

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

Unidad Monterrey

Programa de Ingeniería y Física Biomédicas

**Efecto de la interacción célula - parásito en la
motilidad del Tripomastigote sanguíneo de
*Trypanosoma cruzi***

Tesis que presenta

Jorge Adrián Arias del Angel

para obtener el grado de

Maestro en Ciencias

con especialidad en

Ingeniería y Física Biomédicas

Director de Tesis:

Dr. Moisés Santillán Zerón

Asesora de Tesis:

Dra. Rebeca Georgina Manning Cela

A mi familia

II

Agradecimientos

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

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.

Al Dr. Santillán y a la Dra. Manning por su paciencia, asesorías y grandes consejos de como debo irme formando como investigador. Gracias por todo su afecto y paciencia al introducirme en el estudio de *T. cruzi*. Por compartir conmigo la emoción por la investigación y motivarme a seguir adelante con ella. .

Al Dr. Santana, por haberme sugerido estudiar la motilidad de *T. cruzi* para su curso de Ciencia de Imágenes. Sin él para empezar no habría elegido este proyecto.

A los profesores del CINVESTAV, Unidad Monterrey por compartir conmigo sus conocimientos.

A mis compañeros de laboratorio: Eduardo, David y Óscar por todo su apoyo y grandes consejos en la parte biológica, de análisis y de redacción de este trabajo.

Al laboratorio de la dra. Manning en la unidad Zacatenco y sus integrantes: Claudia, Tere, Maggie, Alberto, Gabriel, Daniel, Dxine, Anais, Israel y don Pete. Gracias por hacer de mi estancia con ustedes una experiencia tan enriquecedora, tanto profesional como personalmente.

A mis amigos de la unidad Monterrey: Diana Vargas, Rocío, Romina, Carlos, Fredy, Susana, Diana, Roberto, Wendy y Jorge. Por su gran amistad, por acompañarme a lo largo de estos dos años de gratas experiencias y grandes enseñanzas. Por compartir conmigo un poco de su tiempo y alegrar en gran medida este trayecto.

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	5
1.1. Enfermedad de Chagas	5
1.1.1. Características clínicas	6
Fase aguda	6
Fase crónica asintomática	7
Fase crónica sintomática	7
1.2. Vector	8
1.3. <i>Trypanosoma cruzi</i>	9
1.3.1. Morfología	9
1.3.2. Ciclo de vida	10
Hospedero vertebrado	10
Vector invertebrado	12
1.4. Estado Actual del Campo	13
1.5. Justificación	14
1.6. Hipótesis	14
1.7. Objetivos general	14
2. Metodología	15
2.1. Estructura general	15

<i>ÍNDICE GENERAL</i>	V
2.2. Líneas celulares	16
2.2.1. Medios de cultivo	16
2.2.2. Tripomastigotes	17
Epimastigotes	17
Infección primaria	18
Infección secundaria	19
2.3. Arreglo experimental	20
2.4. Análisis de los videos	21
2.4.1. Desplazamiento cuadrático medio	22
2.4.2. Mapas de Probabilidad	24
3. Resultados y discusión	25
3.1. Desplazamiento cuadrático medio	27
3.2. Mapas de probabilidad de residencia	32
4. Conclusiones y perspectivas	37
4.1. Conclusiones	37
4.2. Perspectivas	38
Bibliografía	40

Índice de figuras

1.1. a) El chagoma de inoculación [20] y en b) el signo de Romana [15].	7
1.2. Distribución geográfica de algunas de las especies pertenecientes a la subfamilia <i>Triatominae</i> . En rojo se resaltan las 5 especies más infectivas [19].	8
1.3. Morfología de los distintos estadios de <i>T. cruzi</i> : a) Epimastigote, b) Amastigote y c) Tripomastigote [17].	10
1.4. Ciclo difásico del <i>Tripanosoma cruzi</i> [18].	11
2.1. Estrategia general del protocolo experimental.	15
3.1. Curvas de desplazamiento cuadrático medio para las partículas de los experimentos del grupo control. La nomenclatura es para identificar el experimento: Partículas control (PC) y el día del experimento (Lunes - L, Miércoles - M y Jueves - J).	25
3.2. Histograma de los valores de rapidez promedio de las trayectorias de un experimento del grupo de prueba.	26
3.3. (a) Curvas de desplazamiento cuadrático medio para los tripomastigotes en el grupo control y para los tripomastigotes del grupo de prueba (b:g) mostrados de menor a mayor confluencia.	29

3.4. Valores del factor de escalamiento λ para los tripomastigotes de todos los experimentos. La línea verde representa el valor λ promedio obtenido de los tres experimentos control, mientras que la región sombreada en verde el intervalo de confianza al 95 % ($2\sigma^2$). Los puntos rojos y azules indican los valores de λ de los tripomastigotes por experimento individual para las líneas HFF1 y 3T3 NIH respectivamente. 31

3.5. Mapas de probabilidad de los tripomastigotes. 34

3.6. Valores de la varianza σ^2 como función de la confluencia celular ζ para todos los experimentos en el estudio. La línea verde nuevamente representa el promedio de las varianzas para los experimentos del grupo control y la franja sombreada el intervalo del 95 % ($2\sigma^2$). Los puntos rojos corresponden a los resultados individuales de los experimentos con la línea HFF1, y los puntos azules a los realizados con la línea 3T3 NIH. 35

Resumen

Efecto de la interacción célula - parásito en la motilidad del Tripomastigote sanguíneo de *Trypanosoma cruzi*

Trypanosoma cruzi es un parásito flagelado que presenta un ciclo de vida difásico y es el responsable etiológico de la enfermedad de Chagas o Tripanosomiasis americana, la cual es una de las principales enfermedades tropicales del continente americano. Mas aún, hoy en día, debido a las altas tasas de migración de ciudadanos de países endémicos a no endémicos, como Estados Unidos, Canadá y España, esta enfermedad ha podido rebasar barreras geográficas, convirtiéndola en un problema de salud pública importante y de distribución mundial.

T. cruzi tiene cuatro estadios de desarrollo diferentes que se alternan entre el insecto vector (tripomastigote metacíclico y epimastigote) y el hospedero mamífero (amastigote y tripomastigote sanguíneo), en este último se desarrolla el ciclo intracelular del parásito, responsable de la patogenia de la enfermedad en el hombre. El inicio de la infección en el mamífero es llevada a cabo por el tripomastigote metacíclico, presente en las heces del triatomino, mientras que el establecimiento y diseminación de la infección en el mamífero y la infección del insecto vector, se lleva a cabo por el tripomastigote sanguíneo, razón por la cual se considera al tripomastigote como el estadio infectivo por excelencia de *T. cruzi*.

