95 % para ambos ejes.	39
3.9. Evolución temporal del número de células en cultivo para las diferentes líneas celulares. Los puntos representan los valores experimentales (promediados a partir de 3 experimentos independientes), mientras que las barras de error denotan la desviación estándar. Las líneas sólidas corresponden al mejor ajuste definido a partir de una función logística.	41

- 3.10. Cinéticas de infección para las diferentes líneas celulares. Los puntos representan los datos experimentales (promedio de 3 experimentos independientes), mientras que las barras de error denotan la desviación estándar. Las líneas sólidas corresponden a las curvas obtenidas tras resolver el modelo en 3 modalidades diferentes. El código de colores es como se indica a continuación: Modelo más simple (negro), modelo intermedio (rojo) y modelo completo (azul). El error cuadrático medio del ajuste (ECM) se muestra en la parte superior de cada imagen. 43
- 3.11. Red de los coeficientes de correlación entre los diferentes pares de los parámetros del modelo, calculada a partir de la estimación de los parámetros para las cuatro líneas celulares. Las líneas rojas y azules indican una correlación positiva o negativa respectivamente. El valor absoluto del coeficiente de correlación está representado por el grosor de cada línea. Del lado izquierdo se muestran todos los posibles coeficientes de correlación. Del lado derecho solo se muestran las líneas correspondientes a coeficientes de correlación mayores a 0.9 en valor absoluto. 47
1. Esquema representativo de la estructura por edad para las células infectadas. τ representa la edad a la cual las células infectadas son lisadas y liberan los parásitos incubados en su interior hacia el medio. Las líneas inclinadas son las características de la ecuación diferencial parcial que rige la dinámica del sistema e indican cómo la solución en cualquier punto (t, a) puede ser rastreada al eje $a = 0$ 65

Resumen

Patrones de motilidad y dinámica de infección de tripomastigotes de *Trypanosoma cruzi* en presencia de diferentes líneas celulares de mamífero

Diversos trabajos han demostrado que la motilidad en tripanosomátidos es relevante para dichos parásitos en procesos de replicación y sensibilidad. Sin embargo, aunque algunos hallazgos han sugerido de manera indirecta que la motilidad también juega un papel importante en la infección, esto no ha sido del todo estudiado. El presente trabajo se enfocó en responder esta cuestión para el parásito monoflagelado *Trypanosoma cruzi*. Los resultados indicaron que los tripomastigotes de la cepa CL Brener de *T. cruzi* tienden a cambiar sus patrones de movimiento cuando interactúan con células de mamífero, además de que la intensidad de dichos cambios está en función de la línea celular empleada. Posteriormente, se determinó la eficiencia con la que los tripomastigotes invadieron las células, demostrándose que dicha eficiencia varía de línea celular a línea celular, y que a su vez, correlaciona positivamente con la intensidad de los cambios en la motilidad del parásito. Con base en lo anterior, se sugiere que los tripomastigotes de *T. cruzi* son capaces de sentir la presencia de las células, lo que los lleva a cambiar sus patrones de movimiento resultando en un incremento en la eficiencia de invasión hacia su célula blanco.

Asimismo, se establecieron las cinéticas de infección sobre cada línea celular a lo largo de 18 días, permitiéndose con estos datos, desarrollar y alimentar un modelo matemático para simular los resultados. El análisis de los mecanismos en la interacción célula-parásito contemplados en el modelo, junto con sus parámetros, sugieren que un proceso relacionado con la tasa de replicación celular pudiese estar influyendo en gran medida en la invasión del parásito a la célula, repercutiendo así, en la dinámica de infección en general.

Abstract

Motility patterns and infection dynamics of *Trypanosoma cruzi* trypomastigotes in the presence of different mammalian cell lines

Several works have shown that motility in trypanosomatids is relevant for these parasites in processes of replication and sensitivity. However, although some findings have indirectly suggested that motility also plays an important role in infection, this has not been fully studied. The present work was focused on answering this question for the monoflagellated parasite *Trypanosoma cruzi*. The results indicate that trypomastigotes of the CL Brener strain of *T. cruzi* tend to change their movement patterns when they interact with mammalian cells, and that the intensity of these changes depends on the cell line used. Subsequently, the efficiency with which the trypomastigotes invade the cells was determined. With this, it was demonstrated that said efficiency varies from cell line to cell line, and that this characteristic correlates positively with the intensity of changes in the motility of the parasite. Based on the above, it is suggested that the trypomastigotes of *T. cruzi* are able to sense the presence of the cells, leading them to change their motility patterns resulting in increased invasion efficiency towards their target cell.

Likewise, infection kinetics were established on each cell line over 18 days, which allowing us with these data to develop and feed a mathematical model to simulate the results. The analysis of the mechanisms in the cell-parasite interaction that were included in this model, together with the parameters extracted from it, suggest that a process related to the rate of cell replication could be greatly influencing the invasion of the parasite into the cell, in addition to affecting the dynamics of infection in general.

Capítulo 1

Introducción

La enfermedad de Chagas, o tripanosomiasis americana, es una de las enfermedades tropicales más importantes en América Latina. Sin embargo, en los últimos años, esta enfermedad se ha convertido en un importante problema de salud a nivel mundial debido a la manera en que su agente etiológico, *Trypanosoma cruzi*, se ha distribuido en el mundo. Se estima que alrededor de 6 a 7 millones de personas están infectadas actualmente con este parásito [1].

T. cruzi es un protista monoflagelado perteneciente a la clase *kinetoplastea* y a la familia *Trypanosomatidae*. Dicha familia se caracteriza, además de poseer un solo flagelo, por tener una única mitocondria extendida a lo largo de todo el su cuerpo. Dentro de su mitocondria, se encuentra una estructura conocida como *cinetoplasto*, la cual contiene el genoma del parásito [2].

T. cruzi se transmite principalmente a través de las heces de insectos hematófagos conocidos como *Triatominos*, los cuales pertenecen a la familia *Reduviidae*, siendo los géneros *Rhodnius*, *Triatoma* y *Panstrongylus* los que presentan una mayor relevación epidemiológica. Este parásito presenta un ciclo de vida bifásico, alternando entre 4 estadios de desarrollo, de los cuales, dos se encuentran en el insecto vector (epimastigote y

tripomastigote metacíclico) y dos en el hospedero mamífero (amastigote y tripomastigote sanguíneo).

1.1. Estadios de *T. cruzi*

Los diferentes estadios del parásito, es decir, las diferentes formas en las que se puede mostrar el parásito dependiendo de las condiciones del microambiente a las que se encuentre expuesto, muestran variaciones en su morfología, así como en la posición relativa del cinetoplasto respecto a su núcleo (ver Fig 1.1). Estas diferencias permiten su rápida identificación de manera visual:

- **Epimastigote:** Es la forma reproductiva dentro del insecto vector. Puede medir entre 20 - 25 μm de largo y 2 μm de ancho, su cinetoplasto se sitúa antes del núcleo. Cerca de esta región se origina el flagelo del parásito, de modo que gran parte de éste se encuentra libre, proveyendo así de una alta motilidad a este estadio.
- **Amastigote:** Es la forma intracelular y reproductiva dentro del hospedero mamífero. Presenta una forma esférica llamada *leishmanoide*, la cual puede llegar a medir entre 2 - 4 μm de diámetro, cuenta con una porción de flagelo libre muy corta. Se caracteriza por presentar un gran núcleo y cinetoplasto, los cuales se sitúan a la mitad de su cuerpo.
- **Tripomastigote:** En este estadio, *T. cruzi* puede alcanzar entre los 12 - 30 μm de largo y 2 μm de ancho, incluyendo su flagelo. Dicho flagelo inicia en la parte posterior del parásito detrás de su núcleo y se extiende a lo largo de todo el cuerpo del parásito emergiendo en la parte anterior del mismo. Se considera una forma altamente infectiva presente el hospedero mamífero (*tripomastigote sanguíneo*) y en el insecto vector (*tripomastigote metacíclico*).

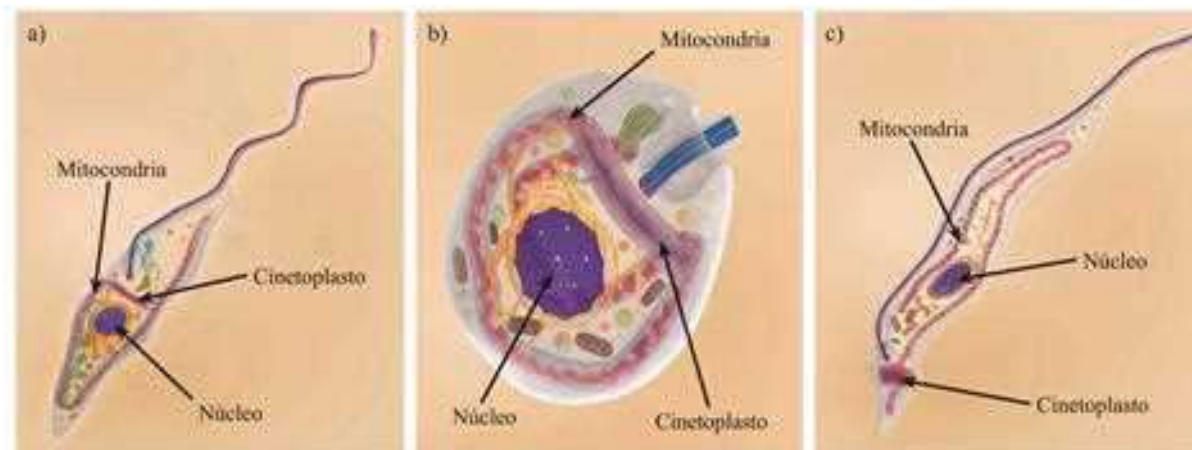


Figura 1.1. Morfología de los diferentes estadios de *T. cruzi*: a) Epimastigote, b) Amastigote y c) Tripomastigote.

1.2. Ciclo de vida

Durante su ciclo de vida bifásico, *T. cruzi* alterna su residencia entre un hospedero vertebrado y un hospedero invertebrado, también conocido como triatomino (Fig 1.2). Podríamos iniciar con el momento en que un triatomino se infecta al alimentarse de la sangre infectada por *T. cruzi* de un hospedero mamífero. Esta muestra de sangre puede contener al parásito en su estadio de **tripomastigote sanguíneo**, los cuales, tras ser ingeridos, se desplazan a la zona media y posterior del intestino del triatomino para diferenciarse a su estadio de **epimastigote**. Posteriormente, este estadio prolifera mediante fisiones binarias antes de migrar a lo largo de la zona posterior del intestino y recto para finalmente diferenciarse de nuevo, ahora a su estadio de **tripomastigote metacíclico**. Dicho estadio permanecerá en el lumen intestinal hasta que el triatomino, ahora infectado, tome su próxima ingesta de sangre.

Después de dicha alimentación, los parásitos son liberados junto con las heces del triatomino, estos parásitos pueden entrar al torrente sanguíneo del hospedero mamífero a

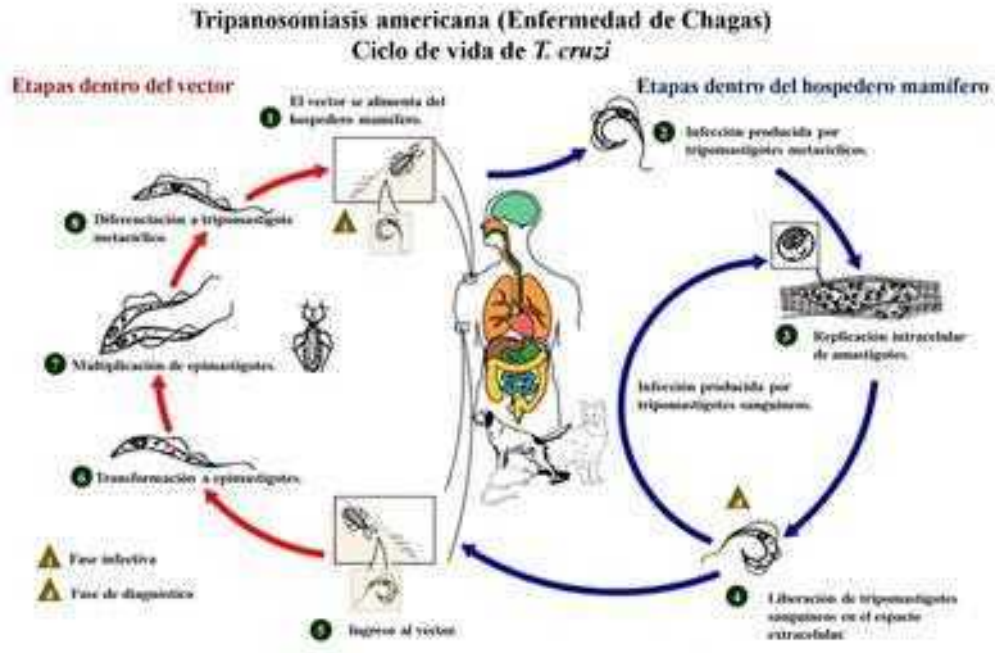


Figura 1.2. Ciclo de vida bifásico de *Tripanosoma cruzi*

través de alguna herida o bien a través de la mucosa. Una vez dentro del organismo, estos parásitos pueden llegar a infectar todo tipo de células nucleadas, ya sean células fagocíticas o no fagocíticas [3]. El parásito penetra la célula haciendo uso de diversos mecanismos, los cuales le dan acceso a la célula a través de la formación de una vesícula parasitófora. En el sitio de entrada se hace un reclutamiento de lisosomas intracelulares, los cuales fusionan su membrana con la vesícula parasitófora modificando así el pH interno de la misma. Esto detona la diferenciación del parásito a su estadio **amastigote**, iniciando su replicación en el interior de la vesícula parasitófora y concluyéndola en el citoplasma. Finalmente, *T. cruzi* pasa por una última fase de diferenciación a su forma de **tripomastigote sanguíneo**. Estos tripomastigotes pueden, o bien, infectar nuevas células vecinas y movilizarse al torrente sanguíneo para propagar la infección a diferentes órganos y tejidos, o bien, ser ingeridos por un nuevo triatomino completando así el ciclo de vida del parásito.

1.3. Antecedentes

Las diferentes cepas de *T. cruzi* presentan una alta variabilidad genética, lo cual permite clasificarlas en seis diferentes categorías denominadas como *Unidades discretas de tipificación* (o DTU por sus siglas en inglés - *Discrete Typing Units*). Esta heterogeneidad correlaciona con diferencias morfológicas de sus formas sanguíneas, virulencia, habilidad de generar heridas, susceptibilidad a agentes terapéuticos, constitución antigénica e infectiva, así como su distribución geográfica [4]. Por lo tanto, esta heterogeneidad es considerada como uno de los posibles factores que podrían estar implicados en las diferencias clínicas manifestadas en la enfermedad de Chagas [4–8]. Sin embargo, no todos los estudios están de acuerdo con esta hipótesis. [9].

Los tripomastigotes y epimastigotes de *T. cruzi* son propulsados por su único flagelo gracias a oscilaciones mecanoquímicas, las cuales generan fuerzas mótils. Además de servir para la motilidad, el flagelo de diversos microorganismos cumple con otras funciones, tales como: sensibilidad, división celular, morfogénesis, migración del cuerpo basal, citocinesis, señalización, interacción hospedero-microorganismo, e infección [10–13]. En kinetoplastidos, la motilidad flagelar participa en la diseminación y anidación dentro del hospedero mamífero, en la colonización del insecto vector, en diversos pasos del proceso de infección, así como en la eliminación de anticuerpos de la superficie del parásito [14–18]. En *T. cruzi*, el flagelo truncado del amastigote sirve para establecer un contacto cercano con la mitocondria del hospedero, dicha interacción se ha sugerido como una pieza importante en la infección intracelular y la patogénesis del parásito [19]. Estudios recientes han mostrado que diversos factores que pueden modificar la motilidad de los tripomastigotes de *T. cruzi* también inhiben en cierto grado su infección [20, 21]. Pese a todos estos antecedentes, existe muy poca literatura científica enfocada en el estudio de la motilidad de *T. cruzi* [22], y en particular en la participación de su flagelo en el proceso de infección

En ensayos de infección establecidos en ratones utilizando diferentes cepas de *T.*

cruzi, todas estas mostraron tropismo por tejidos en específico, aunque con diferente intensidad [23]. Por ejemplo, pese a que todas las cepas estudiadas fueron miotrópicas, éstas mostraron diferencias en los tejidos musculares que preferían invadir. Una posible explicación a esto es que el parásito *T. cruzi* invade algunas células más eficientemente que otras.

Además, se ha demostrado que a pesar de que todos los estadios de *T. cruzi* son capaces de establecer una infección bajo condiciones *in vitro*, los tripomastigotes y amastigotes presentan una mejor eficiencia en el establecimiento de la infección que los epimastigotes [24]. Sin embargo, en condiciones *in vivo*, se ha demostrado que solo los tripomastigotes y amastigotes son capaces de establecer la infección; iniciando con la infección a macrófagos, células de músculo liso y estriado, así como en fibroblastos. Durante esta primera interacción célula-parásito, estos estadios de *T. cruzi* pueden emplear diferentes mecanismos para ingresar a las células [3, 25]. También se ha propuesto que la interacción entre células no infectadas y células infectadas pudiese conllevar a la infección de las primeras. Esta especulación tiene como hipótesis el movimiento de un parásito de una célula infectada hacia una célula no infectada a través de sus membranas. Sin embargo, este proceso no ha sido demostrado aún.

Previamente, en mi trabajo de maestría [26], se realizó un análisis comparativo de los patrones de motilidad de tripomastigotes derivados de células en cultivo de *T. cruzi*. Dicho análisis de motilidad se realizó en ausencia y presencia de fibroblastos 3T3 NIH y HFF-1. Los resultados de dicho trabajo mostraron que la presencia de estas células, así como la confluencia celular bajo la cual se trabajaron, afectaban los patrones de motilidad de los tripomastigotes.

1.4. Justificación

Aún cuando el movimiento de *T. cruzi* tiene un papel en las diferentes etapas de su proceso de infección y en su ciclo de vida, es poco lo que se conoce de dicho comportamiento, en particular en su estadio de tripomastigote, que es la forma infectiva importante para el desarrollo de la infección en el humano. Más aún, se desconoce cómo es dicho comportamiento en presencia de células de mamífero y cómo esto repercute en el desarrollo de la infección.

1.5. Hipótesis

Los patrones de movimiento de los tripomastigotes derivados de células en cultivo se ven modificados en presencia de células de mamífero y esto está correlacionado con la eficiencia de invasión del parásito.

1.6. Objetivos

1.6.1. Objetivo General

Estudiar los patrones de movimiento de los tripomastigotes derivados de células en cultivo en diversas condiciones para investigar como estos son modificados por la presencia de las células de mamífero, así como determinar si esto se correlaciona con la eficiencia de invasión del parásito.

1.6.2. Objetivos particulares

- Estudiar cómo cambian los patrones de movimiento de los tripomastigotes de *T. cruzi* (cepa CL Brener) en presencia de diferentes líneas celulares.
- Identificar si la confluencia celular afecta la motilidad de los tripomastigotes.

- Establecer las cinéticas de infección para cada línea celular.
- Determinar si existen diferencias en la eficiencia de invasión de los tripomastigotes ante diferentes líneas celulares.
- Buscar si existen correlaciones entre los parámetros de motilidad y el parámetro de eficiencia de invasión del parásito.
- Investigar los factores a nivel celular que pueden fomentar el establecimiento y posterior desarrollo de la infección.

Capítulo 2

Metodología

2.1. Líneas celulares

T. cruzi es un parásito con la capacidad de infectar cualquier tipo de célula nucleada. No obstante, macrófagos y fibroblastos son algunos de los primeros blancos de infección de este parásito. Es por ello que para este trabajo se emplearon dos líneas celulares de fibroblastos como lo son: 3T3 NIH, fibroblastos de embrión de ratón (ATCC $\text{\textcircled{R}}$ CRL-1658TM) y 3T3 Swiss-Albino (3T3-S), fibroblastos de embrión de ratón albino (ATCC $\text{\textcircled{R}}$ CCL-92TM). Además, la patología desarrollada por *T. cruzi* repercute mayormente a nivel de corazón y vísceras, de allí que se agregaron al estudio las líneas celulares H9c2(2-1), mioblastos de rata [27] (ATCC $\text{\textcircled{R}}$ CRL-1446TM) y Caco2, epitelio de colón humano [28] (ATCC $\text{\textcircled{R}}$ HTB-37TM).

2.1.1. Cultivo de células de mamífero

Las diferentes líneas celulares mencionadas en la sección 2.1 se mantuvieron en stock en cajas Petri (TC treated) de 60 mm con medio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium), complementado con 10 % de Suero Fetal Bovino (FBS). Se mantuvieron en incubación a 37°C y 5 % de CO₂, realizando su resiembra cada 4 días o bien cuando la

confluencia celular alcanzaba el 80 %. La línea celular H9c2(2-1) se trabajó en pasajes no superiores a 15, debido a que cultivos más viejos llegan a presentar efectos de citotoxicidad, alterando así las propiedades de este cultivo [29]. La resiembra de los stocks se realizó mediante el siguiente protocolo:

- Dejar atemperar el medio DMEM+10 %SFB, así como las soluciones a utilizar (PBS-EDTA y Tripsina-EDTA) antes de iniciar. Lo anterior se hace para evitar el choque térmico, ya que el medio y las soluciones se mantienen a 4°C, mientras que las células a 37°C.
- Eliminar el medio de cultivo viejo contenido en cada caja Petri.
- Agregar 2 ml de PBS-EDTA y agitar ligeramente la caja para distribuir todo el volumen. Con esto son eliminados los iones Ca^{+2} y Mg^{+2} necesarios para mantener las uniones celulares.
- Añadir 1 ml de Tripsina-EDTA y agitar ligeramente la caja para distribuir todo el volumen. Esta solución se utiliza para romper las uniones celulares a superficie. Se deja en incubación el tiempo necesario para despegar las células pero no demasiado, evitando así el daño celular.
- Revisar que las células se encuentren separadas de la superficie y redondas. Golpear ligeramente la caja de ser necesario para despegarlas por completo, evitando salpicar las paredes y la tapa.
- Subir y bajar el volumen de tripsina con una micropipeta para separar completamente las células y así homogenizar el medio.
- Conservar 1/5 de tripsina y disponer del resto según las necesidades.
- Añadir 3.5 ml de medio DMEM fresco + 10 % de FBS y mantener en incubación.

2.2. Parásitos

Para este trabajo se emplearon epimastigotes de *T. cruzi*, cepa CL Brener (TcVI) [30], los cuales fueron transfectados de manera ectópica empleando el vector pTrex-n-GFP [24]. Además, se emplearon tripomastigotes derivados de células en cultivo, cuya obtención se explica más adelante.

2.2.1. Cultivo de epimastigotes

Los epimastigotes se cultivaron en medio LIT (Liver Infusion Tryptose) complementado con 10 % de suero fetal bovino (FBS), 0.5 % de penicilina (10,000 IU)/estreptomicina (10.000 µg) y 1 % hemina (5 mg/ml), manteniendo una temperatura de 28°C. El stock de parásitos se resembró cada 7 días usando un factor de dilución 1/10.

2.2.2. Infección primaria y obtención de tripomastigotes derivados de células en cultivo (T.C.C.)

Para establecer una infección primaria, a partir de la cual se pudiesen obtener los tripomastigotes derivados de células en cultivo, se emplearon monocapas de células 3T3 NIH con una confluencia alrededor del 50 % en frascos de cultivo de 25cm². La infección de estas células se realizó agregando epimastigotes al cultivo siguiendo el protocolo reportado previamente por Manning y colaboradores [31], con algunas modificaciones:

- Tomar 1 ml del stock de epimastigotes cultivados durante 4- 5 días (fase logarítmica de su crecimiento).
- Centrifugar el volumen de epimastigotes a 3,000 rpm/10 minutos.
- Retirar el sobrenadante con vacío o por decantación, teniendo cuidado de no perder la pastilla.

- Golpear el tubo contra la superficie de la campana para disgregar la pastilla y resuspender los parásitos en 10 ml de DMEM sin complementar.
- Centrifugar a 3,000 rpm/10 minutos.
- Retirar el medio por decantación y resuspender los epimastigotes en medio DMEM alta glucosa complementado con 2 % de SFB.
- Determinar el número de parásitos/ml.
- Tomar un volumen tal que contenga 1×10^6 epimastigotes y llevar a 3 ml con DMEM alta glucosa complementado con 2 % de SFB (esto para infecciones trabajadas en frascos de cultivo de 25 cm²).
- Incubar a 37°C y 5 % de CO₂ durante 48 horas.
- Retirar el medio con los parásitos y agregar medio DMEM fresco complementado con 2 % de SFB.
- Repetir el paso anterior diariamente hasta eliminar todos los parásitos libres en el sobrenadante.
- Una vez eliminados los parásitos del sobrenadante el cambio de medio se realiza cada tercer día.
- Los amastigotes y tripomastigotes, producto de la infección, serán liberados al sobrenadante en los siguientes 5 - 7 días.

2.3. Ensayos de motilidad

2.3.1. Estrategia general

Para el estudio de los patrones de movimiento de los T.C.C. se desarrolló un dispositivo de PDMS, el cual se explica en detalle más adelante. Dichos patrones de movimiento se

analizaron en dos grupos diferentes (ver Fig. 2.1). En el **grupo control**, se estudió el comportamiento de los T.C.C. en ausencia de cualquier tipo de línea celular. Por su parte, en el **grupo experimental**, se permitió a los T.C.C. interactuar con las diferentes líneas celulares mencionadas en la sección 2.1. Estos cultivos celulares se trabajaron en tres rangos de confluencia: confluencia baja (alrededor del 25 %), confluencia media (alrededor del 50 %) y confluencia alta (alrededor del 100 %)

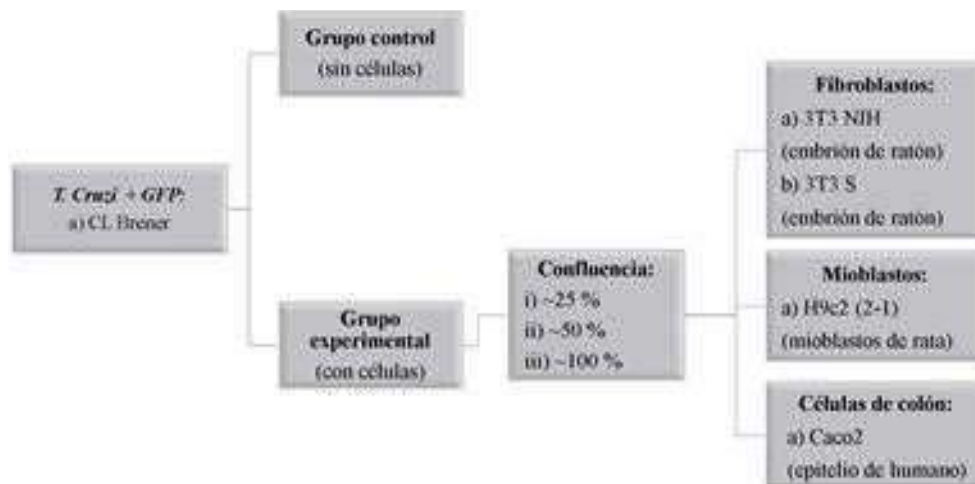


Figura 2.1. Estrategia general para los ensayos de motilidad.

La razón de seleccionar los tripomastigotes como el estadio de interés es que estos son uno de los estadios móviles del parásito, además de ser el responsable de establecer una infección de manera natural. Aún más, pese a que todos los estadios de este parásito son capaces de establecer una infección *in vitro*, los tripomastigotes y amastigotes son más infectivos que los epimastigotes [24], mientras que los amastigotes no son móviles.

2.3.2. Desarrollo del dispositivo

Para el diseño del dispositivo se elaboró primeramente una base de acrílico con dimensiones de 25x75x3 mm. Posteriormente se fabricaron postes cilíndricos de acrílico con un diámetro de 1 cm y una altura de 2 mm. Finalmente, tres de estos postes fueron

fijados mediante cloroformo a la base de acrílico, dando por terminado el molde para la fabricación de los dispositivos.

Para la fabricación de las cámaras se utilizó Polidimetil siloxano (PDMS), al igual que su catalizador en una proporción de 10:1. Esta mezcla fue depositada sobre el molde de acrílico, el cual se introdujo a una cámara de vacío bajo una presión de -25 inHg alrededor de 20 minutos para retirar las burbujas presentes en el PDMS. Por último, el PDMS se polimerizó a 80°C durante 3 horas. Las cámaras fueron cortadas de manera individual y se realizaron dos perforaciones en lados opuestos de la cámara (ver Fig. 2.2a), las cuales funcionaron como canales de entrada y salida para las muestras.

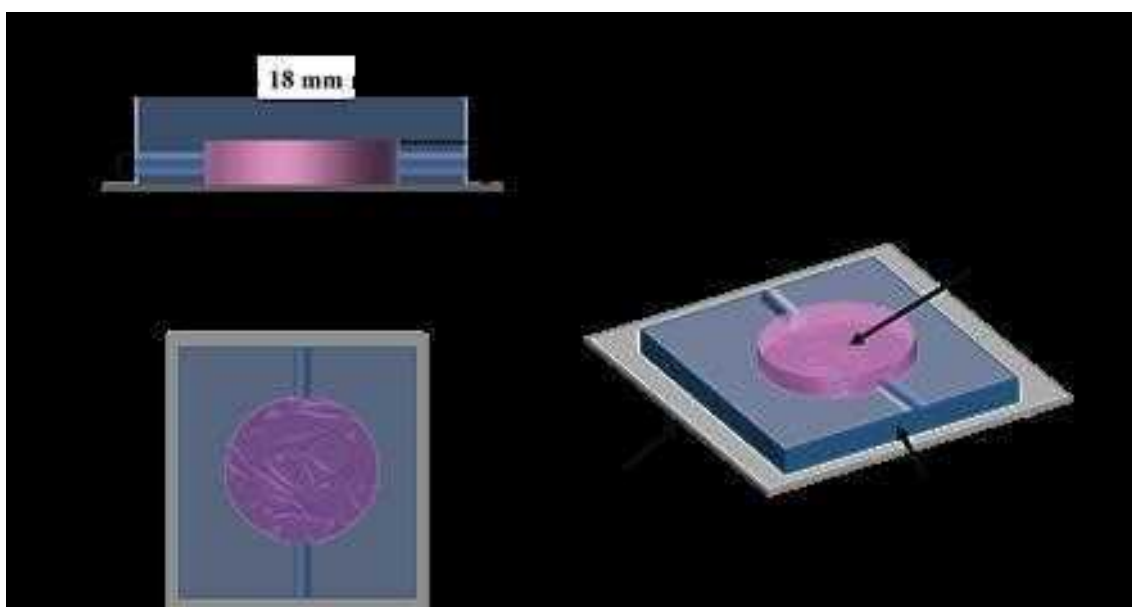


Figura 2.2. a) Vista lateral del dispositivo indicando las dimensiones de sus diferentes componentes. b) Vista superior, se pueden apreciar tanto la cámara de examinación, así como los dos canales conectados al exterior. c) Vista en perspectiva.

En seguida, las cámaras se lavaron dos veces en un sonicador con agua MiliQ durante 30 minutos. Posteriormente, se empleó alcohol isopropílico para lavarlas durante 15 minutos y por último, se realizaron dos lavados con agua MiliQ durante 15 minutos cada uno de ellos.

Una vez que los dispositivos estuvieron limpios, estos fueron enjuagados en una solución de PVP40 0.04 % con el fin evitar la adhesión de nutrientes del medio al PDMS [32]. Finalmente, las cámaras fueron secadas con nitrógeno de alta pureza y se mantuvieron en un lugar seco y sin polvo durante al menos 24 horas.

Para terminar los dispositivos, se empleó un sellador de plasma para fijar las cámaras a cubreobjetos previamente lavados con metanol (ver Fig 2.2 b)). Estos dispositivos fueron envueltos en aluminio y esterilizados en autoclave durante 1 hora.

2.3.3. Preparación de la muestra

Grupo control

Se colectaron los T.C.C. del sobrenadante de una infección primaria (ver Sección 2.2.2) para su posterior centrifugación a 1.048xg durante 10 minutos. Tras retirar el medio y disgregar la pastilla, los parásitos fueron resuspendidos en 1 ml de DMEM + 2 % FBS y contados en una cámara Neubauer. Posteriormente, se tomaron 4.5×10^4 tripomastigotes y se resuspendieron en medio DMEM + 2 % FBS y se agregaron partículas de poliestireno de 0.5 μm en una proporción de 6 partículas por parásito (Fluoro-Max TMgreen fluorescent polymer microspheres, Cat.no. G0100). Tanto los parásitos como las partículas se llevaron a un volumen final de 160 μl de DMEM + 2 % de FBS. Las partículas de poliestireno fueron utilizadas para monitorear la presencia de flujos dentro de la cámara de examinación, y por tanto, también como criterio de exclusión en caso de existir dichos flujos.

Tras la preparación de la muestra, se conectó una manguera Tygon® de 1.5 mm de diámetro al canal de salida del dispositivo y se introdujo la solución de parásitos y partículas a través del canal de entrada utilizando una micropipeta. Tras inyectar la muestra en su totalidad, otra manguera fue conectada al canal de entrada y tanto esta manguera, como la que se encontraba conectada al canal de salida, fueron selladas por calor y ejerciendo presión en sus extremos. Al terminar de cargar la muestra, se realizaba una presión en

la parte superior de la cámara de examinación, de modo que, aquellos dispositivos que presentaron fugas fueron eliminados del estudio. Por último, las muestras se mantuvieron en incubación a 37°C y 5 % CO₂ durante 1 hora. Para este grupo se trabajó con 5 diferentes dispositivos, es decir, cinco experimentos independientes.

Grupo experimental

Para este grupo se trabajó con hasta 15 dispositivos diferentes por línea celular (máximo de 5 dispositivos por confluencia celular). Dentro de cada uno de estos 5 dispositivos por confluencia, se introdujeron los mismos inóculos en las cámaras de examinación, esto para conseguir el mismo porcentaje de confluencia celular en cada uno de ellos. Las células se incubaron en medio DMEM alta glucosa complementado con 10 % de SFB, a una temperatura de 37°C y una atmosfera de 5 % CO₂ durante toda la noche o hasta alcanzar la confluencia celular deseada.

Finalmente, la muestra de parásitos y partículas fue preparada e introducida en los dispositivos del mismo modo que se indicó para el grupo control.

2.3.4. Toma de videos

Para registrar el comportamiento mótil de los tripomastigotes se procedió a la toma de videos con un microscopio invertido Nikon ECLIPSE T320000-U con un objetivo de contraste de fase y una magnificación de 40X. De cada dispositivo se tomaron tres videos con una duración de 2.5 minutos cada uno, manteniendo una temperatura entre los 36°C - 38°C con ayuda de una secadora.

Durante cada experimento, la muestra dentro de la cámara de examinación se irradió con una lámpara UV. El plano focal se mantuvo entre 3 - 5 µm por encima de las células, enfocando siempre aquellos campos en la región central de la cámara, evitando en todo momento trabajar en los bordes de la misma para evitar las interacciones hidrodinámicas

[33]. Los videos fueron tomados a 50 cuadros por segundo (*frames per second* - fps) a través de una cámara CCD.

2.3.5. Cálculo de la confluencia celular

Para el caso particular de los experimentos en el grupo experimental, además de la toma de videos, también se realizó una captura en campo claro del área de estudio, el plano focal se situó sobre las células a modo de tener una imagen clara de ellas. A partir de estas imágenes se crearon máscaras binarias con ayuda de **Power Point**. De este modo, las áreas en blanco, indicaban la posición de las células; mientras que las áreas en negro, las regiones vacías en el campo de estudio. Con esto en cuenta, la confluencia celular se determinó como el cociente entre el número de píxeles en blanco y el tamaño de la imagen.

2.3.6. Procesamiento de las imágenes y reconstrucción de las trayectorias

Para el análisis de los videos se empleó un software personalizado desarrollado en **MATLAB**. Los parásitos, tanto tripomastigotes como amastigotes, pudieron ser fácilmente identificados gracias a la presencia de la proteína GFP. De este modo, para obtener las trayectorias de los parásitos y las partículas, cada cuadro I del video fue transformado en una imagen binaria. Así, para cada cuadro I , se obtuvieron dos imágenes nuevas: una imagen que solo incluía a los parásitos (I_P) y otra que solo mostraba las partículas (I_{PT}). Todas aquellas áreas, que no correspondiesen a parásitos en la imagen I_P o a partículas en la imagen I_{PT} , fueron eliminadas empleando la función **bwareaopen**. Posteriormente, los centroides de los parásitos ($CentrosP$) y de las partículas ($CentrosPT$) fueron identificados mediante la función *regionprops* aplicada a las imágenes I_P e I_{PT} respectivamente.