En los últimos años, el estudio de la motilidad de *T. cruzi*, ha sido de vital importancia para entender los mecanismos de infección, desplazamiento y reproducción de este parásito, procesos que le son esenciales para completar su ciclo de vida y causar la enfermedad. Para este fin se ha empleado la forma epimastigote, debido a que es el estadio del parásito que

es posible mantener en cultivo. El epimastigote es considerado un estadio no infectivo para el mamífero, pero existe evidencia experimental *in vitro*, que muestra que el epimastigote es capaz de desarrollar una infección productiva en fibroblastos en cultivo [5]. Esto podría tener relevancia biológica, ya que se ha observado que las heces del triatómino, además de tripomastigotes, también contienen epimastigotes.

En estos estudios, se ha determinado que la motilidad de los epimastigotes, se conduce en dirección longitudinal y que presenta dos modos de movimiento conocidos como tumbo y corrida [8], similar a lo observado en *T. brucei* [11]. También, se ha observado que el epimastigote se desplaza siguiendo un régimen superdifusivo y que presenta velocidades menores y un nado menos direccionado, en comparación al de otros protozoarios [1].

En el mamífero, se ha propuesto que durante el proceso de infección, el movimiento del tripomastigote es necesario para que el parásito alcance a la célula blanco, complete el ciclo intracelular de infección y se distribuya a los diferentes órganos del hospedero. Sin embargo no se conocen sus características de motilidad.

Es por ello que en este trabajo, se reporta el comportamiento motil de la forma tripomastigote de *T. cruzi* en presencia de dos diferentes líneas de fibroblastos, uno de ratón (3T3 NIH) y otro de humano (HFF1). Para esto, se estudió el desplazamiento cuadrático medio y mapas de probabilidad de residencia al variar la confluencia celular de los fibroblatos. Posteriormente se realizó la comparación de los resultados con los obtenidos a partir de un control y entre ellas.

De este estudio se obtuvieron resultados que sugieren que la motilidad del tripomastigote se ve afectada en presencia de fibroblastos. Presentando para todos los casos de estudio un movimiento subdifusivo, mostrando mayor probabilidad de encontrar al parásitos agrupado en regiones cuando interactúa con las células 3T3 NIH.

Abstract

Effect of cell - parasite interaction on the motility of *Trypanosoma cruzi* in its blood Trypomastigote stage

Trypanosoma cruzi is a flagellated protozoan with a biphasic life cycle and it is also the causative agent of Chagas' disease (American Trypanosomiasis) which is one of the most important tropical illness in America. Moreover, due the migration of citizens from endemic countries to non-endemic countries like United States, Canada and Spain, this illness has been presented in places where it did not do it before. Because of this, it has become a very important health problem around the world.

T. cruzi has four different development stages alternating between the insect vector (metacyclic trypomastigote and epimastigote) and the mammal host (amastigote and blood trypomastigote). Inside the last one the parasite develops its intracellular cycle, responsible for the pathogenesis of human disease. The beginning of the infection in the mammal host is carried out by the metacyclic trypomastigote, present in triatomine feces, while establishing and dissemination of the infection in the mammal host and the infection in the vector are carried out by the blood tripomastigote. Therefore, the tripomastigote is considered as the infective stage by excellence.

In the last years, the study of *T. cruzi*'s motility has been very important in order to understand its mechanisms of infection, displacement and reproduction, processes that are essential to complete its life cycle and development of the disease. The epimastigote stage is not considered as an infective stage in the mammal host, however there is experimental evidence *in vitro*, that shows that this stage is able to produce a productive infection

in fibroblast in culture [5], which could have a biological relevance, because it has been observed that both, trypomastigotes and epimastigotes, are present in the triatomine feces.

In 2015, Sosa and collaborators showed that the epimastigote swim along its longitudinal direction and they have also two motility modes named as tumble and persistent [8], as it happens in *T. brucei* [11]. It was also observed that the epimastigote stage used to swim in a superdiffusive range and it has lower values of speed and lower directional movement, compared to other [1].

In the mammal host, it has been proposed that during the infection process, the trypomastigote's movement is necessary for the parasite reaches the target cell, complet its intracellular cycle of infection and distributes to the different organs of the host. However, its motility characteristics are not known.

Therefore, in this thesis it is reported the mobile behaviour of *T. cruzi* in its trypomastigote stage while they interact with two fibroblast cell lines from two different species, mouse's embryo (3T3 NIH) and human's skin (HFF1). In order to achieve it, the mean square displacement and residence probability maps of the parasite once it is changed the cell confluency were studied. This parameters were compared considering each cell line separately and between them.

Our results suggest that the motility of the trypomastigote stage does change when they swim with at least two fibroblast cell lines. The trypomastigotes move in a subdiffusive range and it is very likely to find them grouped when they are in presence of 3T3 NIH fibroblast.

Capítulo 1

Introducción

La enfermedad de Chagas se considera una de las principales enfermedades tropicales en centro y Sudamérica. Además, en los últimos años se ha convertido en un gran problema de salud a nivel mundial debido a la alta propagación de su agente etiológico *T. cruzi*. La motilidad de este parásito ha despertando un gran interés, debido a que se piensa que ésta juega un papel importante en los procesos de infección, desplazamiento y reproducción del parásito.

1.1. Enfermedad de Chagas

La Enfermedad de Chagas o Tripanosomiasis Americana, es una enfermedad endémica del continente americano, la cual afecta entre 8 y 10 millones de personas y produce cerca de 10 mil muertes anuales. Además de que entre 25 y 40 millones de personas están en riesgo de contraer esta enfermedad [16].

Su existencia, causada por el protozoario *T. cruzi*, fue descubierta por el médico brasileño Carlos Chagas en el año de 1906 durante un proyecto de erradicación de Malaria en las Minas Gerais, Brasil.

Existen diversas formas de contraer esta enfermedad: 16 % de los casos es a través de transfusiones sanguíneas, el 3 % por vía transplacentaria y el 1 % por accidentes de laboratorio u oro/digestivos. Sin embargo, en el 80 % de los casos la transmisión es por medio de su vector natural conocido como **triatomino**.

1.1.1. Características clínicas

Esta enfermedad presenta una gran variedad de síntomas, los cuales dependenderán de la fase en la que se encuentre el paciente. Sus etapas se pueden dividir en dos fases: *la fase aguda y la fase crónica*.

Fase aguda

En caso de una transmisión vectorial, solo entre 1 - 2 % de los pacientes presentan síntomas. Dependiendo del sitio de entrada del parásito al organismo pueden presentarse dos en particular: si el parásito entra a través de la piel, producto de alguna lesión generada por algún rasguño por ejemplo, se puede presentar el *Chagoma de inoculación* (Fig. 1.1 (a)). Este signo se refiere a una zona eritematosa e indurada en el sitio de entrada del parásito que puede aparecer de 1 a 2 semanas después del contacto con el vector; se acompaña además de una inflamación de los ganglios locales. Por otro lado, si su entrada es a través de la conjuntiva, se puede presentar también el signo de Romaña como el mostrado en la Fig. 1.1 (b); que es un edema unilateral no doloroso de los párpados y de los tejidos aledaños.