Finalmente, la reconstrucción de las trayectorias para los parásitos (R_P) y de las partículas (R_{PT}) se realizó mediante la aplicación de la función **track**. Esta función vincula

dos puntos a una misma trayectoria utilizando el criterio de mínima distancia entre ellos. Utiliza además, un set de parámetros para optimizar este proceso. Dichos parámetros son los siguientes:

- ***maxdisp***: Este valor considera la distancia máxima que puede haber entre dos puntos a modo de ser asignados a una misma trayectoria.
- ***mem***: Corresponde al número de cuadros de tolerancia que se le permite a una partícula desaparecer a modo de que se vincule a alguna de las trayectorias previas. Si la partícula reaparece después de dicho número de cuadros, ésta dará inicio a una nueva trayectoria.
- ***good***: Este parámetro indica el número mínimo de posiciones por trayectoria. Así, trayectorias con un número de posiciones menores a este parámetro son eliminadas de la matriz de trayectorias.

2.3.7. Análisis de las trayectorias

A modo de caracterizar los patrones de motilidad de los tripomastigotes, para cada una de las trayectorias recuperadas se determinaron los siguientes parámetros: rapidez promedio ($\overline{\nu(t)}$), desplazamiento cuadrático medio (*Mean Square Displacement* - MSD), así como un cociente de densidad de probabilidad espacial (ρ).

2.4. Ensayos de infección celular

Para este tipo de experimento se tomaron 9 cajas Petri de 6 mm de diámetro (sin tratamiento). Dentro de cada una de estas cajas se posicionaron tres cubreobjetos previamente flameados. Posteriormente se cultivaron las diferentes líneas celulares sobre los cubreobjetos hasta que llegaban a una confluencia del 50 %. Por último, los tripomastigotes fueron agregados a los cultivos celulares utilizando el siguiente protocolo:

- Colectar los parásitos producidos por una infección primaria en un tubo Falcon de 15 ml.
- Centrifugar la muestra a 3,000 rpm durante 10 minutos.
- Retirar el sobrenadante teniendo cuidado de no perder la pastilla.
- Disgregar la pastilla y homogenizar la muestra. Llevar el volumen a 1 ml con medio DMEM + 2 % de SFB.
- Tomar 10 μ l de la muestra y mezclar con 10 μ l de formaldehído al 3.7 %.
- Contabilizar los T.C.C. en una cámara Neubauer y tomar un volumen tal que contenga 1.95×10^5 tripomastigotes.
- Agregar el inóculo correspondiente de T.C.C. a la caja Petri con las células previamente cultivadas.
- Llevar el volumen a un total de 3.5 ml de medio DMEM + 2 % de SFB.

Una vez ingresados los T.C.C. en la caja Petri, estos se dejaron interactuando con las células durante un lapso de 2 horas. Al cabo de este tiempo, se retiró el medio y se realizaron lavados con PBS sin EDTA para retirar los parásitos del sobrenadante. Finalmente, se reemplazó el medio con 3.5 ml de medio DMEM fresco complementado al 2 % de SFB. A partir de este momento se inició el periodo de examinación para la cinética de infección haciendo un seguimiento de la misma a las 18 horas, 2, 3, 5, 7, 9, 11, 13 y 18 días (ver Fig. 2.3). A lo largo de toda la cinética se realizaron cambios de medio cada 48 horas, reemplazando el medio viejo por medio DMEM + 2 % de SFB. Además del cálculo de células infectadas tras 18 horas post interacción, también se decidió contabilizar el número de amastigotes intracelulares para identificar si existen diferencias en los tiempos de replicación en función de la línea celular.



Figura 2.3. Metodología utilizada para el seguimiento de una cinética de infección.

2.4.1. Preparación de la muestra

Para cada día en que se monitoreo la cinética de infección fue necesario fijar las células en cuestión y realizar una tinción con DAPI de acuerdo con los siguientes protocolos:

Fijación de las células

- Realizar dos lavados utilizando 2 ml de PBS sin EDTA. Realizar el lavado con cuidado para no despegar la monocapa.
- Fijar las células con 2 ml de formaldehído al 3.7 % y dejar reposar durante 20 minutos a temperatura ambiente.
- Realizar dos lavados con 1 ml de PBS sin EDTA para retirar el Formaldehído.

Tinción con DAPI

Posteriormente , se realizó una tinción con DAPI para poder teñir tanto el núcleo de las células, como el núcleo y cinetoplasto de los parásitos. El siguiente protocolo detalla los pasos seguidos para realizar dicha tinción:

- Enjuagar cada uno de los cubreobjetos con PBS 1X sin EDTA y escurrir un poco.
- Enjuagar con agua inyectable.
- Colocar dos gotas de 10 μ l de Vectashield con DAPI (Vector, No. Cat. 1500) sobre un portaobjetos, previamente etiquetado con el experimento a trabajar (línea celular, cepa de parásito, día de la cinética y nombre del responsable).
- Colocar cada cubreobjeto sobre una gota de Vectashield, teniendo especial cuidado de hacerlo por el lado sobre el cual están las células.
- Introducir los portaobjetos dentro de una caja y envolverla con aluminio.
- Dejar en reposo a temperatura ambiente durante 15 minutos.
- Refrigerar las muestras a 4°C durante al menos 1 hora.

2.4.2. Toma de las imágenes

Cada uno de los cubreobjetos fue analizado mediante microscopía confocal utilizando un microscopio *Leica*, con un objetivo de 40X, así como aceite de inmersión. Las imágenes fueron tomadas por medio del software *LAS AF*, haciendo uso de la herramienta *Z-stack*. Para cada cubreobjeto se seleccionaron 8 campos seleccionados al azar.

El DAPI fue excitado con un láser Diodo 405 a una longitud de onda de 358 nm, presentando su máxima emisión en 461 nm. Por otro lado, la Proteína Verde Fluorescente (GFP) de los parásitos, fue excitada a través de un láser de Argón con una longitud de

onda de 475 nm, la longitud de onda de emisión se acotó en el rango de 501-510 nm. Finalmente, se estableció un valor de compensación (smart offset) de -6.5 % y una apertura de pinhole de 67.93 con la intención de reducir el ruido digital en las imágenes.

2.4.3. Procesamiento de las imágenes

Las imágenes fueron importadas a MATLAB y divididas en 9 sectores, cada uno de los cuales se dividió en otros 9 sectores, con la intención de tener un sistema de referencia que facilitara el análisis. Para cada imagen se contabilizó el número de células presentes en el experimento, es decir, el número de núcleos teñidos en azul (N_T). Las células infectadas pudieron ser identificadas, ya fuese por la presencia parásitos verdes alrededor del núcleo de las mismas, o bien, por la presencia de los núcleos y cinetoplastos en azul de aquellos parásitos que no presentaron la proteína verde fluorescente (N_I).

De este modo, el porcentaje de células infectadas por día de experimento se determinó como se indica a continuación:

$$C_I = 100 * \left(\frac{N_I}{N_T} \right) \quad (2.1)$$

2.5. Curvas de crecimiento celular

A continuación se procedió a realizar las curvas de crecimiento celular. Para ello se emplearon placas de 12 pozos en las cuales se cultivaron las diferentes líneas celulares de mamífero por triplicado, es decir, 3 pozos por cada una de las 4 líneas celulares (ver Fig. 2.4). De este modo, se realizó un seguimiento la proliferación celular a lo largo de 5 días.

2.5.1. Preparación de la muestra

Se emplearon 5 cajas de 12 pozos, 1 por día de experimento. En cada uno de los pozos se agregó un inóculo de 2×10^4 células, las cuales se mantuvieron en incubación con medio



Figura 2.4. Arreglo experimental para las curvas de crecimiento celular.

DMEM + 10 % de SFB, a una temperatura de 37°C y una atmósfera del 5 % de CO₂.

El día del experimento se procedió al lavado y tinción de los núcleos celulares mediante el siguiente protocolo:

- Retirar el medio de los pozos.
- Realizar dos lavados con 1 µl de PBS sin EDTA.
- Teñir los núcleos celulares con 500 µl de Hoechst (stock 1:1000 de Hoechst en DMEM + 10 % de SFB).
- Cubrir la caja con aluminio.
- Mantener en incubación por al menos una hora a 37°C y una atmósfera con 5 % de CO₂.

2.5.2. Toma y análisis de las imágenes

Cada pozo de la caja fue observado en un microscopio invertido de fluorescencia Nikon ECLIPSE T320000-U con un objetivo de contraste de fase y una magnificación de 10X. Para cada pozo se registraron 8 campos distribuidos aleatoriamente.

Para el análisis de las imágenes fue necesario trabajar con el canal azul de las mismas y realizar una binarización para discretizar la imagen entre lo que corresponde al núcleo celular y lo que fue el fondo. Posteriormente, la imagen fue discretizada para identificar los diferentes núcleos de manera independiente mediante la función *watershed* de **MATLAB** y posteriormente contabilizados con la función *regionprops*.

2.6. Desarrollo del modelo

Para un entendimiento más profundo del comportamiento infectivo entre el parásito y las células de mamífero se decidió analizar las cinéticas de infección desde una perspectiva matemática. Para ello se desarrolló un modelo de la dinámica de infección de las células de mamífero por los tripomastigotes de *T. cruzi*. (véase Fig 2.5 para una representación esquemática del mismo), dicho modelo estuvo inspirado en el modelo clásico de epidemiología propuesto por Kermack y McKendrick [34]. El modelo se construyó considerando tres diferentes poblaciones: **células susceptibles** (S), **células infectadas** (I), y **parásitos libres en sobrenadante** (P). Dichas poblaciones estuvieron gobernadas por el siguiente conjunto de ecuaciones diferenciales con retardo:

$$\frac{dS}{dt} = r_S S \left(1 - \frac{S+I}{K}\right) - [\beta SP + \gamma SI], \quad (2.2)$$

$$\begin{aligned} \frac{dI}{dt} &= r_I I \left(1 - \frac{S+I}{K}\right) + [\beta SP + \gamma SI] \\ &\quad - [\beta S_\tau P_\tau + \gamma S_\tau I_\tau] \exp \left[r_I \int_{t-\tau}^t \left(1 - \frac{S(t') + I(t')}{K}\right) dt' \right], \end{aligned} \quad (2.3)$$

$$\begin{aligned} \frac{dP}{dt} &= \delta [\beta S_\tau P_\tau + \gamma S_\tau I_\tau] \exp \left[r_I \int_{t-\tau}^t \left(1 - \frac{S(t') + I(t')}{K}\right) dt' \right] \\ &\quad - \beta SP. \end{aligned} \quad (2.4)$$

Para el modelo se asumió que las células susceptibles pueden ser infectadas cuando entran en contacto, ya sea con los parásitos o con una célula infectada; las células infectadas pasan por un periodo de incubación con una duración τ después del cual éstas se lisan y

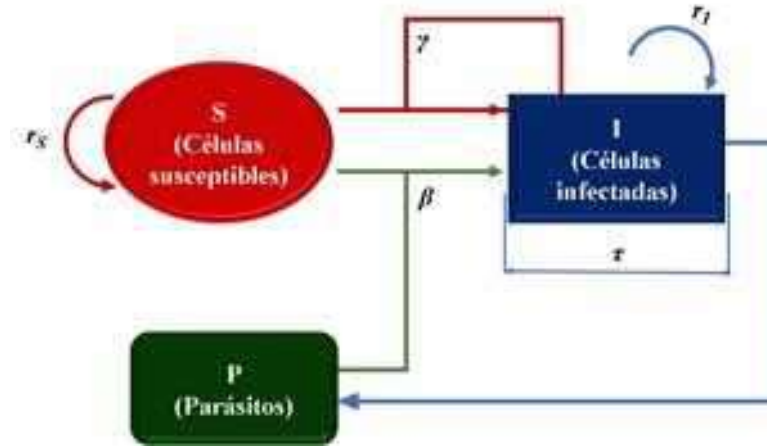


Figura 2.5. Representación esquemática del modelo matemático para el estudio de la infección de células de mamífero por tripomastigotes de *T. cruzi*. S , I , y P representan la población de células susceptibles, células infectadas y parásitos libres respectivamente. Las

diferentes flechas denotan las interacciones entre los compartimentos. Las células susceptibles pueden autorreplicarse. Estas pueden ser infectadas al interactuar con células infectadas o con parásitos. Contrario al resto de las variables, las células infectadas tienen una estructura de edad, indicado por la forma del compartimento correspondiente. Estas células conllevan un periodo de incubación con una duración τ , después del cual las células se lisan y liberan una gran cantidad de nuevos parásitos en el medio. Las células infectadas también pueden autorreplicarse.

liberan una gran cantidad de parásitos en el medio. Las células susceptibles e infectadas pueden autorreplicarse siguiendo una ecuación logística, mientras compiten por los recursos del medio. Las ecs. (2.2)-(2.4) son ecuaciones balanceadas, los términos de la derecha (td) tienen las siguientes interpretaciones. El primer td en las ecs. (2.2) y (2.3) contabiliza la tasa de crecimiento de las células susceptibles e infectadas respectivamente. Respecto a los parámetros en estos términos, r_S y r_I son las constantes intrínsecas de la tasa de crecimiento para las células susceptibles e infectadas respectivamente, mientras que K es su capacidad de carga. El segundo td en las ecs. (2.2) y (2.3) establece la tasa de infección de

las células susceptibles debido a su interacción con los parásitos o con las células infectadas. Estos términos asumen una cinética de ley de acción de masas. Así, β es la tasa constante de infección de células susceptibles debido a los parásitos, y γ la tasa de infección de células susceptibles por estar en contacto con las células infectadas. El último término de la ec. (2.4) explica el hecho de que, cuando un tripomastigote invade una célula, éste deja de ser un parásito libre. El tercer término del lado derecho en la ec. (2.3) toma en consideración que el número de células infectadas al tiempo t es igual al número de ellas que fueron infectadas al tiempo $t - \tau$ (X_τ denota $X(t - \tau)$), multiplicado por un factor de la forma $\exp\left(\int_{t-\tau}^t \mu(t')dt'\right)$, siendo $\mu(t')$ la tasa de replicación de las células infectadas; la cual contabiliza la replicación de las células infectadas en el intervalo de tiempo $[t - \tau, t]$ (véase el Apéndice .1. para la derivación formal). Finalmente, el primer término del lado derecho en la ec. (2.4) explica como cada vez que una célula infectada se lisa, esta libera δ tripomastigotes al medio. Obsérvese que las ecuaciones (2.2)-(2.4) no toman en cuenta la tasa de mortalidad de las células ni de los parásitos (solo aquella debido a la lisis de las células). Esto es debido a las siguientes razones: en el caso de las células de mamífero, tales tasas de mortalidad se incorporan intrínsecamente a las tasas de crecimiento en el modelo logístico; mientras que, en el caso de los parásitos, el protocolo experimental contempla la eliminación del medio de cultivo (por lo tanto, de la mayoría de los parásitos libres) cada dos días, de modo que la muerte de los parásitos es despreciable durante ese período de tiempo.

Capítulo 3

Resultados

3.1. Ensayos de motilidad

Se inició con la caracterización de los patrones de motilidad de los tripomastigotes de *T. cruzi* bajo condiciones control, es decir, tomando en cuenta solo los parásitos durante los experimentos sin involucrar las células. Primeramente se tomaron videos del nado libre de los parásitos empleando los dispositivos descritos en la sección de **Materiales y Métodos** y se reconstruyeron las trayectorias de los parásitos. En este sentido, es importante mencionar que la resolución empleada en los videos (640x480 pixeles), en conjunto con la magnificación del microscopio, fueron suficientes para diferenciar entre los tripomastigotes y los amastigotes (debido a que existieron algunos amastigotes contaminantes en el medio), de modo que ambos estadios fueron visibles durante el experimento (ver Fig 3.1 a)). La resolución espacial correspondiente a estos experimentos fue de 2.52 pixeles/ μm . Se calculó la rapidez promedio instantánea de todas las trayectorias recuperadas de los parásitos, donde, a partir de los resultados, se observó que la rapidez promedio de los amastigotes nunca superaba los 4 $\mu\text{m}/\text{s}$. Por tanto, se utilizó este valor umbral como filtro para eliminar todas aquellas trayectorias que no correspondían a tripomastigotes. Un ejemplo de las trayectorias características de los tripomastigotes se muestra en la Fig 3.1 b).

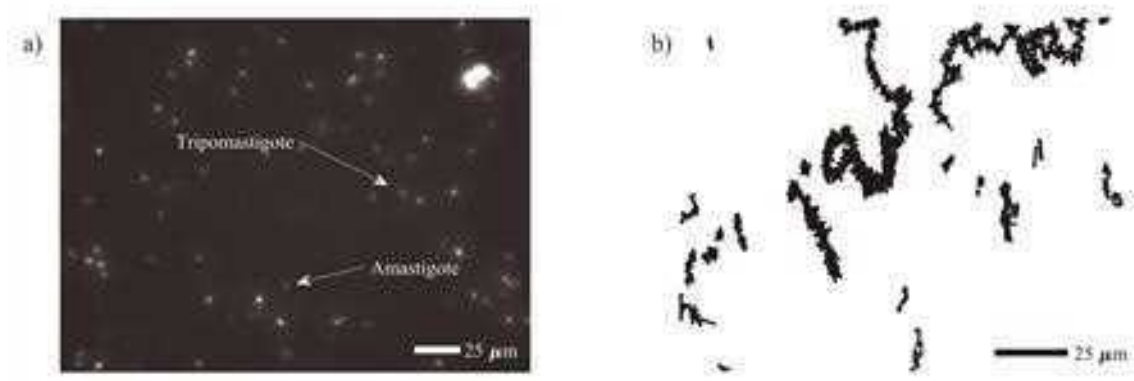


Figura 3.1. a) Cuadro representativo de un video. Los amastigotes y tripomastigotes pueden ser observados debido a la presencia de la proteína GFP. b) Reconstrucción de las trayectorias de los tripomastigotes. Como se puede apreciar, dichas trayectorias pueden ser bastante larga, pero también mostrarse confinadas.

Una vez que se garantizó que únicamente se tenían las trayectorias de los tripomastigotes, se procedió a caracterizarlas calculando su rapidez promedio, así como su desplazamiento cuadrático medio como se explica a continuación. Cada trayectoria se definió a partir de los siguientes arreglos:

$$t_i, \quad x_i, \quad y_i,$$

donde las variables t , x , y y denotan tiempo, coordenada horizontal y coordenada vertical respectivamente, mientras que el subíndice i hace referencia al i -ésimo cuadro del video. Dado que los videos fueron tomados a 50 cuadros por segundos,

$$\Delta t = t_{i+1} - t_i = 0.02 \text{ s},$$

para todos los valores de i . Con estas definiciones la rapidez promedio de un parásito a lo largo de una trayectoria única compuesta de N puntos es:

$$\bar{v} = \frac{1}{N-1} \sum_{i=1}^{N-1} \frac{\sqrt{(x_{i+1} - x_i)^2 + (y_{i+1} - y_i)^2}}{\Delta t}.$$

Por otro lado, el desplazamiento cuadrático medio (MSD, por sus siglas en inglés) puede ser calculado como sigue para una trayectoria compuesta de N puntos:

$$\text{MSD}(t_j) = \frac{1}{N-j} \sum_{i=1}^{N-j} (x_{i+j} - x_i)^2 + (y_{i+j} - y_i)^2,$$

donde $t_j = j\Delta t$. A partir de su definición, se sabe que el MSD mide la desviación en la posición de una partícula que se mueve aleatoriamente con respecto a un punto de referencia a lo largo del tiempo, de modo que puede ser visto como una medición del área explorada por dicha partícula. En general, el desplazamiento cuadrático medio obedece una ley de potencias de la forma $\text{MSD}(t) \propto t^\lambda$ durante periodos cortos de tiempo. El valor de λ determina si el movimiento es subdifusivo ($\lambda < 1$), difusivo ($\lambda = 1$), o superdifusivo ($\lambda > 1$) [35].

Se establecieron 5 experimentos independientes, dando un total de 15 videos con una duración de 2.5 minutos cada uno de ellos (3 videos por experimento). De estos videos se recuperaron 3,934 trayectorias independientes, con una longitud promedio de 290 puntos por trayectoria. Se procedió al análisis estadístico de las características de las trayectorias, sin encontrar una diferencia significativa entre estas. Es por esto que se decidió agrupar todas las trayectorias obtenidas bajo condiciones control a modo de mejorar la estadística. De acuerdo con los resultados, el promedio de la rapidez promedio de las trayectorias $\langle \bar{v} \rangle$, y el promedio del exponente de la ley de potencias en el MSD, $\langle \lambda \rangle$ (el cual fue calculado en el rango de 0 - 2 seg), tomaron los siguientes valores:

$$\langle \bar{v} \rangle = 8.1258 \pm 0.48 \mu\text{m/s}, \quad \langle \lambda \rangle = 1.004 \pm 0.004.$$

Después de caracterizar la motilidad de los tripomastigotes bajo condiciones control, se llevaron a cabo los experimentos en que los parásitos nadaban sobre monocapas de cultivos celulares *in vitro*. Se hizo uso de cuatro diferentes líneas celulares, considerándose tres diferentes grados de confluencia: confluencia baja (CB), alrededor del 25 %; confluencia media (CM), alrededor del 50 %; y confluencia alta (CA), alrededor del 100 %. Para cada

condición se realizaron 5 experimentos independientes, tomando para cada uno de ellos 3 videos, y recuperando un número similar de trayectorias que en el grupo control. De igual modo, se caracterizaron dichas trayectorias mediante el cómputo de su promedio de rapidez promedio, así como del promedio de su valor λ . En seguida se discuten los resultados:

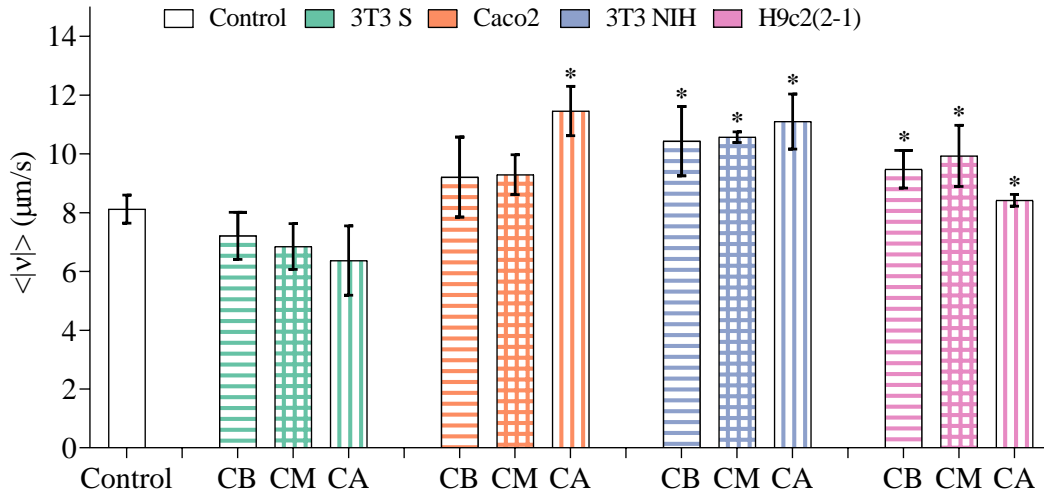


Figura 3.2. Valores de rapidez promedio de los tripomastigotes interactuando con diferentes líneas células y en ausencia de ellas. El número de experimentos independientes para cada condición fue como se indica a continuación: grupo control, $n = 5$; 3T3 S, $n = [4 \text{ (CB)}, 3 \text{ (CM)}, 3 \text{ (CA)}]$; Caco2, $n = [3 \text{ (CB)}, 3 \text{ (CM)}, 3 \text{ (CA)}]$; 3T3 NIH, $n = [3 \text{ (CB)}, 3 \text{ (CM)}, 3 \text{ (CA)}]$; y H9c2(2-1), $n = [4 \text{ (CB)}, 3 \text{ (CM)}, 4 \text{ (CA)}]$. CB, CM, y CA corresponden respectivamente a confluencia baja, media y alta. Las líneas negras indican el intervalo de confianza al 95 %. Los asteriscos denotan diferencias con significancia estadística respecto al grupo control, esto basado en sus intervalos de confianza.

En la Fig 3.2 se muestra la comparación de los valores de rapidez promedio obtenidas para todos los grupos experimentales y el grupo control. Obsérvese que, cuando los tripomastigotes nadan sobre las células de mamífero, estos tienden a moverse más rápido en presencia de las células Caco2, 3T3 NIH y H9c2(2-1) comparados contra aquellos

parásitos en condiciones control, mientras que en presencia de las células 3T3 S, su valor de rapidez promedio se reduce solamente un poco y sin llegar a presentar diferencias con significancia estadística respecto al control. Al realizar una comparación de los valores de rapidez promedio de los tripomastigotes nadando sobre las células 3T3 S, Caco2 y 3T3 NIH en función de la confluencia celular empleada no se pudieron distinguir diferencias con significancia estadística, mostrando con esto que para estas líneas celulares, la confluencia celular no juega un papel importante en el parámetro de rapidez. Sin embargo, para los cultivos de mioblastos H9c2(2-1), los parásitos que interactuaron con cultivos confluentes de esta línea mostraron un valor menor de su rapidez promedio comparado con los experimentos trabajados en confluencia baja y media. Este comportamiento a altos valores de confluencia podría deberse a la diferenciación que presentan los mioblastos en miotubos una vez que llegan al 100 % de confluencia en el cultivo celular. Dicho comportamiento de diferenciación ya ha sido reportado con anterioridad [36].

En la Fig 3.3 se muestran los resultados respecto al promedio del exponente de la ley de potencia (λ) de las curvas de desplazamiento cuadrático medio. Nótese que, en todas las condiciones experimentales, el valor de λ es consistentemente menor que en el caso control. Esto significa que, en presencia de las células, los parásitos tienden a moverse en un régimen subdifusivo para intervalos cortos de tiempo ($t \leq 2$ s), mientras que bajo condiciones control lo hacen en un régimen difusivo.

Recordando el significado del desplazamiento cuadrático medio, los resultados mencionados en el párrafo anterior revelan que los tripomastigotes de *T. cruzi* se alejan de su punto de partida más lentamente cuando estos se encuentran en presencia de células comparado a cuando se encuentran solos (Fig 3.3). Una vez más, no fue posible encontrar diferencias con significancia estadística en los valores de λ para los parásitos que interactuaron con los cultivos de células 3T3 S, Caco2 y 3T3 NIH, esto como función de la confluencia celular de trabajo en los experimentos. Sin embargo, se pudo observar, una reducción en el valor de λ para aquellos tripomastigotes en presencia de cultivos de

las células H9c2(2-1) al 100 % de confluencia respecto a los experimentos trabajados en confluencia media, esto podría atribuirse a su diferenciación a miotubos (lo cual tendría que ser demostrado) [36]. Con respecto a la disminución del valor de λ en los experimentos con las células H9c2(2-1) a baja confluencia respecto a los experimentos a confluencia media, no fue posible encontrar una posible explicación. No obstante, los valores de λ menores que 1 en todos los experimentos del grupo experimental pudiesen ser un indicativo de que los parásitos se mueven en áreas más restringidas cuando las células se encuentran presentes.

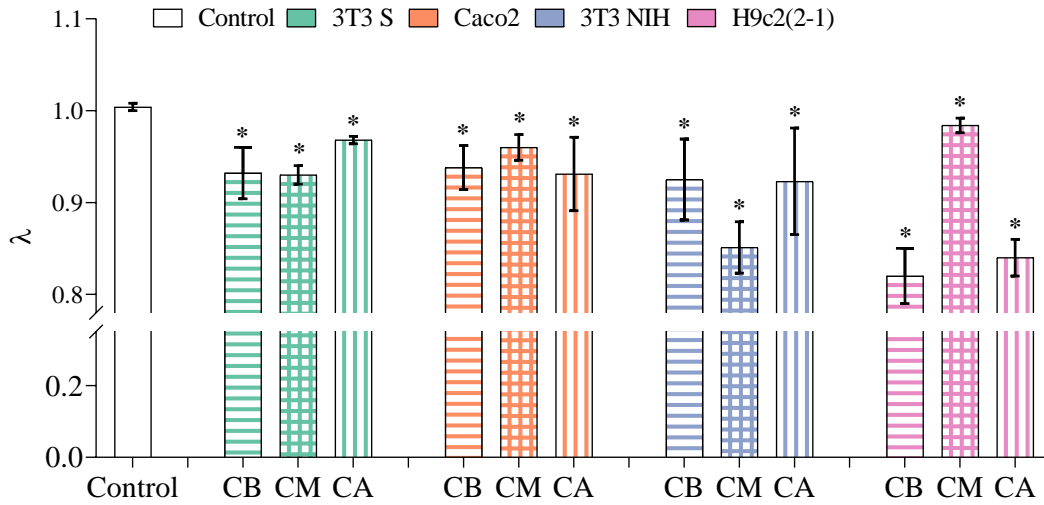


Figura 3.3. Valores de λ obtenidos a partir de una regresión lineal a las curvas de desplazamiento cuadrático medio hasta los 2 segundos de análisis. El número de experimentos independientes para cada condición fue como se indica a continuación: grupo control, $n = 5$; 3T3 S, $n = [4 \text{ (CB)}, 3 \text{ (CM)}, 3 \text{ (CA)}]$, Caco2 $n = [3 \text{ (CB)}, 3 \text{ (CM)}, 3 \text{ (CA)}]$; 3T3 NIH, $n = [3 \text{ (CB)}, 3 \text{ (CM)}, 3 \text{ (CA)}]$; and H9c2(2-1) $n = [4 \text{ (CB)}, 3 \text{ (CM)}, 4 \text{ (CA)}]$. CB, CM, and CA corresponden respectivamente a confluencia baja, media y alta.

Las líneas negras indican el intervalo de confianza al 95 %. Los asteriscos denotan diferencias con significancia estadística respecto al grupo control, esto basado en sus intervalos de confianza.

Para comprobar esto, se procedió a analizar los videos como sigue. Para cada cuadro de video, se identificaron todas las posiciones de los tripomastigotes. Enseguida, se agruparon todas estas posiciones en una sola imagen, la cual fue dividida en 50 sectores del mismo tamaño, y se recuperó la fracción de posiciones ubicadas en cada sector. Esta fracción puede ser interpretada como la distribución de probabilidad de encontrar a un parásito a través de la superficie de examinación. Mapas representativos de estas distribuciones de probabilidad para ambos grupos de trabajo se muestran en la Fig 3.4. Como se puede observar, dicha distribución de probabilidad es bastante homogénea para los casos del grupo control. Sin embargo, cuando las células se encuentran presentes, se pueden observar algunos sectores con altas concentraciones de parásitos en estos.

En la Fig 3.4 también se pueden observar que los sectores de alta concentración de parásitos tienden a estar cerca de las células. Para realizar un análisis cuantitativo de esta observación, se cuantificó la probabilidad por unidad de área (o densidad de probabilidad) de que los puntos de una trayectoria estuviesen sobre o en la vecindad (dentro de una región de $4\text{ }\mu\text{m}$ en la periferia) de las células, P_{ON} ; así como la densidad de probabilidad de que los puntos de la trayectoria se encuentren sobre áreas vacías, P_{OFF} . Posteriormente, se realizó el cociente $\rho = P_{\text{ON}}/P_{\text{OFF}}$. Valores de ρ mayores que 1 indican que es más factible encontrar parásitos sobre o en la vecindad de las células que lejos de ellas. Dado que este parámetro requiere la discretización del área de estudio en áreas con células y áreas sin ellas, el análisis solo se realizó en los grupos experimentales trabajados en confluencia baja y media. En la Fig 3.5 se puede apreciar que en el caso de las células Caco2 y 3T3 NIH, los parásitos no muestran una predilección en cuanto a su localización sobre o lejos de las células. Por su parte, en el caso de las células 3T3 S se muestra una clara predilección de los parásitos a situarse lejos de las ellas. Por el contrario, se puede apreciar una preferencia significativamente mayor de los parásitos a situarse cerca de las células H9c2(2-1) a partir de confluencias bajas ($\sim 25\%$), dicho efecto se muestra más marcado para experimentos en confluencia media ($\sim 50\%$).

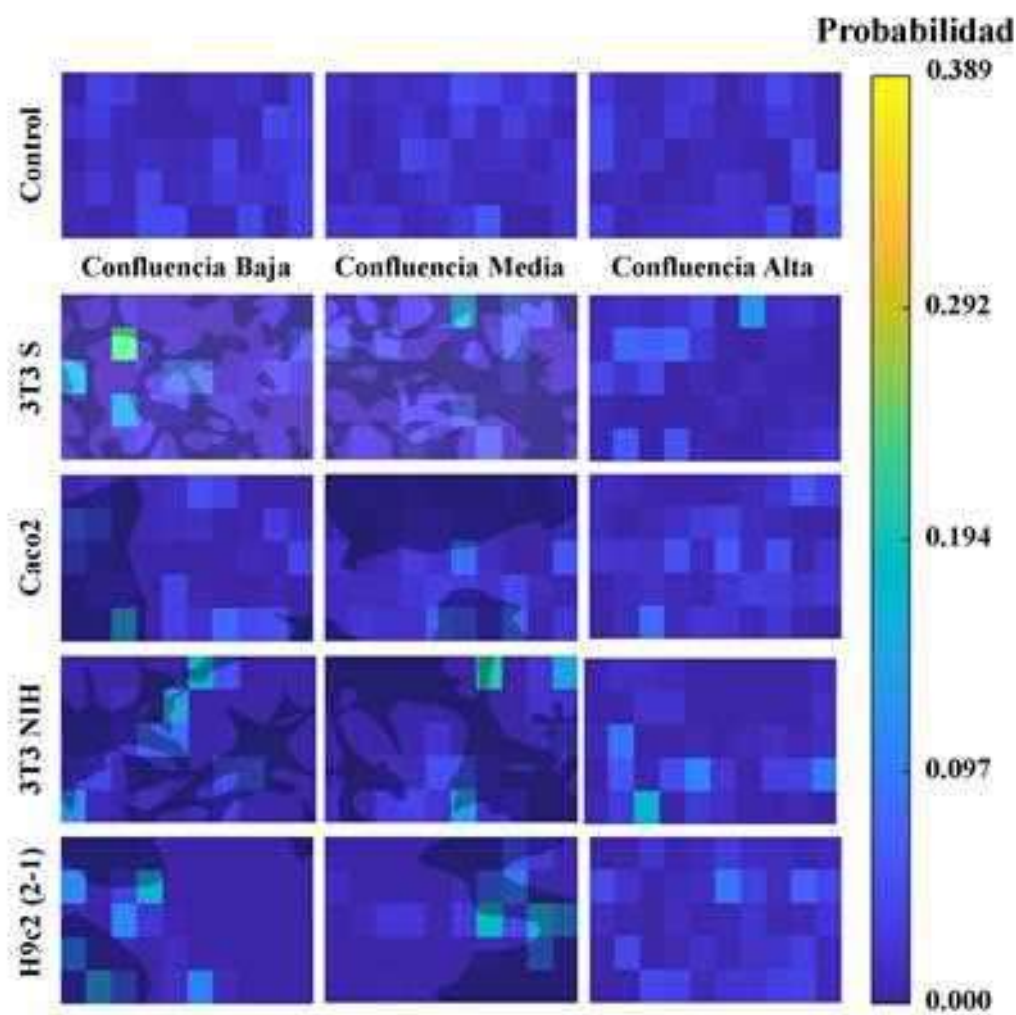


Figura 3.4. Mapas de densidad de probabilidad espacial. Fila superior: mapas representativos del grupo control. La influencia de las células 3T3 S, Caco2, 3T3 NIH y H9c2 (2-1) en la distribución espacial de los tripomastigotes está ilustrada en los mapas de la segunda, tercera, cuarta y quinta fila respectivamente. Para los mapas del grupo experimental, la primera, segunda y tercera columna corresponden a los experimentos de confluencia baja (alrededor de 25 %), media (alrededor de 50 %), y alta (alrededor de 100 %). Las áreas negras corresponden a la superficie ocupada por las células en los experimentos de confluencia baja y media.