Entre otros de los síntomas se encuentran fiebre, anorexia, diarrea, inflamación de los ganglios, inflamación del hígado y bazo, y miocarditis; los cuales se presentan entre 1 - 2 semanas postinfección. Esta fase se resuelve espontáneamente entre 4 - 8 semanas y da pie a la siguiente fase de la enfermedad [15].

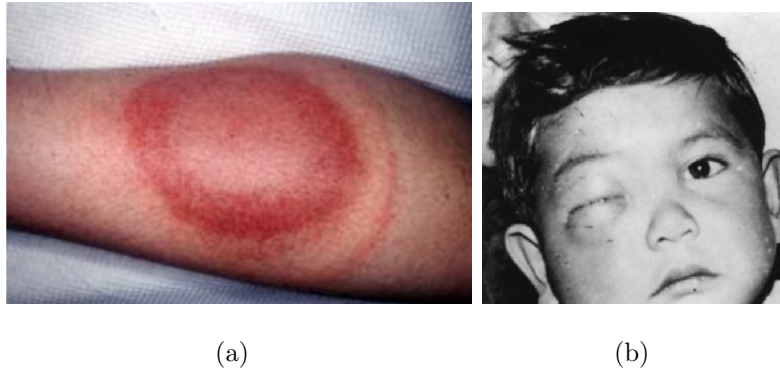


Figura 1.1. a) El chagoma de inoculación [20] y en b) el signo de Romana [15].

Fase crónica asintomática

Esta etapa comienza de 8 - 10 semanas postinfección. Como su nombre lo indica, los pacientes en esta etapa no presentan síntoma alguno y se pueden identificar por la presencia de anticuerpos específicos al parásito. En estos pacientes no se detecta parasitemia en sangre y suele corresponder al 70 % de los casos de la enfermedad.

Fase crónica sintomática

Finalmente, el 30 % restante de los pacientes evolucionan a la última fase de la enfermedad tras un periodo de latencia en la fase indeterminada de entre 10 a 30 años. Esta fase se caracteriza principalmente por la presencia de afecciones cardíacas y complicaciones del tracto digestivo [15]. Los daños cardíacos son los más serios en esta fase y normalmente se presentan como daño al tejido muscular del corazón y trastornos del sistema de conducción del mismo.

Por otro lado, las afecciones del tracto digestivo corresponden a una dilatación del esófago y del colon, conocidas como megaesófago y megacolon respectivamente. La primera de ellas se caracteriza por la dificultad y dolor para tragar, y regurgitaciones. Mientras que el megacolon se puede presentar como dolor abdominal y estreñimiento, en casos crónicos puede haber perforación y obstrucciones.

En casos menos frecuentes pueden llegarse a presentar afecciones al sistema nervioso periférico, como puede ser la neuritis que se presenta fundamentalmente con parestesias e hipoestesia en miembros y disminución o abolición de los reflejos osteotendinosos.

1.2. Vector

Los triatominos son una subfamilia estrictamente hematófaga de la familia *Hemiptera Reduviidae*. Esta subfamilia la conforman cerca de 139 especies, todas estas capaces de propagar el parásito y ser portadores del mismo el resto de su vida. Sin embargo, los géneros *Triatoma*, *Rhodnius* y *Panstrongylus* son los que dominan con una mayor carga vectorial y distribución geográfica (Fig 1.2) [16]. Dentro de estos géneros las especies *Triatoma dimidiata*, *Triatoma infestans*, *Rhodnius prolixus*, *Triatoma brasiliensis* y *Panstrongylus megistus*, son los vectores más importantes en la transmisión de esta enfermedad.

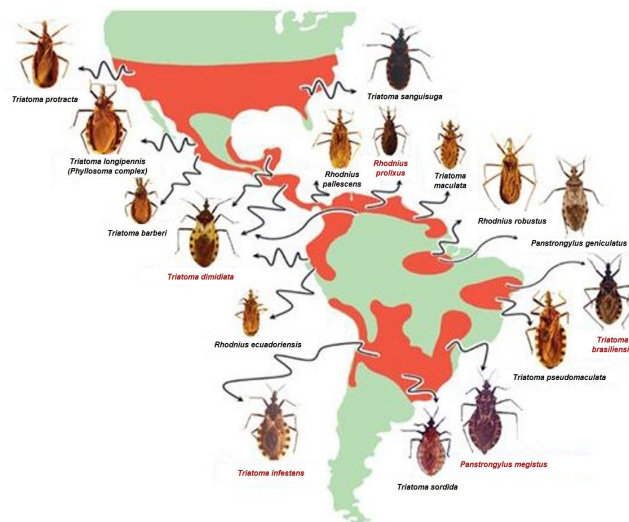


Figura 1.2. Distribución geográfica de algunas de las especies pertenecientes a la subfamilia *Triatominae*. En rojo se resaltan las 5 especies más infectivas [19].

1.3. *Trypanosoma cruzi*

T. cruzi es un protozooario monoflagelado perteneciente a la familia *Trypanosomatidae*, orden *Kinetoplastida* y género *Trypanosoma*. Este género se conforma por cerca de 20 especies, de las cuales solo dos de ellas son patógenas: *T. cruzi* y *T. brucei*, siendo los agentes etiológicos de la Enfermedad de Chagas y la Enfermedad del Sueño respectivamente. Una característica particular del orden *Kinetoplastida* es que presentan una estructura denominada cinetoplasto que es donde se almacena su genoma (aproximadamente de un 10 % al 20 %) y está localizada en la única mitocondria del parásito [16].

1.3.1. Morfología

A lo largo de su vida, el parásito *T. cruzi* puede presentarse en tres estadios principales (Figura 1.3):

- **Epimastigote:** Esta es la forma reproductiva en el interior del vector. Se caracteriza por medir entre 20 - 25 μm de largo y 2 μm de ancho, además, la posición de su cinetoplasto es anterior respecto a su núcleo. Cerca a esta región se origina su flagelo extendiéndose a lo largo de su membrana, lo cual le da un aspecto ondulate a la misma.
- **Amastigote:** Este estadio se presenta en el interior de las células del hospedero vertebrado y es considerada la forma reproductiva dentro del mismo. Presenta una forma esférica ovoide llamada *leishmanoide*, tiene un diámetro aproximado entre 2 - 4 μm y carece de flagelo libre. Se observa con un núcleo y un cinetoplasto grande.
- **Tripomastigote:** En esta etapa llega a medir entre 12 - 30 μm de largo y 2 μm de ancho, incluyendo su flagelo que nace en la parte posterior del parásito y se extiende a lo largo de su membrana emergiendo como flagelo libre en el extremo anterior. Su cinetoplasto se encuentra posterior a su núcleo. Es considerada la forma infectiva

para el hospedero vertebrado (*tripomastigote metacíclico*), así como para el vector (*tripomastigote sanguíneo*).