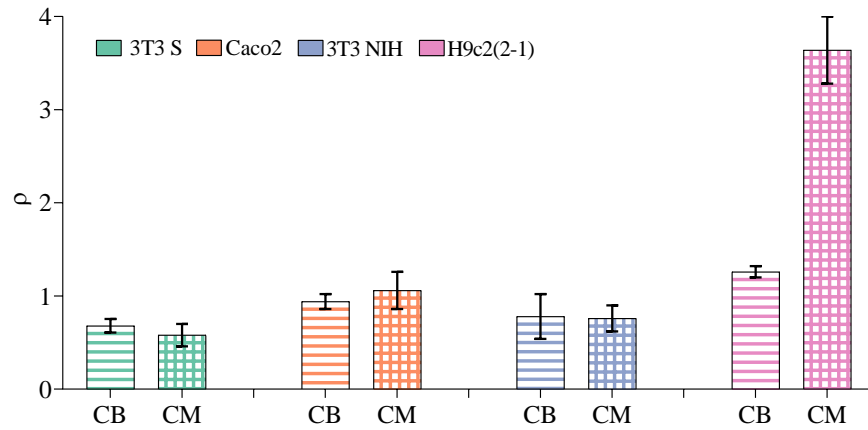


Figura 3.5. Valores de ρ para los experimentos del grupo experimental trabajando en confluencia baja y media. Las barras negras indican los intervalos de confianza al 95 %.

Para resumir, los resultados mostrados arriba demuestran que los tripomastigotes de *T. cruzi* modifican sus características mótils (rapidez, exponente de la ley de potencias del MSD y localización) cuando las células de mamífero se encuentran presentes, además, el grado de estos cambios es dependiente de la línea celular empleada.

3.2. Ensayos de infección

Se inició con el estudio de la evolución de la infección en células 3T3 NIH. Los tripomastigotes fueron agregados a los cultivos celulares (como se indicó en **Materiales y Métodos**) una vez que las células alcanzaron el 50 % de confluencia, para la posterior visualización de la infección mediante microscopía de fluorescencia. Un resultado representativo de estos experimentos se muestra en la Fig 3.6. Allí, es posible observar algunas células infectadas a partir de las primeras 18 horas de iniciado el experimento. Dado que el amastigote es el estadio del parásito estrictamente intracelular, una célula infectada pudo ser identificada por la presencia de al menos un amastigote (una mancha

verde fluorescente) en la vecindad del núcleo celular (mancha azul fluorescente) [19]. A medida que la infección progresa, el número de células infectadas aumenta, al igual que el número de amastigotes por célula. Al cabo de 13 días post interacción, la gran mayoría de las células se encuentran infectadas. A partir de estos resultados, se optó por calcular el porcentaje de células infectadas tras 18 horas de interacción, siendo este valor una estimación de la eficiencia con la que los tripomastigotes invaden las células, lo cual ya se ha manejado en otras investigaciones [19, 25, 37, 38].



Figura 3.6. Imágenes representativas de infecciones con tripomastigotes de la cepa CL Brener en células 3T3 NIH: *izquierda*, después de 18 horas de iniciada la interacción; *en medio*, después de 7 días; y *derecha*, después de 13 días. El núcleo de las células de mamífero, así como el núcleo del parásito y su cinetoplasto están teñidos en azul, mientras que los parásitos se identifican por la presencia de la proteína GFP.

Después de establecer el protocolo, se establecieron los ensayos de infección para todas las líneas celulares y se determinó su correspondiente eficiencia de invasión. Los resultados obtenidos se reportan en la Fig 3.7 a). Obsérvese que la eficiencia de invasión para los cultivos de células 3T3 S y Caco2 es prácticamente despreciable al compararse con las obtenidas para los cultivos celulares 3T3 NIH y H9c2 (2-1), mostrando con esto una susceptibilidad específica para cada línea celular a ser infectada.

A su vez, se calculó el número de amastigotes por célula (APC) a las 18 horas post

infección (hpi) (Fig 3.7 b)). A este tiempo, fue posible identificar un promedio de 1.4 APC para las cuatro líneas celulares, lo cual indica que la infección acaba de iniciar. Sin embargo, solo para las líneas celulares de fibroblasto 3T3 NIH y mioblastos H9c2(2-1), los amastigotes han iniciado a dividirse dado que fue posible identificar hasta 2 amastigotes por célula (Fig 3.7 b). Una observación notable es que ninguna célula Caco2 fue infectada durante este periodo de tiempo, lo cual concuerda con la falta de amastigotes en el registro.

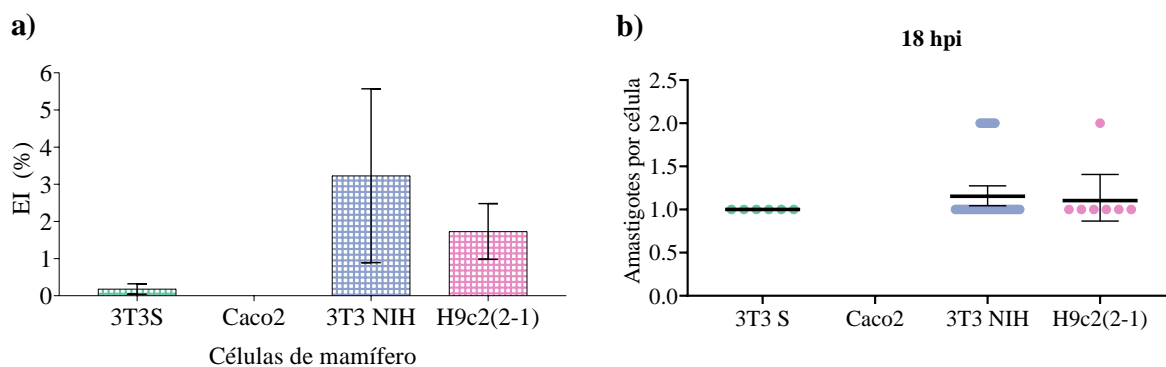


Figura 3.7. a) Eficiencia de invasión de tripomastigotes ante las diferentes líneas celulares estudiadas. Las barras negras corresponden al intervalo de confianza al 95 % obtenida de 3-4 experimentos independientes. b) Número de amastigotes por célula a 18 hpi. Las líneas negras gruesas corresponden al número promedio de amastigotes por célula. Las líneas negras delgadas indican el intervalo de confianza al 95 %.

3.3. Patrones de correlación

Como se ha mostrado, los tripomastigotes de *T. cruzi* (cepa CL Brener) cambian sus patrones de motilidad en presencia de células de mamífero, además, el grado de estos cambios es dependiente de la línea celular en cuestión. Por otro lado, la misma cepa de parásitos invade las líneas celulares estudiadas con diferentes grados de eficiencia. Estos dos resultados motivaron a investigar la posible correlación entre estas dos naturalezas.

En la Fig 3.8, se presentan gráficas de dispersión donde la eficiencia de invasión para las cuatro líneas celulares es contrastada con las características mótils de los tripomastigotes al interactuar con cada una de ellas. Dado que los ensayos de infección fueron realizados en células con un 50 % de confluencia, se decidió utilizar los resultados de motilidad para los grupos experimentales bajo condiciones de confluencia media. Como se aprecia en la Fig 3.8, la eficiencia de invasión está positivamente correlacionada con la rapidez promedio de los parásitos y correlacionada de manera negativa con el exponente de la ley de potencias del desplazamiento cuadrático medio (λ). No se encontró una correlación clara entre la eficiencia de invasión del parásito y el cociente de densidad de probabilidad espacial (ρ). Estos resultados sugieren que las modificaciones en la motilidad sufridas por los parásitos en presencia de células de mamíferos pueden estar relacionadas funcionalmente con el proceso de invasión celular.

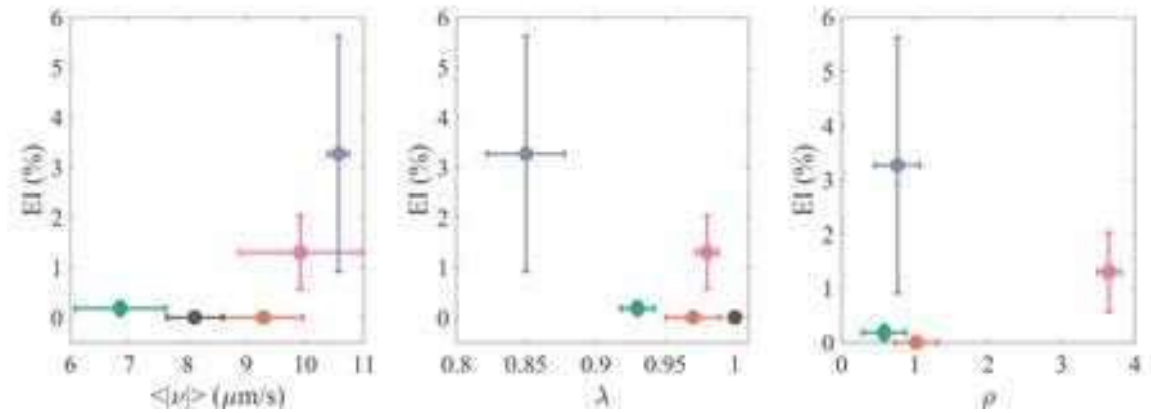


Figura 3.8. Gráficas de dispersión en las cuales se contrasta la eficiencia de invasión de los tripomastigotes y sus características mótils. El código de colores es como sigue: gris (control), 3T3 S (verde), Caco2 (naranja), 3T3 NIH (azul) y H9c2(2-1) (rosa). Las barras de colores indican el intervalo de confianza al 95 % para ambos ejes.

3.4. Modelo matemático

3.4.1. Curvas de crecimiento celular

Una vez terminada la parte del análisis mótil y de invasión celular, se inició con la caracterización de las curvas de crecimiento de las diferentes líneas celulares estudiadas. Siguiendo los protocolos explicados en la sección de **Materiales y Métodos**, se cultivaron las células 3T3 S, Caco2, 3T3 NIH, y H9c2(2-1) y se calculó el número de células a lo largo de 5 días. Los resultados obtenidos se muestran en la Fig 3.9. Nótese que las curvas de crecimiento celular son sigmoideas, razón por la cual fueron ajustadas a funciones logísticas de la forma:

$$S = \frac{K}{1 + \left(\frac{K-S_0}{S_0} \right) e^{-rst}}.$$

Los ajustes fueron realizados mediante la función `lsqcurvefit` de MATLAB. Las curvas que mejor se ajustaron a los datos experimentales se muestran en la Fig 3.9, y a su vez, los valores de los parámetros que generaron dichos ajustes, se encuentran tabulados en la Tabla 3.1. Los valores de r_S y K pueden ser interpretados respectivamente como la tasa de replicación intrínseca para cada línea celular, así como su correspondiente capacidad de carga.

Línea celular	r_S ($\times 10^{-3}$ hrs $^{-1}$)	K ($\times 10^6$ células)
3T3 S	45.83	1.20
Caco2	41.25	3.88
3T3 NIH	27.92	2.78
H9c2(2-1)	27.92	0.31

Cuadro 3.1. Valor de los parámetros que generaron el mejor ajuste de los datos experimentales a una función logística para todas las líneas celulares analizadas.

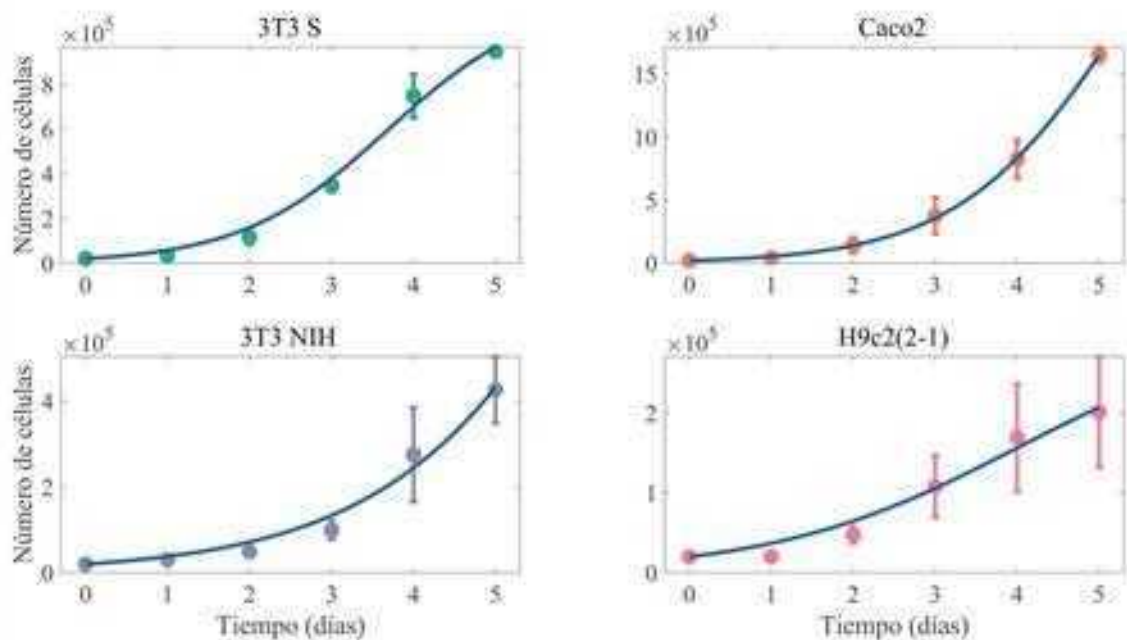


Figura 3.9. Evolución temporal del número de células en cultivo para las diferentes líneas celulares. Los puntos representan los valores experimentales (promediados a partir de 3 experimentos independientes), mientras que las barras de error denotan la desviación estándar. Las líneas sólidas corresponden al mejor ajuste definido a partir de una función logística.

3.4.2. Cinéticas de infección y aplicación del modelo

Tomando en cuenta el porcentaje de células infectadas, ya no solo a las primeras 18 horas de interacción, sino hasta los 18 días que duró el experimento, fue posible obtener las curvas de cinéticas de infección para cada una de las líneas celulares estudiadas. Los resultados obtenidos se muestran en la Fig 3.10. Resulta interesante observar como las diferentes líneas celulares siguen cinéticas de infección bastante diferentes entre sí, pese a que el agente infeccioso es el mismo en todos los casos.

Para tener un mejor entendimiento de estos resultados, se realizaron simulaciones utilizando el modelo descrito en la sección de **Materiales y Métodos**. Con este fin, se

implementó el siguiente protocolo numérico en **MATLAB**, el cual involucra la resolución numérica del sistema de ecuaciones mediante el algoritmo de Euler (con $\Delta t = 0.01\text{hrs}$):

1. En este primer paso se simuló el proceso de cultivo celular de las diferentes líneas celulares hasta alcanzar una confluencia del 50 %. Se puede deducir que cuando $I = P = 0$, el sistema de ecuaciones se reduce al modelo logístico para las células susceptibles. Tomando esto en cuenta, se resolvió la ecuación diferencial ordinaria logística resultante, con $S(t_0) = 0.01K$, para un tiempo lo suficientemente largo para alcanzar $S(t_f) = K/2$, donde t_f es el tiempo final de la simulación. En seguida, se estableció el tiempo $t \leftarrow t - t_f$, de modo que el siguiente paso iniciara en cero.
2. Para simular la interacción entre las células y los parásitos, se procedió a la resolución numérica del sistema de ecuaciones diferenciales con retardo para un lapso de tiempo de 2 horas, utilizando la solución del paso anterior como condición inicial para S . La condición inicial para I se estableció en cero para todo $t \leq 0$. La condición inicial para P fue de cero para todo $t < 0$, y $P_0 = 1.95 \times 10^5$ para $t = 0$ (lo cual corresponde a los 1-3 parásitos por célula que se agregaron a los cultivos celulares con una confluencia del 50 %).
3. El siguiente paso de la simulación consistió en resolver de manera numérica el sistema de ecuaciones con retardo para un lapso de tiempo de 48 horas (es decir, los tiempos de simulación inicial y final fueron $t = 2\text{ hrs.}$ y $t = 50\text{ hrs.}$), utilizando la solución acumulada para S , I , y P como condición inicial, con la excepción de que P se estableció en cero para $t = 2\text{ hrs.}$ para simular el cambio de medio de cultivo.
4. El paso 3 se realizó de manera iterativa, utilizando un tiempo de simulación de 48 horas en cada una de ellas. Esto se realizó hasta completar el tiempo total de los experimentos (18 días).

En principio, los experimentos de las cinéticas de infección se pueden simular empleando el protocolo numérico descrito anteriormente, siempre y cuando, las estimaciones de los

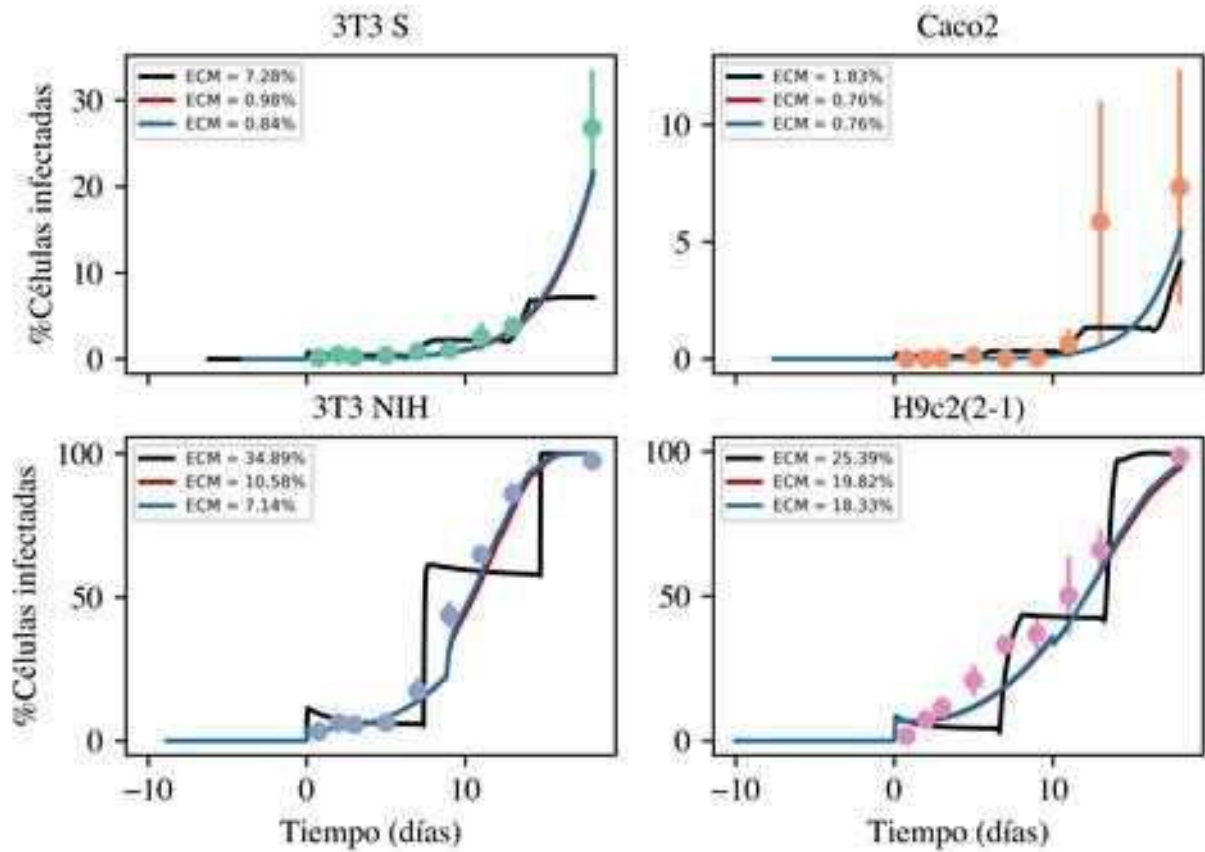


Figura 3.10. Cinéticas de infección para las diferentes líneas celulares. Los puntos representan los datos experimentales (promedio de 3 experimentos independientes), mientras que las barras de error denotan la desviación estándar. Las líneas sólidas corresponden a las curvas obtenidas tras resolver el modelo en 3 modalidades diferentes. El código de colores es como se indica a continuación: Modelo más simple (negro), modelo intermedio (rojo) y modelo completo (azul). El error cuadrático medio del ajuste (ECM) se muestra en la parte superior de cada imagen.

parámetros sean precisas. Como se explicó anteriormente, experimentalmente fue posible estimar los valores de los parámetros r_S y K . Para el resto de los parámetros (β , γ , δ , τ , y r_I), no se contaba con una buena estimación de ellos. Es por esto, que se obtuvieron como parámetros de ajuste determinados mediante inferencia Bayesiana [39]. Para las condiciones *a priori* de los parámetros se trabajó con distribuciones gaussianas, tomando como media para cada uno de ellos los valores empíricos que conllevaron a un buen ajuste. Por su parte, la desviación estándar se estableció como 1/10 parte de la media. Una vez obtenido el mejor set de parámetros se definió $f_i^{(e)}$ como la fracción de células infectadas determinadas de manera experimental medidas al tiempo $t_i^{(e)}$, y $f^{(s)}(t) = I(t)/(I(t) + S(t))$ la fracción de células infectadas predicha por el modelo con el set de parámetros obtenidos mediante la inferencia Bayesiana. De este modo, la función de máxima verosimilitud se estructuró de la siguiente manera:

$$\exp \left(-\frac{1}{2} \frac{\sum_i \left(f_i^{(e)} - f^{(s)}(t_i) \right)^2}{\sigma^2} \right),$$

con $\sigma = 2.5$. Para obtener muestras de Monte Carlo para las distribuciones *a posteriori* se hizo uso del método de cadena de Markov Monte Carlo [40].

Una vez definido todo lo anterior se procedió a estudiar las cinéticas de infección mediante el algoritmo descrito anteriormente en tres condiciones diferentes. La primera de estas fue considerando únicamente la infección de células por interacción con los parásitos libres en sobrenadante y la replicación de células susceptibles (el modelo más simple). Posteriormente se probó incluyendo la infección entre células, es decir, infección de una célula susceptible por contacto directo con una célula infectada (modelo intermedio). Finalmente, se incluyó la replicación de células infectadas en lo que se llamó la versión más completa del modelo. Los resultados se muestran en la Fig. 3.10. Los resultados de las distribuciones *a priori* y *a posteriori* se muestran en el Apéndice .2. Como se puede apreciar de los resultados, el modelo más simple fue incapaz de reproducir los resultados

experimentales. Lejos de tener un comportamiento creciente suave, el ajuste crece de manera escalonada. Esto pudiese deberse a que una vez que los parásitos son eliminados del medio (a través del cambio de medio realizado cada 48 horas), no existe otro mecanismo mediante el cual las células puedan ser infectadas en el corto plazo. El proceso de infección no puede proseguir sino hasta que aquellas células, que fueron infectadas τ unidades de tiempo previamente, son lisadas y liberan sus parásitos al medio. Por su parte, una vez incluida la infección por contacto entre células se pueden observar buenos ajustes a los datos experimentales en todos los casos, de modo que se puede decir que el modelo intermedio es capaz de reproducir los datos. Finalmente, el modelo más completo, si bien genera ajustes con valores de error cuadrático medio menores que para el caso anterior, dichos ajustes no resultan ser muy diferentes a los obtenidos previamente, siendo incluso iguales para la línea Caco2 (ECM = 0.76 %). Por tanto, pese a esta pequeña mejoría, se puede decir que el mecanismo de infección célula - célula juega un papel importante en el desarrollo de las cinéticas de infección, mientras que la replicación de células infectadas pareciera no ser tan relevante desde un punto de vista de la dinámica de infección. Es por ello, que en adelante se decidió trabajar solo con los resultados obtenidos a través del modelo intermedio. Los valores de la media y su correspondiente desviación estándar para los parámetros del modelo se indican en la siguiente tabla.

Línea celular	β ($\times 10^{-9}$ - hrs ⁻¹ parásitos ⁻¹)	γ ($\times 10^{-9}$ - hrs ⁻¹ células ⁻¹)	δ (parásitos)	τ (hrs)
3T3 S	2.38 ± 0.003	10.80 ± 0.008	6.80 ± 0.15	95.9 ± 0.11
Caco2	0.11 ± 0.003	4.80 ± 0.032	9.18 ± 0.79	182 ± 7.54
3T3 NIH	140.00 ± 0.356	4.90 ± 0.005	5.21 ± 0.03	212 ± 0.80
H9c2(2-1)	200.00 ± 5.120	40.80 ± 0.114	1.93 ± 0.03	240 ± 0.08

Cuadro 3.2. Set de parámetros que conllevaron al mejor ajuste posible a través de la versión intermedia del modelo.

Es importante señalar algunos datos importantes sobre los parámetros mostrados en la Tabla 3.2:

- Los valores obtenidos para τ corresponden a un tiempo de incubación de entre 4 y 10 días, lo cual concuerda con las observaciones experimentales.
- El valor del parámetro γ resultó al menos ser el doble para los cultivos H9c2(2-1) comparado con el resto de las líneas celulares. Lo cual hace lógica con el hecho de que las células H9c2(2-1), al ser mioblastos, el contacto celular entre ellas es más probable que en el resto de las líneas de estudio, incluso a valores medios de confluencia. Dicho contacto celular en las células H9c2(2-1) se hace aún más probable en cultivos con un alto número de pasajes, alterando además su morfología y propiedades debido a efectos de citotoxicidad, razón por la cual es importante trabajar con cultivos de células H9c2(2-1) con pasajes menores a 15 [29].
- Sorprendentemente, los valores de δ (número promedio de parásitos liberados por célula lisada) fueron bastante bajos para todas las líneas celulares, especialmente tomando en cuenta que las células infectadas pueden almacenar cientos de parásitos. Esta discrepancia puede ser explicada por el hecho de que las interacciones célula - parásitos están moduladas por una ley de acción de masas, la cual asume implícitamente que el sistema está bien mezclado. Sin embargo, el sistema experimental no se encuentra bien mezclado, dado que las células de mamífero se encuentran inmóviles, y por tanto, su distribución es claramente 2-dimensional; mientras que los parásitos presentan una distribución 3-dimensional, pudiéndose encontrar varios parásitos incluso a planos focales muy alejados de las células. En consecuencia, solo aquellos parásitos situados en la vecindad de las monocapas celulares pudieron eventualmente interactuar con ellas e invadirlas. Resulta interesante como Sibona y colaboradores [41] ajustaron un modelo de población a la parasitemia de *T. cruzi* en ratón. Ellos encontraron una cantidad muy pequeña de parásitos liberados por

las células tras su lisis (alrededor de 2-14) dependiendo de la cepa del ratón y del parásito empleada. Como se puede observar, dichos valores no se encuentran muy alejados de los obtenidos en este trabajo mediante experimentos *in vitro*.

A partir de los parámetros reportados en la Tabla 3.2 es posible identificar algunas posibles correlaciones. Por ejemplo, el parámetro r_S pareciera estar correlacionado negativamente con β . Para explorar esta posibilidad de manera cuantitativa se determinó el coeficiente de correlación de Pearson entre todos los pares posibles de parámetros, considerando las cuatro líneas celulares. Los resultados se ilustran en la Fig. 3.11. A partir de estos es posible observar que solo algunas correlaciones exhiben valores absolutos superiores a 0.9, en particular se encuentra la sugerente correlación entre r_S y β .

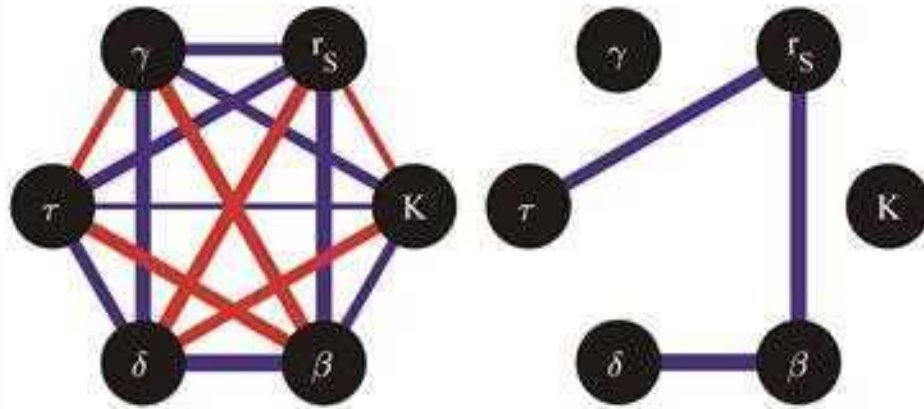


Figura 3.11. Red de los coeficientes de correlación entre los diferentes pares de los parámetros del modelo, calculada a partir de la estimación de los parámetros para las cuatro líneas celulares. Las líneas rojas y azules indican una correlación positiva o negativa respectivamente. El valor absoluto del coeficiente de correlación está representado por el grosor de cada línea. Del lado izquierdo se muestran todos los posibles coeficientes de correlación. Del lado derecho solo se muestran las líneas correspondientes a coeficientes de correlación mayores a 0.9 en valor absoluto.

Capítulo 4

Discusión y conclusiones

En este trabajo se caracterizó la motilidad de tripomastigotes de *T. cruzi* (cepa CL Brener) y se investigó como cambian los patrones de motilidad de estos parásitos en presencia de cultivos celulares en condiciones *in vitro*. Así mismo, se determinó la eficiencia con la cual estos tripomastigotes invaden dichas líneas celulares. Con esto se encontró una correlación entre un incremento de la rapidez promedio del parásitos y una disminución del exponente λ del MSD con un incremento en la eficiencia de invasión. Estos resultados concuerdan con la idea de que la motilidad pudiese jugar un papel importante durante el proceso de infección, aunque, dicha posibilidad aún debe ser demostrada.

Se encontró que la rapidez promedio del nado libre de los tripomastigotes en ausencia de células (grupo control) es de 8.12 $\mu\text{m/s}$, esto haciendo uso de un arreglo tridimensional de aproximadamente 2,000 μm de altura. Un resultado similar para la rapidez promedio, pero para tripomastigotes de *T. brucei* de la cepa Lister 427 ha sido reportado (8.9 $\mu\text{m/s}$). Este resultado también fue obtenido en ausencia de células, pero empleando condiciones casi bidimensionales [42]. Estos dos resultados contrastan con el obtenido para tripomastigotes de *T. brucei brucei*, cepa EATRO-427, para los cuales la rapidez promedio fue de alrededor de 2 $\mu\text{m/s}$ [43], utilizando un arreglo bidimensional al igual que en el trabajo de Uppaluri y colaboradores [42]. Esto sugiere que las diferencias en los valores de

rapidez promedio obtenidos son dependiente de la cepa empleada de *T. brucei*. Por otro lado, se ha demostrado que los epimastigotes de *T. cruzi*, cepa CL Brener, se caracterizan por moverse con una rapidez promedio alrededor de la mitad (alrededor de 4 $\mu\text{m/s}$) [44] de la observada en este trabajo para los tripomastigotes de la misma cepa (8.12 $\mu\text{m/s}$). Esta diferencia pudiese deberse a los arreglos experimentales empleados en cada trabajo, siendo un arreglo casi bidimensional para el primero, pero un arreglo tridimensional para el análisis en este trabajo; así mismo, pudiese indicar un comportamiento dependiente del estadio de estudio del parásito.

Ya se ha reportado también el valor de λ derivado del análisis de MSD para el nado libre de parásitos en ausencia de células, siendo éste superior a 1.4 tanto para epimastigotes [44] como para tripomastigotes [42, 43]. Estos resultados indican, que sin importar la cepa o el estadio en que se estudió al parásito, estos se mueven en un régimen superdifusivo. Por el contrario, en este trabajo se obtuvo un valor de λ de 1, para el seguimiento del nado libre de tripomastigotes de la cepa CL Brener, también en ausencia de células (grupo control), lo cual indica, que estos parásitos presentan un mayor grado de confinamiento que aquellos parásitos empleados en los trabajos mencionados anteriormente [42–44]. Las diferencias en estos valores de λ pudiesen estar relacionados con las condiciones experimentales utilizadas. Al contrario de los trabajos previos, en donde se hizo uso de arreglos casi bidimensionales, en este trabajo se utilizaron cámaras de 2,000 μm de altura, lo cual es 3 órdenes de magnitud mayor que el grosor promedio del parásito, además, los videos empleados en este trabajo siempre fueron grabados en el centro de la cámara. Estas condiciones experimentales permiten dejar de lado las posibles interacciones hidrodinámicas con las superficies, las cuales pueden llevar a un atrapamiento hidrodinámico cerca de dichas superficies, lo cual se ha demostrado que modifica el comportamiento mótil de microorganismos [33].

Una vez que se introdujeron las células a los experimentos (grupo experimental), los tripomastigotes exhibieron cambios en su comportamiento mótil, comparado con aquellos utilizados en condiciones control. Estos cambios se presentaron como un incremento en su

rapidez promedio, una reducción de su valor λ (indicando un confinamiento aún mayor que para los del grupo control), así como una alta preferencia de situarse cerca de las células. Estos resultados son consistentes con la posibilidad de que los tripomastigotes son capaces de sentir las células de mamífero y en consecuencia, modificar su comportamiento mótil, posiblemente con la intención de prepararlos para llevar acabo la infección a la célula hospedera. Diversos microorganismos tienen la capacidad de sensor el ambiente del hospedero, lo cual detona cascadas, tanto de señalización como moleculares, las cuales aseguran una infección eficiente, y así asegurar su supervivencia [45–48]. Además de su función en la motilidad, el flagelo de tripanosomátidos puede servir como un orgánulo sensorial que puede regular su virulencia, comunicación célula-célula, además de otros procesos [49–54]. De hecho, se ha propuesto que es el microambiente el que determina en que dirección bate el flagelo de *T. brucei* y por tanto, la trayectoria que sigue dicho parásito [17]. Con esto en mente, se llevaron a cabo los ensayos de infección para medir las correspondientes eficiencias de invasión y el número de amastigotes por célula. A partir de aquí se observó que la eficiencia de invasión cambia de célula a célula mostrando una correlación positiva con los incrementos en la rapidez promedio de los parásitos, así como una correlación negativa con sus valores de λ ; mostrando además, el mismo número promedio de amastigotes intracelulares en la mayoría de los casos. Es bien sabido que *T. cruzi* es capaz de infectar un amplio rango de células sin una capacidad fagocítica, tanto en condiciones *in vitro* [24, 25, 27, 28, 55, 56] como *in vivo* [57–60]. A pesar de que en el hospedero vertebrado, el parásito es capaz de invadir células somáticas en un amplio rango de tejidos celulares, la patología ocurre primordialmente en corazón y en el sistema digestivo [61], siendo este último asociado con un deterioro grave del sistema nervioso entérico [62]. Del mismo modo, se ha observado como diferentes cepas del parásito infectan diversas células con una eficiencia variable [61], esto debido a su diversidad genética y fenotípica intraespecífica, la cual les proporciona diferentes propiedades biológicas y moleculares [63]. En este contexto, es de esperar que *T. cruzi* sienta las diferentes señales

provenientes de tejidos del hospedero, así como estos otros diferentes microambientes, respondiendo en consecuencia de manera diferente, no solo en cuanto a su comportamiento mótil, sino también en la activación de moléculas y redes de señalización que conlleven a su desarrollo intracelular y por tanto a su supervivencia. Por tanto, el análisis de la motilidad e infección de los tripomastigotes de *T. cruzi* que se reportan aquí pueden servir como una plataforma para futuras investigaciones a nivel celular [20,21] o genéticas [18,44,64] para identificar el rol de la motilidad del parásito en su proceso de infección, lo cual más allá de resultar interesante podría tener grandes implicaciones a nivel biomédico.

Además, en este trabajo se realizaron las cinéticas de infección en cultivos *in vitro* de diferentes líneas celulares de mamífero utilizando tripomastigotes de *T. cruzi*, cepa CL Brener. La variabilidad de los resultados obtenidos llamó la atención desde un principio. Curiosamente, el progreso de la infección es considerablemente más lento en las células 3T3 S que en las 3T3 NIH, a pesar de que ambas líneas son de fibroblastos. Mientras que la totalidad de las células 3T3 NH se encuentran infectadas alrededor del día 15, solo cerca de una tercera parte de las células 3T3 S se encuentran infectadas hasta los 18 días, es decir, hasta el final del experimento. Esta diferencia en el comportamiento infectivo de los tripomastigotes de *T. cruzi* ha sido previamente reportado, indicando que el desempeño en la infección puede cambiar, no solo en función de la cepa del parásito utilizada, sino también acorde a la línea celular en cuestión [65,66]. Resulta también interesante el hecho de que las células Caco2 son bastante difíciles de ser infectadas (cerca del 10 % de células infectadas hasta el final de las cinéticas, es decir, a los 18 días), a pesar de ser células derivadas de colón, el cual es uno de los principales órganos infectados por la cepa CL Brener [4]. El hecho de que estas células presenten un origen de adenocarcinoma colorrectal pudiese ser la razón de este comportamiento, el cual ha sido previamente reportado [28]. Por su parte, los tripomastigotes que infectaron las células H9c2(2-1) denotaron un desempeño bastante notable incluso a pocas horas de iniciada la infección, siendo esta línea un gran ejemplo de como tanto la infección indirecta de las células susceptibles por contacto con las infectadas

es un mecanismo importante en la infección.