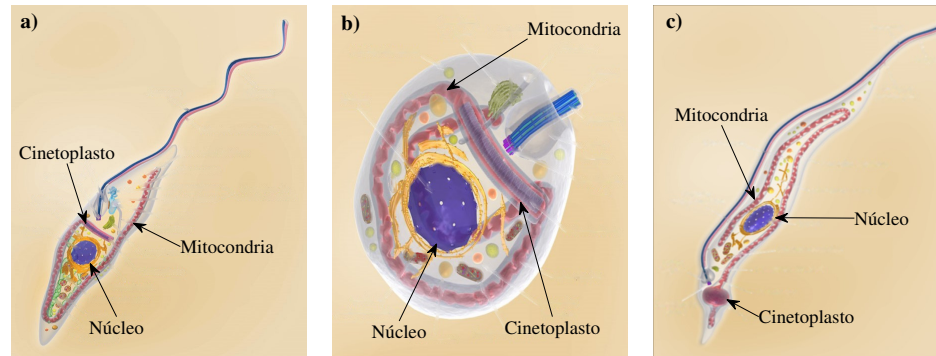


Figura 1.3. Morfología de los distintos estadios de *T. cruzi*: a) Epimastigote, b) Amastigote y c) Tripomastigote [17].

1.3.2. Ciclo de vida

El ciclo de vida de *T. cruzi* se considera difásico, tal y como se aprecia en la Figura 1.4. Esto se debe a que a lo largo de su vida, alterna su residencia entre un vector invertebrado, conocido como triatomino, y un hospedero vertebrado, los cuales pueden ser animales domésticos (perros y gatos), animales silvestres (armadillo, murciélago, rata y zarigüeyas) y seres humanos. Los reptiles, anfibios y aves son refractarios a la infección [16].

Hospedero vertebrado

El desarrollo en el hospedero vertebrado inicia en el momento que un triatomino infectado se alimenta de la sangre de un hospedero sano, defecando al mismo tiempo sobre éste. En esta muestra de heces se encuentran las formas epimastigote y tripomastigote metacíclico del parásito, las cuales pueden ingresar al hospedero a través de la conjuntiva, o

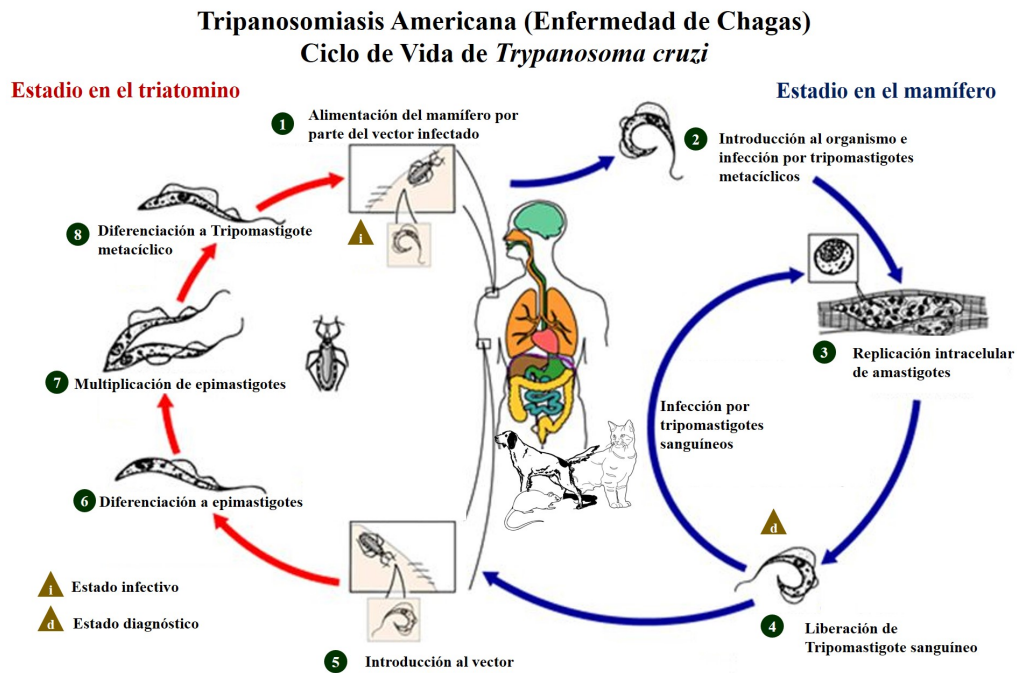


Figura 1.4. Ciclo difásico del *Trypanosoma cruzi* [18].

bien por medio de alguna lesión en la piel. En algunos casos también se pueden introducir por vía oral [10].

Una vez dentro del organismo, el parásito puede utilizar la circulación para desplazarse y así poder infectar diversos tipos celulares como macrófagos, células musculares y fibroblastos, que son hacia las que presenta mayor tropismo [2]. Existen dos tipos de células a infectar:

- **Células con capacidad fagocitaria:** Células como los macrófagos, cuya internalización se realiza vía fagocitosis. Con esto se genera una vesícula parasitófora la cual recluta lisosomas intracelulares con los cuales fusiona su membrana y da pie a la siguiente fase del ciclo [2].

- **Células sin capacidad fagocitaria:** Células como neuronas, musculares y epiteliales. La internalización se realiza por dos mecanismos:
 - **Reclutamiento de lisosomas:** Se ha demostrado que los lisosomas se fusionan a la membrana plasmática para proveer membrana extra con la cual se forma la vesícula parasitófora [9].
 - **Invaginación celular:** Las formas tripomastigotes aprovechan las invaginaciones celulares para formar una vacuola intracelular a la cual posteriormente se fusionan lisosomas.

En los dos casos, el pH ácido de los lisosomas dentro de la vesícula permite el cambio del estadio tripomastigote metacíclico a la forma amastigote [4]. Ésta forma lisa la membrana de la vesícula y deposita la forma amastigote en el citosol, la cual permanece en un periodo de latencia entre 24 y 35 horas. Posterior a esto inicia el proceso de reproducción por división binaria, con una duración aproximada de 25 minutos. Este proceso se repite a lo largo de 14 horas, momento en el cual las formas amastigotes ocupan el mayor volumen intracelular posible.

Se cree que debido a falta de nutrientes intracelulares, las formas amastigotes inician un proceso de diferenciación casi sincronizado a la forma tripomastigote sanguíneo. El batido constante del flagelo de esta forma es lo que se cree que eventualmente rompe la membrana plasmática, con lo cual los parásitos son liberados al medio extracelular con la capacidad de infectar nuevas células como musculares, epiteliales e incluso neuronas; o bien, de mantenerse en el torrente sanguíneo.

Vector invertebrado

Cuando el parásito se encuentra en el torrente sanguíneo, puede ser ingerido por un nuevo vector cuando éste se alimenta del hospedero infectado. En el interior del vector, el parásito se traslada al intestino medio en donde se dará el cambio de la forma tripomastigote

sanguíneo a la forma epimastigote, la cual comienza a dividirse por medio de fisiones binarias.

Finalmente, las formas epimastigotes se desplazan al intestino posterior en donde se anclan al epitelio del mismo a través de su flagelo e inicia la transformación a la forma tripomastigote metacíclico. En este estadio, los parásitos están a la espera de ser evacuados del vector a través de sus heces una vez que éste vuelva a alimentarse. Se considera que esta última transformación se lleva a cabo por la activación de adenil ciclasa presente en la membrana plasmática de los epimastigotes [7].

1.4. Estado Actual del Campo

Hasta hace poco se consideraba que únicamente los estadios amastigote y tripomastigote eran capaces de llevar a cabo una infección. Sin embargo, en un estudio realizado por Florencio y colaboradores [5] demostraron que el estadio epimastigote, además de las formas amastigotes y tripomastigotes, también es capaz de establecer una infección en fibroblastos 3T3 NIH *in vitro*.

El descubrimiento de que la forma epimastigote es también infectiva, además de su fácil manejo en cultivos *in vitro*, ha motivado ha llevar a cabo los pocos estudios de motilidad en *T. cruzi*. En uno de estos trabajos, Sosa y colaboradores [8] realizaron una caracterización del nado de los epimastigotes de la cepa CL Brener. Ellos observaron, que el movimiento del epimastigote se conforma de tumbos y corridas, los cuales se alternan a lo largo del tiempo.

Como último, en el año de 2016, Alves y colaboradores [1] determinaron que el nado del epimastigote de *T. cruzi* es menos direccionado que para otros protozoarios del estudio, caracterizado por valores mayores de velocidad, así como por presentar un nado superdifusivo menor en comparación de los mismos protozoarios.

1.5. Justificación

Aún cuando el movimiento de *T. cruzi* es necesario para llevar a cabo las diferentes etapas de su proceso de infección y completar su ciclo de vida, es poco lo que se conoce de sus características de motilidad, en particular del 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.

1.6. Hipótesis

Las propiedades de motilidad del tripomastigote de *T. cruzi*, varían cuando el parásito está expuesto a células de mamífero.

1.7. Objetivos general

Estudiar el efecto que tiene sobre la motilidad del tripomastigote de la cepa CL Brener de *T. cruzi* su interacción con diferentes líneas celulares de fibroblastos.

Capítulo 2

Metodología

2.1. Estructura general

En esta tesis se trabajó con el estadio tripomastigote de *T. cruzi* [12]. Se estudió la motilidad del parásito en su interacción sin y con células de mamífero, esto al registrar el movimiento de los parásitos bajo estas dos condiciones. En seguida, mediante técnicas de análisis de imágenes, se extrajeron las trayectorias de los parásitos en cada video. Y finalmente, se llevó a cabo el análisis estadístico de dichas trayectorias y su posterior comparación entre las dos condiciones mencionadas anteriormente. En general, el protocolo se ejemplifica en la Fig. 2.1 y sus detalles se describen en extenso en las siguientes secciones.

Estrategia General	Tripomastigotes	Sin células (grupo control)	4 experimentos independientes
		Con células (grupo de prueba)	a) Fibroblastos 3T3 NIH 4 experimentos independientes./ 3 videos
			b) Fibroblastos HFF1 4 experimentos independientes./ 3 videos

Figura 2.1. Estrategia general del protocolo experimental.

2.2. Líneas celulares

Para este estudio se manejó el estadio tripomastigote de *T. cruzi* de la cepa CL Brener. Esta cepa es aislada de *Triatoma infestans*, un vector propio del Sur de Brasil. Por tanto, los parásitos provenientes de esta cepa se consideran de tipo doméstico, además de ser una de las cepas clásicas en los trabajos de laboratorio relacionados a este parásito.

Para analizar la influencia de células de mamífero sobre la motilidad de este estadio se seleccionaron dos líneas celulares de fibroblastos: HFF1 y 3T3 NIH, que provienen de ratón y de humano respectivamente. El mantenimiento y la obtención, tanto de los fibroblastos como de los parásitos, se realizó mediante el siguiente protocolo.

2.2.1. Medios de cultivo

Las líneas celulares de fibroblastos 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 para mantener una confluencia alrededor del 70 %. La metodología seguida para esta resiembra es de la siguiente forma:

- Dejar atemperar el medio DMEM, 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 y las células a 37°C.
- Eliminar el medio viejo contenido en el stock.
- Agregar 5 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. Este volumen se desecha a los pocos segundos para evitar daño celular.

- 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 superficies. Se deja en incubación el tiempo necesario para despegar las células y evitar daño celular.
- Revisar que las células se encuentren redondas y golpear ligeramente la caja 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 homogenizar el medio.
- Conservar el volumen de tripsina necesario para obtener la confluencia deseada.
- Añadir 3.5 ml de medio DMEM fresco al 10 % de FBS.

2.2.2. Tripomastigotes

Por su parte, para la obtención de tripomastigotes se procedió a realizar una infección primaria con epimastigotes. Posterior a esto, con las formas amastigotes y tripomastigotes liberadas, se llevó a cabo una infección secundaria. Los tripomastigotes obtenidos tras esta infección fueron los que se utilizaron para realizar los experimentos. El mantenimiento de cada uno de los estadios y el procedimiento para las infecciones siguió el siguiente protocolo.

Epimastigotes

Los epimastigotes se cultivaron en 5 ml de medio LIT (Liver Infusion Tryptose) complementado con 10 % de FBS, 0.5 % penicilina (10,000 IU)/ estreptomycin (10.000 μ g) y 1 % de hemina (5 mg/ml) a 28°C. Se dejaron crecer en condiciones homogéneas manteniendo su resiembra cada 7 días, empleando un volumen de 500 μ l como inóculo inicial. Para la realización de las infecciones se utilizaron parásitos en la fase logarítmica tardía de crecimiento.

Infección primaria

Para llevar a cabo la infección primaria se cultivaron fibroblastos HFF1 en una caja de cultivo de 25 cm² con medio DMEM al 10% de FBS al menos dos días antes de realizar la infección. Al cabo de este plazo, el medio fue cambiado por medio DMEM al 2% de FBS. Esto para mantener una confluencia celular constante durante la infección y fomentar la transformación de los epimastigotes a amastigotes y tripomastigotes diferenciados extracelularmente, los cuales presentan una mejor eficiencia de infección.