Aunque no fue posible demostrar una relación causa - efecto a partir del análisis de correlación, la noción de que un mecanismo relacionado a la replicación celular pueda influir en gran medida los parámetros en la dinámica de infección, es bastante sugerente. Bajo este supuesto, eso explicaría por ejemplo, la baja eficiencia de invasión de los tripomastigotes a infectar las células Caco2, ya que, dado su origen de adenocarcinoma colorrectal, estas exhibieron una alta tasa de replicación celular. Si esto pudiese ser comprobado, podría tener potenciales implicaciones biomédicas.

4.1. Perspectivas

Algunos de los proyectos que se pudiesen plantear, derivados de los resultados mostrados en esta tesis, serían los siguientes:

- Primeramente, averiguar si en efecto, la tasa de replicación celular (r_S) juega un papel importante en el desarrollo de las cinéticas de infección. Para ello se sugiere estudiar el uso de inhibidores de la replicación celular y su efecto en las curvas de cinética de infección.
- Se ha demostrado el comportamiento mótil del parásito se ve influenciado por la célula con la que interactúa. Sin embargo, valdría la pena explorar, sobre estas mismas cuatro líneas celulares, si existe algún efecto de quimiotaxis mediante la implementación de ensayos de motilidad, pero contemplando todas las líneas celulares en el mismo arreglo experimental, aunque aisladas de manera independiente.
- Las condiciones de trabajo en las cinéticas de infección planteadas en esta tesis parten de cultivos al 50 % de confluencia. En condiciones *in vivo*, los cultivos se presentan con un 100 % de confluencia. De modo que, a fin de reflejar una realidad

biológica más apegada a la realidad, valdría la pena repetir estos experimentos, tanto de motilidad como de infección, bajo cultivos ya con el 100% de confluencia.

- Como se mencionó en los antecedentes, se ha demostrado que factores que inhiben la motilidad del parásito, también repercuten en el desarrollo de su infección [20, 21]. Dicho esto, se recomendaría estudiar los cambios, tanto en comportamiento mótil como infectivo, de tripomastigotes modificados bajo alguna de estas condiciones, o incluso en las mencionadas por Sosa y colaboradores [44] y contrastar con los resultados aquí presentados.

Bibliografía

1. Pereira PC, Navarro E. Challenges and perspectives of Chagas disease: a review. *Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases*. 2013;19(1):34.
2. de Ayala Balzola AP, Pérez-Molina JA, Beltrá MN, López-Vélez R. Enfermedad de Chagas en personas procedentes de Latinoamérica residentes en España. Ministerio de Sanidad y Política Social; 2009. 1.
3. Andrade LO, Andrews NW. The *Trypanosoma cruzi*–host-cell interplay: location, invasion, retention. *Nature Reviews Microbiology*. 2005 Sep;3(10):819–823. Available from: <https://doi.org/10.1038/nrmicro1249>.
4. Zingales B, Miles MA, Campbell DA, Tibayrenc M, Macedo AM, Teixeira MMG, et al. The revised *Trypanosoma cruzi* subspecific nomenclature: Rationale, epidemiological relevance and research applications. *Infection, Genetics and Evolution*. 2012 Mar;12(2):240–253. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2011.12.009>.
5. Luquetti AO, Miles MA, Rassi A, Rezende JMD, Souza AAD, Póvoa MM, et al. *Trypanosoma cruzi*: zymodemes associated with acute and chronic Chagas' disease in central Brazil. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 1986 Jan;80(3):462–470. Available from: [https://doi.org/10.1016/0035-9203\(86\)90347-0](https://doi.org/10.1016/0035-9203(86)90347-0).

6. Freitas JM, Lages-Silva E, Crema E, Pena SDJ, Macedo AM. Real time PCR strategy for the identification of major lineages of *Trypanosoma cruzi* directly in chronically infected human tissues. *International Journal for Parasitology*. 2005 Apr;35(4):411–417. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2004.10.023>.
7. Lages-Silva E, Ramirez LE, Pedrosa AL, Crema E, da Cunha Galvao LM, Pena SDJ, et al. Variability of Kinetoplast DNA Gene Signatures of *Trypanosoma cruzi* II Strains from Patients with Different Clinical Forms of Chagas' Disease in Brazil. *Journal of Clinical Microbiology*. 2006 Jun;44(6):2167–2171. Available from: <https://doi.org/10.1128/jcm.02124-05>.
8. Burgos JM, Begher S, Bisio M, Levin MJ, Silva H MV, Schijman AG, et al. Molecular Identification of *Trypanosoma cruzi* I Tropism for Central Nervous System in Chagas Reactivation Due to AIDS. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 2008 Feb;78(2):294–297. Available from: <https://doi.org/10.4269/ajtmh.2008.78.294>.
9. del Puerto R, Nishizawa JE, Kikuchi M, Iihoshi N, Roca Y, Avilas C, et al. Lineage Analysis of Circulating *Trypanosoma cruzi* Parasites and Their Association with Clinical Forms of Chagas Disease in Bolivia. *PLoS Neglected Tropical Diseases*. 2010 May;4(5):e687. Available from: <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0000687>.
10. Kohl L, Bastin P. The Flagellum of Trypanosomes. In: *International Review of Cytology*. Elsevier; 2005. p. 227–285. Available from: [https://doi.org/10.1016/s0074-7696\(05\)44006-1](https://doi.org/10.1016/s0074-7696(05)44006-1).
11. Sibley LD, Andrews NW. Cell Invasion by Un-Palatable Parasites. *Traffic*. 2000 Feb;1(2):100–106.

12. Kohl L. Novel roles for the flagellum in cell morphogenesis and cytokinesis of trypanosomes. *The EMBO Journal*. 2003 Oct;22(20):5336–5346.
13. Langousis G, Hill KL. Motility and more: the flagellum of *Trypanosoma brucei*. *Nature Reviews Microbiology*. 2014 Jun;12(7):505–518.
14. Engstler M, Pfohl T, Herminghaus S, Boshart M, Wiegertjes G, Heddergott N, et al. Hydrodynamic Flow-Mediated Protein Sorting on the Cell Surface of Trypanosomes. *Cell*. 2007 Nov;131(3):505–515. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.08.046>.
15. Forestier CL, Machu C, Loussert C, Pescher P, Späth GF. Imaging Host Cell-Leishmania Interaction Dynamics Implicates Parasite Motility, Lysosome Recruitment, and Host Cell Wounding in the Infection Process. *Cell Host & Microbe*. 2011 Apr;9(4):319–330. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.chom.2011.03.011>.
16. Krüger T, Engstler M. Flagellar motility in eukaryotic human parasites. *Seminars in Cell & Developmental Biology*. 2015 Oct;46:113–127. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2015.10.034>.
17. Bargul JL, Jung J, McOdimba FA, Omogo CO, Adung'a VO, Krüger T, et al. Species-Specific Adaptations of Trypanosome Morphology and Motility to the Mammalian Host. *PLOS Pathogens*. 2016 Feb;12(2):e1005448. Available from: <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005448>.
18. Beneke T, Demay F, Hookway E, Ashman N, Jeffery H, Smith J, et al. Genetic dissection of a Leishmania flagellar proteome demonstrates requirement for directional motility in sand fly infections. *PLOS Pathogens*. 2019 Jun;15(6):e1007828. Available from: <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1007828>.

19. Lentini G, Pacheco NDS, Burleigh BA. Targeting host mitochondria: A role for the *Trypanosoma cruzi* amastigote flagellum. Cellular Microbiology. 2017 Nov;20(2):e12807. Available from: <https://doi.org/10.1111/cmi.12807>.
20. Johnson CA, Rachakonda G, Kleshchenko YY, Nde PN, Madison MN, Pratap S, et al. Cellular Response to *Trypanosoma cruzi* Infection Induces Secretion of Defensin α -1, Which Damages the Flagellum, Neutralizes Trypanosome Motility, and Inhibits Infection. Infection and Immunity. 2013 Aug;81(11):4139–4148.
21. Finkelsztejn EJ, Diaz-Soto JC, Vargas-Zambrano JC, Suesca E, Guzmán F, López MC, et al. Altering the motility of *Trypanosoma cruzi* with rabbit polyclonal anti-peptide antibodies reduces infection to susceptible mammalian cells. Experimental Parasitology. 2015 Mar;150:36–43.
22. Ballesteros-Rodea G, Santillán M, Martínez-Calvillo S, Manning-Cela R. Flagellar Motility of *Trypanosoma cruzi* Epimastigotes. Journal of Biomedicine and Biotechnology. 2012;2012:1–9. Available from: <https://doi.org/10.1155/2012/520380>.
23. Bice DE, Zeledon R. Comparison of Infectivity of Strains of *Trypanosoma cruzi* (Chagas, 1909). The Journal of Parasitology. 1970 Aug;56(4):663.
24. Florencio-Martínez L, Márquez-Dueñas C, Ballesteros-Rodea G, Martínez-Calvillo S, Manning-Cela R. Cellular analysis of host cell infection by different developmental stages of *Trypanosoma cruzi*. Experimental Parasitology. 2010 Nov;126(3):332–336.
25. Burleigh BA, Woolsey AM. Cell signalling and *Trypanosoma cruzi* invasion. Cellular Microbiology. 2002 Nov;4(11):701–711.
26. del Angel JAA. Efecto de la interacción célula - parásito en la motilidad del Tripomastigote sanguíneo de *Trypanosoma cruzi*. Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional (CINVESTAV-IPN). Unidad

- Monterrey. Via del Conocimiento 201 C.P. 66628, Parque PIIT, 66600 Cd Apodaca, N.L.; 2016. Tesis de maestría.
27. Moraes KC, Diniz LF, Bahia MT. Role of cyclooxygenase-2 in *Trypanosoma cruzi* survival in the early stages of parasite host-cell interaction. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. 2015 Apr;110(2):181–191.
28. Martello LA, Wadgaonkar R, Gupta R, Machado FS, Walsh MG, Mascareno E, et al. Characterization of *Trypanosoma cruzi* infectivity, proliferation, and cytokine patterns in gut and pancreatic epithelial cells maintained in vitro. *Parasitology Research*. 2013 Sep;112(12):4177–4183.
29. Witek P, Korga A, Burdan F, Ostrowska M, Nosowska B, Iwan M, et al. The effect of a number of H9C2 rat cardiomyocytes passage on repeatability of cytotoxicity study results. *Cytotechnology*. 2016 Mar;68(6):2407–2415. Available from: <https://doi.org/10.1007/s10616-016-9957-2>.
30. Zingales B, Pereira MES, Oliveira RP, Almeida KA, Umezawa ES, Souto RP, et al. *Trypanosoma cruzi* genome project: biological characteristics and molecular typing of clone CL Brener. *Acta Tropica*. 1997 Nov;68(2):159–173. Available from: [https://doi.org/10.1016/s0001-706x\(97\)00088-0](https://doi.org/10.1016/s0001-706x(97)00088-0).
31. Manning-Cela R, Cortes A, Gonzalez-Rey E, Voorhis WCV, Swindle J, Gonzalez A. LYT1 Protein Is Required for Efficient In Vitro Infection by *Trypanosoma cruzi*. *Infection and Immunity*. 2001 Jun;69(6):3916–3923.
32. Halldorsson S, Lucumi E, Gómez-Sjöberg R, Fleming RMT. Advantages and challenges of microfluidic cell culture in polydimethylsiloxane devices. *Biosensors and Bioelectronics*. 2015 Jan;63:218–231. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.bios.2014.07.029>.

33. Lauga E, DiLuzio WR, Whitesides GM, Stone HA. Swimming in Circles: Motion of Bacteria near Solid Boundaries. *Biophysical Journal*. 2006 Jan;90(2):400–412. Available from: <https://doi.org/10.1529/biophysj.105.069401>.
34. Kermack WO, McKendrick AG. Contributions to the mathematical theory of epidemics—I. *Bulletin of Mathematical Biology*. 1991;53(1-2):33–55.
35. Berg HC, Dyson F. Random Walks in Biology. *Physics Today*. 1987 Mar;40(3):73–74. Available from: <https://doi.org/10.1063/1.2819954>.
36. Hescheler J, Meyer R, Plant S, Krautwurst D, Rosenthal W, Schultz G. Morphological, biochemical, and electrophysiological characterization of a clonal cell (H9c2) line from rat heart. *Circulation Research*. 1991 Dec;69(6):1476–1486. Available from: <https://doi.org/10.1161/01.res.69.6.1476>.
37. Caradonna KL, Engel JC, Jacobi D, Lee CH, Burleigh BA. Host Metabolism Regulates Intracellular Growth of *Trypanosoma cruzi*. *Cell Host & Microbe*. 2013 Jan;13(1):108–117.
38. González-Chávez Z, Vázquez C, Mejia-Tlachi M, Márquez-Dueñas C, Manning-Cela R, Encalada R, et al. Gamma-glutamylcysteine synthetase and tryparedoxin 1 exert high control on the antioxidant system in *Trypanosoma cruzi* contributing to drug resistance and infectivity. *Redox Biology*. 2019 Sep;26:101231.
39. Colin F, Heikki H, Andrés CJ. Inverse problems. In: *Bayesian Theory and Applications*. Oxford University Press; 2013. p. 619–643.
40. Christen JA, Fox C. A general purpose sampling algorithm for continuous distributions (the t-walk). *Bayesian Analysis*. 2010;5(2):263–281.

41. Sibona GJ, Condat CA, Isasi SC. Dynamics of the antibody-*T.cruzi* competition during Chagas infection: Prognostic relevance of intracellular replication. *Physical Review E*. 2005;71(2).
42. Uppaluri S, Nagler J, Stellamanns E, Heddergott N, Herminghaus S, Engstler M, et al. Impact of Microscopic Motility on the Swimming Behavior of Parasites: Straighter Trypanosomes are More Directional. *PLoS Computational Biology*. 2011 Jun;7(6):e1002058. Available from: <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1002058>.
43. Alves LGA, Scariot DB, Guimarães RR, Nakamura CV, Mendes RS, Ribeiro HV. Transient Superdiffusion and Long-Range Correlations in the Motility Patterns of Trypanosomatid Flagellate Protozoa. *PLOS ONE*. 2016 Mar;11(3):e0152092. Available from: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0152092>.
44. Sosa-Hernández E, Ballesteros-Rodea G, del Angel JAA, Dévora-Canales D, Manning-Cela RG, Santana-Solano J, et al. Experimental and Mathematical-Modeling Characterization of *Trypanosoma cruzi* Epimastigote Motility. *PLOS ONE*. 2015 Nov;10(11):e0142478.
45. Zuzarte-Luís V, Mota MM. Parasite Sensing of Host Nutrients and Environmental Cues. *Cell Host & Microbe*. 2018 Jun;23(6):749–758. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.chom.2018.05.018>.
46. Bisio H, Soldati-Favre D. Signaling Cascades Governing Entry into and Exit from Host Cells by *Toxoplasma gondii*. *Annual Review of Microbiology*. 2019 Sep;73(1):579–599. Available from: <https://doi.org/10.1146/annurev-micro-020518-120235>.
47. Jenul C, Horswill AR. Regulation of *Staphylococcus aureus* Virulence. *Microbiology Spectrum*. 2018 Feb;6(1). Available from: <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.gpp3-0031-2018>.

48. Mancio-Silva L, Slavic K, Ruivo MTG, Grosso AR, Modrzynska KK, Vera IM, et al. Nutrient sensing modulates malaria parasite virulence. *Nature*. 2017 Jul;547(7662):213–216. Available from: <https://doi.org/10.1038/nature23009>.
49. Oberholzer M, Langousis G, Nguyen HT, Saada EA, Shimogawa MM, Jonsson ZO, et al. Independent Analysis of the Flagellum Surface and Matrix Proteomes Provides Insight into Flagellum Signaling in Mammalian-infectious *Trypanosoma brucei*. *Molecular & Cellular Proteomics*. 2011 Jun;10(10):M111.010538. Available from: <https://doi.org/10.1074/mcp.m111.010538>.
50. Saada EA, Kabututu ZP, Lopez M, Shimogawa MM, Langousis G, Oberholzer M, et al. Insect Stage-Specific Receptor Adenylate Cyclases Are Localized to Distinct Subdomains of the *Trypanosoma brucei* Flagellar Membrane. *Eukaryotic Cell*. 2014 May;13(8):1064–1076. Available from: <https://doi.org/10.1128/ec.00019-14>.
51. Lopez MA, Saada EA, Hill KL. Insect Stage-Specific Adenylate Cyclases Regulate Social Motility in African Trypanosomes. *Eukaryotic Cell*. 2014 Nov;14(1):104–112. Available from: <https://doi.org/10.1128/ec.00217-14>.
52. Imhof S, Fragoso C, Hemphill A, von Schubert C, Li D, Legant W, et al. Flagellar membrane fusion and protein exchange in trypanosomes; a new form of cell-cell communication? *F1000Research*. 2016 Apr;5:682. Available from: <https://doi.org/10.12688/f1000research.8249.1>.
53. Maric D, Epting CL, Engman DM. Composition and sensory function of the trypanosome flagellar membrane. *Current Opinion in Microbiology*. 2010 Aug;13(4):466–472. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.mib.2010.06.001>.
54. Rodriguez-Contreras D, Aslan H, Feng X, Tran K, Yates PA, Kamhawi S, et al. Regulation and biological function of a flagellar glucose transporter in *Leishmania*

- mexicana*: a potential glucose sensor. The FASEB Journal. 2014 Oct;29(1):11–24. Available from: <https://doi.org/10.1096/fj.14-251991>.
55. Nakajima-Shimada J, Hirota Y, Aoki T. Inhibition of *Trypanosoma cruzi* growth in mammalian cells by purine and pyrimidine analogs. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 1996 Nov;40(11):2455–2458. Available from: <https://doi.org/10.1128/aac.40.11.2455>.
56. Wilkowsky SE, Barbieri MA, Stahl P, Isola ELD. *Trypanosoma cruzi*: Phosphatidylinositol 3-Kinase and Protein Kinase B Activation Is Associated with Parasite Invasion. Experimental Cell Research. 2001 Apr;264(2):211–218. Available from: <https://doi.org/10.1006/excr.2000.5123>.
57. dos Santos DS, de Albuquerque JB, Guerra B, Moreira OC, Berbert LR, Ramos MT, et al. Unraveling Chagas disease transmission through the oral route: Gateways to *Trypanosoma cruzi* infection and target tissues. PLOS Neglected Tropical Diseases. 2017 Apr;11(4):e0005507. Available from: <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0005507>.
58. Taylor MC, Francisco AF, Jayawardhana S, Mann GS, Ward AI, Olmo F, et al. Exploiting Genetically Modified Dual-Reporter Strains to Monitor Experimental *Trypanosoma cruzi* Infections and Host-Parasite Interactions. In: Methods in Molecular Biology. Springer New York; 2019. p. 147–163. Available from: https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9148-8_11.
59. Santi-Rocca J, Gironès N, Fresno M. Multi-Parametric Evaluation of *Trypanosoma cruzi* Infection Outcome in Animal Models. In: Methods in Molecular Biology. Springer New York; 2019. p. 187–202. Available from: https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9148-8_14.

60. Pereira SS, Trindade S, Niz MD, Figueiredo LM. Tissue tropism in parasitic diseases. *Open Biology*. 2019 May;9(5):190036. Available from: <https://doi.org/10.1098/rsob.190036>.
61. Melo RC, Brener Z. Tissue Tropism of Different *Trypanosoma cruzi* Strains. *The Journal of Parasitology*. 1978 Jun;64(3):475. Available from: <https://doi.org/10.2307/3279787>.
62. Matsuda NM, Miller SM, Evora PRB. The chronic gastrointestinal manifestations of Chagas disease. *Clinics*. 2009;64(12):1219–1224. Available from: <https://doi.org/10.1590/s1807-59322009001200013>.
63. Zingales B. *Trypanosoma cruzi* genetic diversity: Something new for something known about Chagas disease manifestations, serodiagnosis and drug sensitivity. *Acta Tropica*. 2018 Aug;184:38–52. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2017.09.017>.
64. Rotureau B, Ooi CP, Huet D, Perrot S, Bastin P. Forward motility is essential for trypanosome infection in the tsetse fly. *Cellular Microbiology*. 2013 Nov;16(3):425–433. Available from: <https://doi.org/10.1111/cmi.12230>.
65. Vargas-Zambrano JC, Lasso P, Cuellar A, Puerta CJ, González JM. A human astrocytoma cell line is highly susceptible to infection with *Trypanosoma cruzi*. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. 2013 Apr;108(2):212–219. Available from: <https://doi.org/10.1590/0074-0276108022013014>.
66. Bertelli MSM, Brener Z. Infection of Tissue Culture Cells with Bloodstream Trypomastigotes of *Trypanosoma cruzi*. *The Journal of Parasitology*. 1980 Dec;66(6):992. Available from: <https://doi.org/10.2307/3280403>.

.1. Dinámica con retardo de las células infectadas

Considérese una población de células de mamífero que son infectadas a diferentes tiempos. Sea a el tiempo desde que una célula es infectada. Por simplicidad, podría decirse que a es la edad de una célula infectada. La estructura de edad de esta población puede ser representada por $i(t, a)da$, la cual representa el número de células que tienen una edad en el rango $[a, a + da]$ al tiempo t . El tiempo de evolución de $i(t, a)$ está gobernado por la siguiente ecuación diferencial parcial:

$$\frac{\partial i}{\partial t} = -\frac{\partial i}{\partial a} + \mu(t)i.$$

El primer término a mano derecha de esta ecuación contabiliza como disminuye la variable i debido al envejecimiento de las células, mientras que el segundo término representa la proliferación celular. Si se toma en cuenta que a no es independiente de t sino que sigue una relación de la forma $a = t - t_0$, siendo t_0 el tiempo de infección, entonces: $\partial i / \partial t + \partial i / \partial a = di / dt$, lo cual conlleva a la siguiente ecuación diferencial:

$$\frac{di}{dt} = \mu(t)i.$$

De acuerdo con el método de características, la solución de dicha ecuación diferencial es:

$$i(t, a(t)) = i(t_0, a(t_0)) \exp \left(\int_{t_0}^t \mu(t') dt' \right).$$

Haciendo el cambio $a = t - t_0$, la expresión anterior puede ser reescrita como:

$$i(t, a) = \sigma(t - a) \exp \left(\int_{t-a}^t \mu(t') dt' \right),$$

donde $\sigma(t) = i(t, 0)$ corresponde al flujo de entrada debido a las nuevas células infectadas al tiempo t . Considérese $I(t) = \int_0^\tau i(t, a)da$ como el número total de células infectadas al tiempo t (τ es el tiempo al cual una célula infectada completa su maduración y es lisada, liberando así una gran cantidad de nuevos parásitos al medio). Al sustituir en la ecuación

anterior esto permite cambiar la integral del eje de la edad al del tiempo de la siguiente manera (véase Fig 1):

$$I(t) = \int_{t-\tau}^t \sigma(t') \exp \left(\int_{t'}^t \mu(t'') dt'' \right) dt'.$$

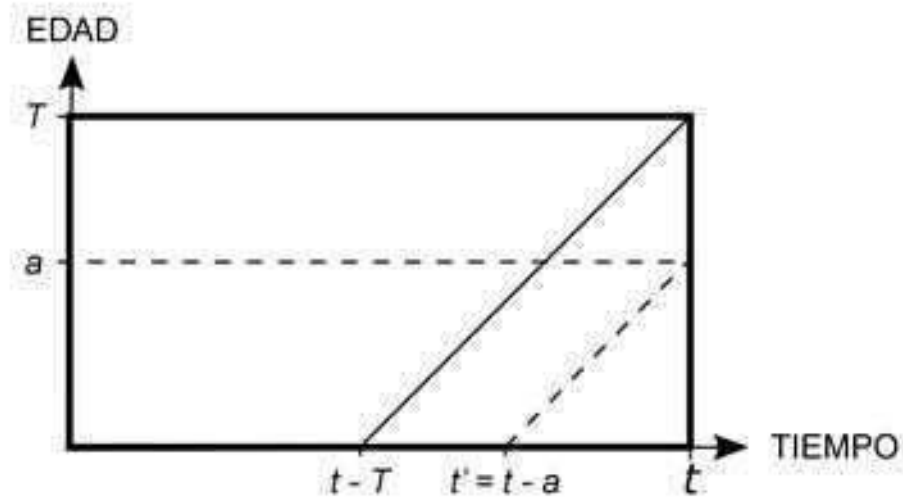


Figura 1. Esquema representativo de la estructura por edad para las células infectadas.

τ representa la edad a la cual las células infectadas son lisadas y liberan los parásitos incubados en su interior hacia el medio. Las líneas inclinadas son las características de la ecuación diferencial parcial que rige la dinámica del sistema e indican cómo la solución en cualquier punto (t, a) puede ser rastreada al eje $a = 0$.

Si ahora derivamos $I(t)$ con respecto al tiempo

$$\frac{dI}{dt} = \frac{d}{dt} \int_{t-\tau}^t \sigma(t') \exp \left(\int_{t'}^t \mu(t'') dt'' \right) dt'.$$

Haciendo uso del teorema fundamental del cálculo se puede obtener:

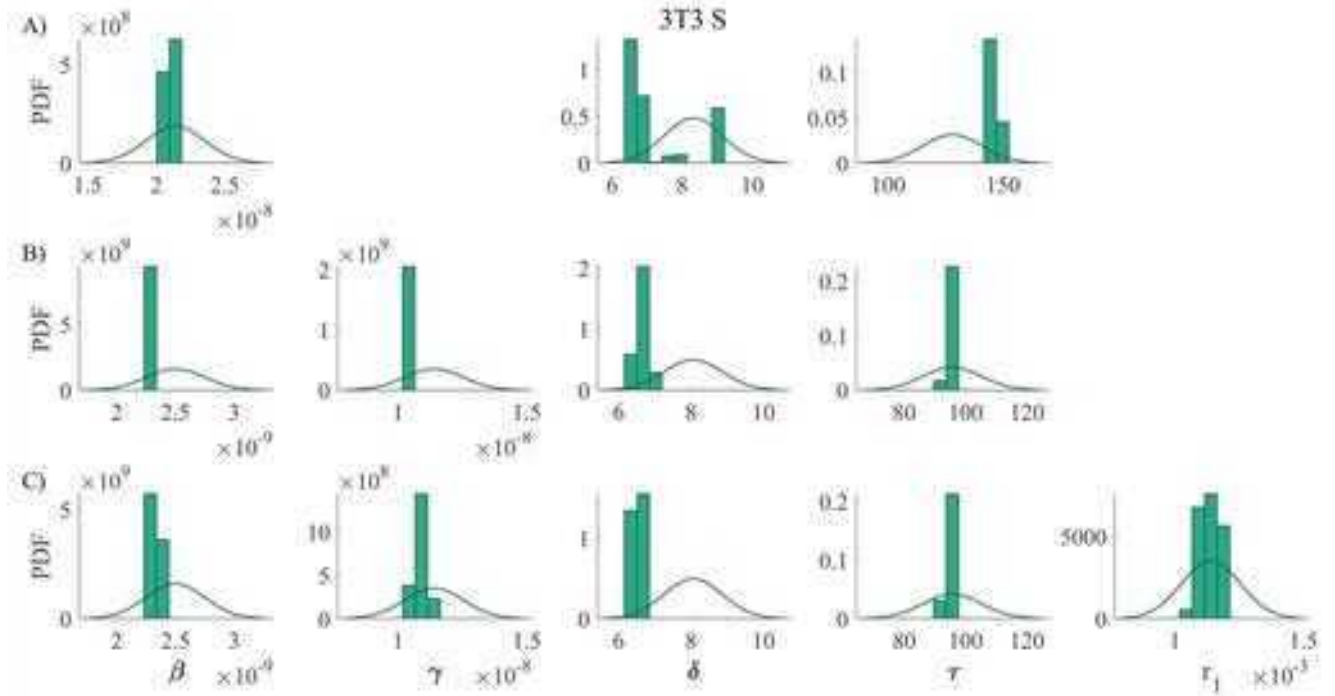
$$\frac{dI}{dt} = \mu(t)I + \sigma(t) - \sigma(t - \tau) \exp \left(\int_{t-\tau}^t \mu(t') dt' \right).$$

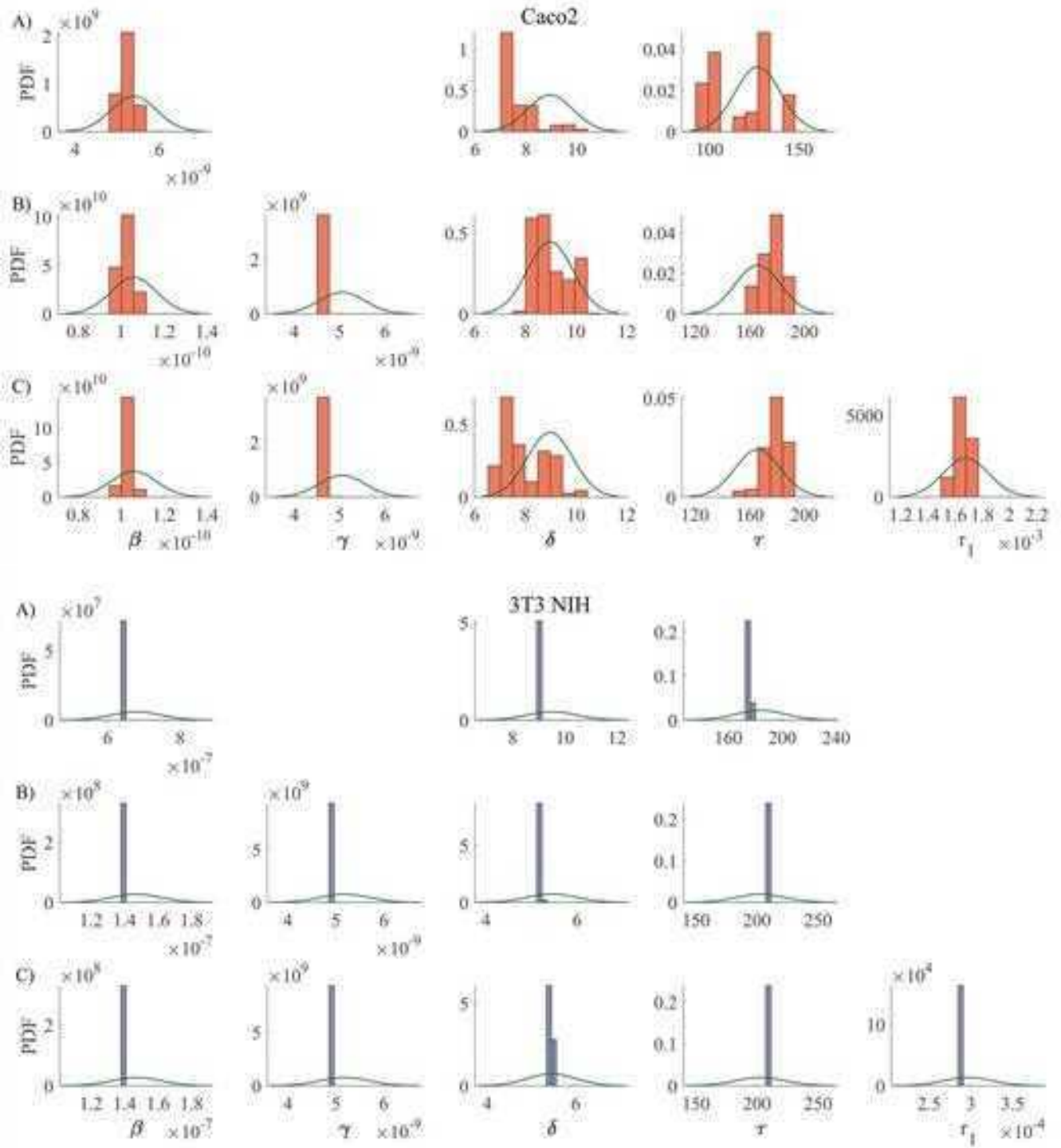
Esta última ecuación puede ser interpretada como una ecuación balanceada. La tasa de cambio de las células infectadas viene dada por la aparición de nuevas células debido a

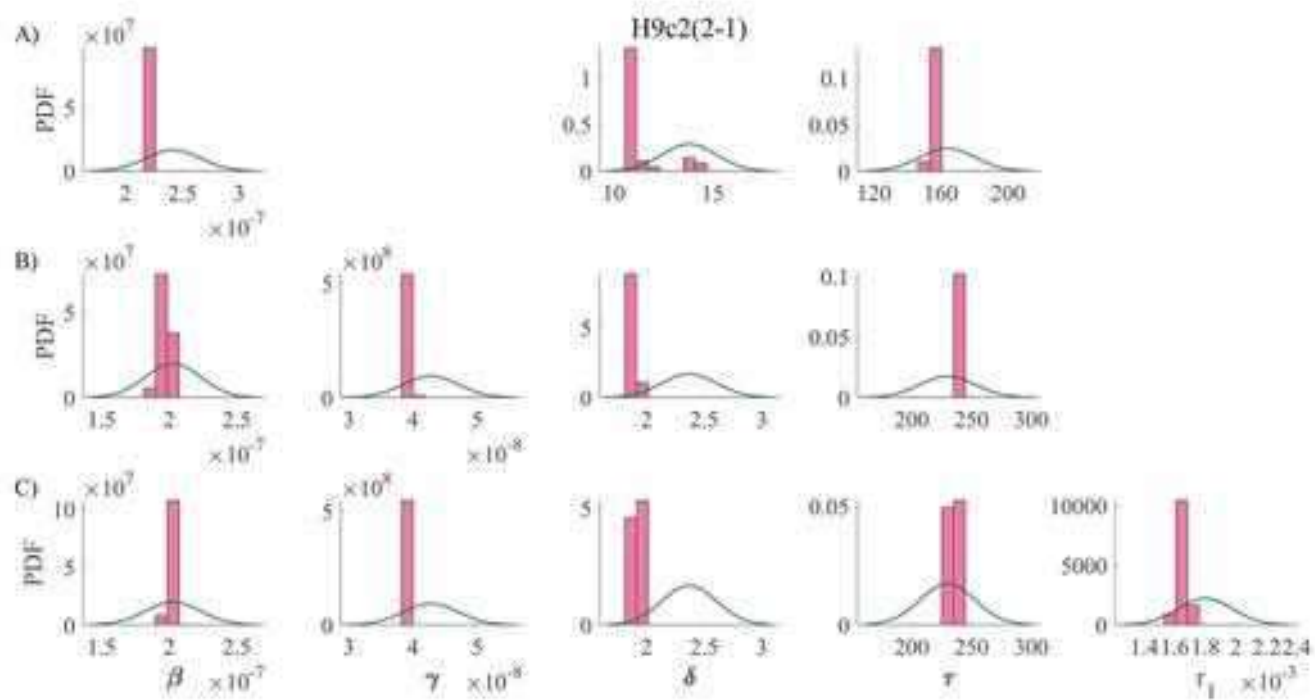
la proliferación, más el flujo de células recién infectadas, menos el flujo de células que se someten a lisis (el cual es igual el flujo de nuevas células infectadas para el tiempo $t - \tau$, multiplicado por un término exponencial que contabiliza la proliferación de las células infectadas en el intervalo $[t - \tau, t]$).

.2. Distribuciones *a priori* y *a posteriori*

Las distribuciones *a priori* se denotan por las líneas verdes sólidas, mientras que los histogramas corresponden a las distribuciones *a posteriori*. Las diferentes versiones del modelo están etiquetadas como: A), B) y C) para la versión más simple, la versión intermedia y la versión más completa respectivamente.







El jurado designado por la **Unidad Monterrey**, del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, aprueba la tesis:

Patrones de motilidad y dinámica de infección de tripomastigotes de Trypanosoma cruzi en presencia de diferentes líneas celulares de mamífero

Que presenta el M.C. **Jorge Adrián Arias del Angel** para su examen final de **Doctorado en Ciencias en Ingeniería y Física Biomédicas**, el día 29 de enero de 2021.

Dr. Moisés Santillán Zerón

Dra. Rebeca Georgina Manning Cela

Dr. Bruno Alfonso Escalante Acosta

Dr. Jesús Manuel Santana Solano

Dra. Roxana Guadalupe Gutiérrez Vidal

Dr. Ramón Castañeda Priego