El inóculo de epimastigotes empleados para la infección fue de 1×10^6 parásitos/ml, los cuales fueron preparados de la siguiente forma:

1. Contar los epimastigotes en 10 μ l con una cámara de Neubauer. Se empleó un factor de dilución de 1:2 con Formaldehído para evitar que los parásitos se movieran dentro de la cámara.
2. Centrifugar el volumen necesario a 3,000 rpm durante 10 minutos.
3. Retirar el sobrenadante, teniendo cuidado de no perder la pastilla.
4. Disgregar la pastilla del fondo y lavar los parásitos con 5 ml de medio DMEM sin complementar.
5. Centrifugar a 3,000 rpm durante 10 minutos.
6. Disgregar la pastilla del fondo y resuspender los parásitos en 1 ml del medio DMEM al 2% de la caja donde se mantienen las células a infectar.
7. Depositar este volumen en la caja de cultivo.
8. Incubar a 37°C al 5% de CO₂ durante 48 horas.
9. Reemplazar el medio viejo por medio DMEM fresco al 2% de FBS durante 5 - 7 días para eliminar los parásitos del sobrenadante.

10. Posterior a este plazo, cambiar el medio cada tercer día.
11. Esperar la liberación de tripomastigotes y amastigotes. Esto ocurre en los siguientes 5 - 7 días.

Infección secundaria

Una vez liberados los tripomastigotes de la infección primaria, se prepara otra caja de cultivo con células bajo las mismas condiciones que para una infección primaria y se sigue el siguiente procedimiento:

1. Determinar el volumen tal que contenga 1×10^5 parásitos.
2. Centrifugar de 1.5 veces el sobrenadante de la infección primaria a 3,000 rpm por 5 minutos.
3. Retirar el sobrenadante teniendo cuidado de no perder su pastilla y disgregar la misma.
4. Resuspenda en el medio DMEM complementado con 2 % de SFB de la caja a infectar.
5. Incubar a 37°C y 5 % CO₂ durante 24 horas.
6. Retirar el medio con los parásitos y agregar medio fresco complementado con 2 % de SFB en caso de que se desee mantener infecciones activas.
7. Una vez eliminados los parásitos del sobrenadante el cambio de medio se realiza cada tercer día.
8. Los amastigotes y tripomastigotes producto de la infección serán liberados al sobrenadante en los siguientes 2 ó 3 días.

2.3. Arreglo experimental

Una vez conseguidas las células y los tripomastigotes, se realizaron 2 grupos experimentales: un grupo control, en el cual el parásito nadaba libremente en ausencia de células; y un grupo de prueba, donde se permitió la interacción entre el parásito y las células. Así mismo, el grupo de prueba se dividió en dos subgrupos, cada uno correspondiente a las líneas celulares mencionadas anteriormente. Para llevar a cabo el estudio de la motilidad del parásito bajo estas condiciones se implementó el siguiente arreglo experimental.

Se emplearon placas de 24 pozos, de los cuales a 9 de ellos se les colocó un cubre objetos circular (previamente flameado) en el fondo. En 3 de estos pozos se sembraron los fibroblastos 3T3 NIH y en otros 3 pozos los HFF1, utilizando en ambos casos medio DMEM al 10% de FBS y se dejaron en incubación a 37°C y 5% de CO₂. Los inóculos iniciales de las células fueron tales que al cabo de 24 - 48 horas se tuvieran confluencias alrededor del 25%, 50% y 100% respectivamente en pozos individuales para cada línea celular. De este modo también fue posible estudiar el efecto de la confluencia celular en la motilidad del tripomastigote como se mencionará más adelante.

Una vez obtenidas las confluencias deseadas se tomaron los 5 ml de medio DMEM de la caja de infección secundaria y fueron reemplazados por medio DMEM fresco al 10% de FBS para mantener la infección activa. El volumen con los parásitos fue centrifugado durante 10 minutos a 3,000 rpm. Se retiró el sobrenadante y se disgregó la pastilla para finalmente resuspender en 1 ml de medio DMEM al 2%. Posteriormente se prepararon volúmenes de 300 μ l de medio DMEM al 2% de FBS con una concentración final de 3.824×10^5 parásitos/ml y 10 μ l de partículas fluorescentes de poliestireno, estas últimas como medida de control como se detallará en el siguiente capítulo.

Una vez hecho lo anterior se eliminó el medio de la placa de pozos y se añadieron los 300 μ l procurando homogenizar bien subiendo y bajando el volumen con una micropipeta antes de depositarlos en cada pozo, de este modo se establecieron las condiciones para el

grupo de prueba. Para el grupo control, se agregaron 300 μl del mismo medio a los últimos 3 pozos disponibles con el cubre objetos al fondo. Al concluir esto se mantuvo la caja en incubación a 37°C y 5% de CO₂ durante 1 hora.

Finalmente, se llevó el arreglo a un microscopio invertido de fluorescencia Olympus IX50 donde se observaron los parásitos con un objetivo de 40X y contraste de fase en campo claro. Se ajustó el plano focal para captar nítidamente el contorno de las células (en el caso del grupo de prueba) y tomar una fotografía de éstas. Para llevar a cabo el seguimiento del parásito se tomaron videos colocando el plano focal del microscopio entre 10 y 12 μm arriba de las células. Los videos se grabaron durante 1 minuto a una resolución de 10 fps y una resolución espacial de 2.77 pixeles/ μm .

2.4. Análisis de los videos

Los cuadros de cada video se extrajeron mediante el software MATLAB (R2015a) y fueron trabajados mediante el canal verde, ya que fue el que permitió recuperar la información tanto de los parásitos como de las partículas; así como presentar un buen contraste entre ellas.

En seguida, cada cuadro del video, fue binarizado bajo dos rangos: pixeles con intensidades mayores a un umbral u_1 , que corresponden a las partículas (imagen I_p); y pixeles con intensidades entre el rango de u_2 y u_2' , que conformaban a los parásitos (imagen I_t). Estos valores de umbral fueron determinados a prueba y error, y son diferentes para cada video.

Tanto para la imagen I_p e I_t se filtraron áreas que fueran mayor a un valor a , con lo cual se eliminaban fragmentos de células que lograban pasar la binarización, o bien, aquellas áreas conformadas por la intersección de uno o más parásitos a lo largo de su trayecto.

Una vez que se contó con la imagen I_t con los tripomastigotes, se utilizó un algoritmo

de conectividad de MATLAB (*bwlabel.m*), mediante el cual se determinó cuáles pixeles corresponden a objetos diferentes dentro de la imagen. De este modo todos los pixeles que corresponden a un objeto fueron etiquetados con un mismo valor numérico, el cual es diferente para los pixeles de otro objeto, pudiendo así determinar fácilmente los centroides de cada uno de los objetos a lo largo del video.

La formación de las trayectorias, tanto para los parásitos como para las partículas, siguió el procedimiento mencionado en [8]. De modo, que al finalizar este análisis se dispuso de un número Q de trayectorias dando un total de q posiciones por video. Al finalizar, las trayectorias de los videos fueron analizadas mediante el cálculo del desplazamiento cuadrático medio y la elaboración de mapas de probabilidad de residencia.

2.4.1. Desplazamiento cuadrático medio

Primero que nada se estudió el Desplazamiento Cuadrático Medio (MSD). Este parámetro indica la difusión de las partículas con un movimiento aleatorio, o en otras palabras, la región del sistema recorrida por un caminante aleatorio. Dicho parámetro fue calculado de acuerdo con la siguiente fórmula

$$\langle \Delta \vec{r}_j^2 \rangle = \langle (\vec{r}_{j,i+n\Delta t} - \vec{r}_{j,i})^2 \rangle, \quad (2.1)$$

donde los índices indican al j -ésimo tripomastigote/partícula del video al tiempo i . El símbolo $\langle \rangle$ indica el promedio sobre ensemble de los desplazamientos.

Esta función se puede interpretar de modo que al tiempo t_i de observación el desplazamiento promedio del móvil respecto a su punto de partida es $\langle \Delta r(\vec{t}_i) \rangle$. De manera que entre mayor sea el valor de MSD más lejos se encuentran el móvil del punto donde partió.

En particular, el movimiento de un elemento aleatorio, como el caso de las partículas, que ocurre de manera no correlacionada (la dirección del movimiento es independiente de

de la dirección previa) e imparcial (no existe una dirección de movimiento preferencial) sigue un movimiento Browniano [13]. Este tipo de movimiento también se conoce como caminata aleatoria simple (SRW por sus siglas en inglés) o difusión simple. Para este caso, la curva de desplazamiento cuadrático medio depende linealmente del tiempo de observación del fenómeno, y puede ser calculado mediante la siguiente expresión

$$\langle \Delta \vec{r}_j^2 \rangle = 4Dt, \quad (2.2)$$

donde el valor D se define como el *coeficiente de difusión* [14]. Este parámetro caracteriza la migración de las partículas dependiendo de la temperatura, también depende del elemento de estudio y del medio en que éste se esté desplazando.

Por otro lado, cuando el movimiento es correlacionado, es decir, el móvil tiende a desplazarse en la misma dirección que lo hizo previamente, se presenta una caminata aleatoria correlacionada (CRW por sus siglas en inglés). En este caso, el desplazamiento cuadrático medio puede calcularse como

$$\langle \Delta \vec{r}_j^2 \rangle = \frac{\nu^2}{\mu} \left(t - \frac{1}{2\mu} (1 - e^{-2\mu t}) \right), \quad (2.3)$$

donde ν es la rapidez del móvil, μ el número de veces que se espera que el móvil se mueva en una nueva dirección en un intervalo de tiempo y t el tiempo de observación. Para tiempos cortos ($t \approx 1/\mu$), el valor de MSD depende linealmente de t^2 , mientras que ha medida que aumenta el tiempo el comportamiento tiende a $\nu^2 t/\mu$. Es decir, a tiempos cortos el móvil tiende a desplazarse teniendo memoria de como fue su desplazamiento anterior y haciéndolo con una velocidad mayor que en un movimiento Browniano, sin embargo, a tiempos largos esta memoria se va perdiendo y se comienza a moverse siguiendo una difusión simple.

De manera local es posible ajustar la curva de MSD como una ley de potencias en función del tiempo como la indicada en la ec. 2.4.

$$\langle \Delta \vec{r}_j^2 \rangle \sim t^\lambda. \quad (2.4)$$

Lo cual da indicios de como es el movimiento del sujeto de estudio en diferentes secciones de la curva. Por ejemplo, para un movimiento Browniano se espera que el valor de λ sea igual a 1, mientras que si λ toma valores mayores a 1, se dice que el movimiento del sujeto, en esa región de estudio, es superdifusivo. Es decir, la migración del móvil ocurre mucho más rápido que lo esperado en un movimiento Browniano y se presenta de manera más dispersa. Por otra parte, si el valor de λ está entre 0 y 1, el movimiento se considera subdifusivo. Esto quiere decir, que el movimiento es más lento que en un movimiento Browniano y y menos disperso [1].

2.4.2. Mapas de Probabilidad

Como último estudio, se realizó un mapa de probabilidad de las posiciones de los tripomastigotes, para estudiar la distribución de los parásitos en el área de estudio. Para esto se consideró el tamaño de la imagen como el área de estudio con dimensiones 512x680 pixeles, la cual se dividió en regiones de tamaño 64x68 pixeles y se determinó el número n_i de posiciones de las trayectorias dentro de cada región. De este modo, fue posible asignar a cada una de éstas un valor de probabilidad expresado como el cociente de n_i y q , donde q es el número total de posiciones identificadas en el video.

Así, valores cercanos al azul denotan una baja probabilidad de encontrar al parásito en dicha región de estudio, mientras que valores cercanos al rojo indican una mayor probabilidad. Por ejemplo, si un mapa cuenta únicamente con múltiples regiones en azul esto indicaría una distribución homogénea del móvil a lo largo del área de estudio.

Capítulo 3

Resultados y discusión

Como se mencionó en la Fig. 2.1, se realizaron diversos experimentos para el grupo control y para el grupo de prueba, obteniendo así para cada uno de ellos un vídeo. Una vez obtenidas las trayectorias de los parásitos y las partículas, y con el objeto de identificar la presencia de flujo, se calculó del MSD de las partículas en cada video. Dado su tamaño ($0.5 \mu\text{m}$) es de esperar que sigan un movimiento Browniano. Las curvas de MSD para las partículas del grupo control se observan en la Fig. 3.1.

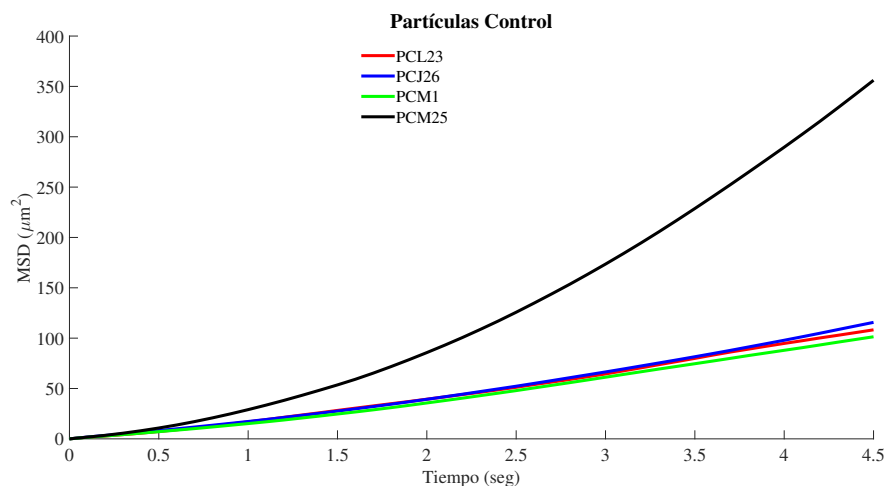


Figura 3.1. Curvas de desplazamiento cuadrático medio para las partículas de los experimentos del grupo control. La nomenclatura es para identificar el experimento: Partículas control (PC) y el día del experimento (Lunes - L, Miércoles - M y Jueves - J).

Como se aprecia en la Fig. 3.1 en tres de los experimentos control se presenta un comportamiento similar entre sí. Dicho comportamiento se muestra difusivo para tiempos cortos (0.5 segundos), seguido de un comportamiento superdifusivo. Esta conducta podría deberse a las interacciones hidrodinámicas con los parásitos motiles.

Para corroborar que el comportamiento inicial fuese difusivo, se ajustaron los puntos iniciales (hasta 0.5 segundos) a una función de la forma

$$\langle \Delta \vec{r}_j^2 \rangle = \alpha t^\lambda. \quad (3.1)$$

De modo que se desechó todo aquel experimento en que el valor de λ se desviaba de 1 por considerar la posibilidad de flujo en ellos. Un experimento de este estilo es como el mostrado en la curva negra de la Fig. 3.1.

Posteriormente, con los videos restantes, se recuperaron las trayectorias de los parásitos. A partir de estas se calculó la rapidez promedio de cada una de las trayectorias y se obtuvo el histograma correspondiente. Un ejemplo representativo de éste se muestra en la Fig. 3.2

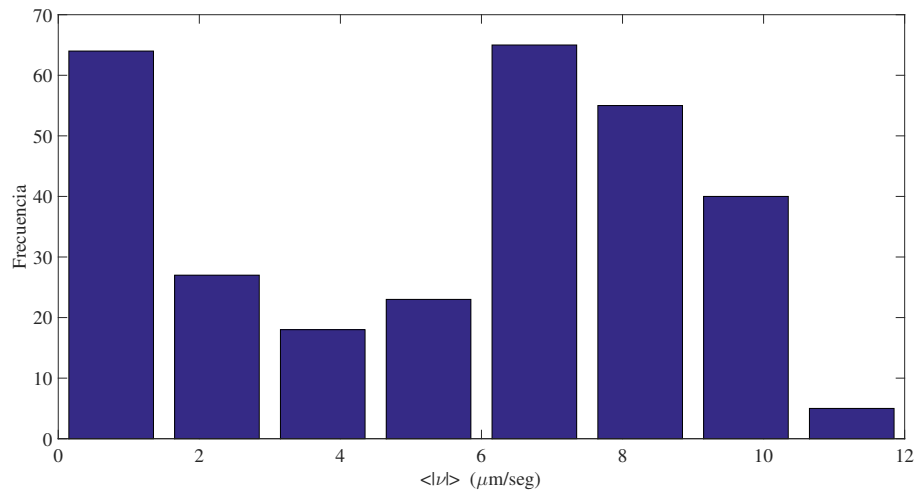


Figura 3.2. Histograma de los valores de rapidez promedio de las trayectorias de un experimento del grupo de prueba.

En la Fig. 3.2 se aprecian dos modas, lo cual indica que en los experimentos existen dos tipos de móviles, caracterizados por mostrar bajas y altas velocidades. Se consideró que aquellas trayectorias con una rapidez promedio menor a los $4 \mu\text{m}/\text{seg}$ pudiesen ser amastigotes u algún otro elemento distinto a un tripomastigote. Es por ello que trayectorias con ésta particularidad fueron eliminadas del estudio.

3.1. Desplazamiento cuadrático medio

Para el resto de las trayectorias se calcularon los valores de MSD de los parásitos, tanto para el grupo control como para el grupo de prueba. Los resultados obtenidos se muestran en la Fig. 3.3. Con el fin de identificar los posibles efectos de la confluencia celular de las líneas trabajadas, los resultados fueron agrupados en 3 rangos:

- **Control.** 3 experimentos, 595 trayectorias con una duración promedio de 4.64 segundos.

- **HFF1**
 - **Primer rango (27 %).** 4 experimentos, 1340 trayectorias con una duración promedio de 2.90 segundos.
 - **Segundo rango (44 %).** 3 experimentos, 470 trayectorias con una duración promedio de 3.04 segundos.
 - **Tercer rango (86 %).** 4 experimentos, 441 trayectorias con una duración promedio de 2.30 segundos.

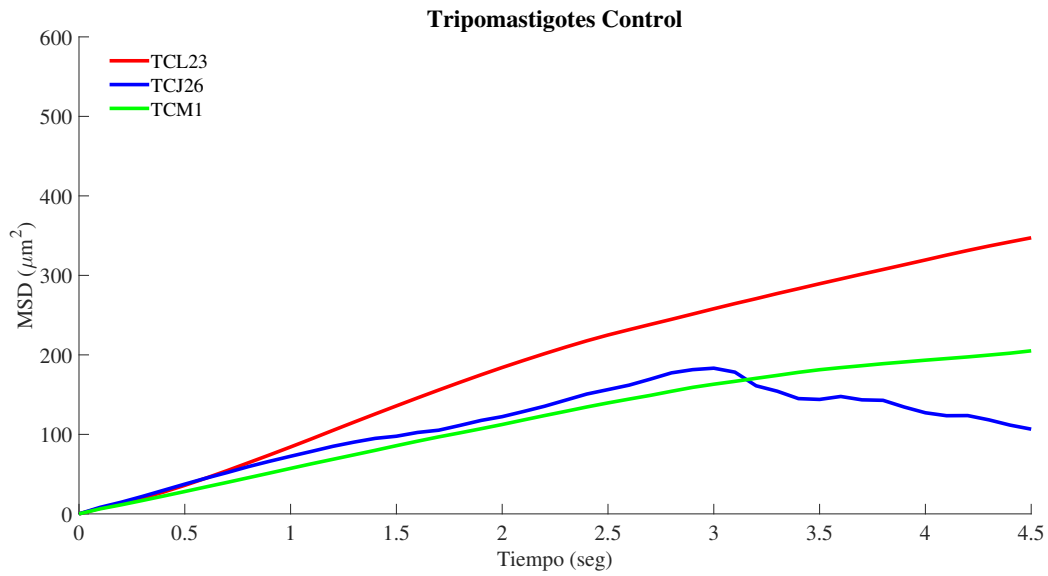
- **3T3 NIH**
 - **Primer rango (22 %).** 3 experimentos, 437 trayectorias con una duración promedio de 3.30 segundos.

- **Segundo rango (42 %)**. 4 experimentos, 383 trayectorias con una duración promedio de 2.68 segundos.
- **Tercer rango (80 %)**. 4 experimentos, 509 trayectorias con una duración promedio de 2.30 segundos.

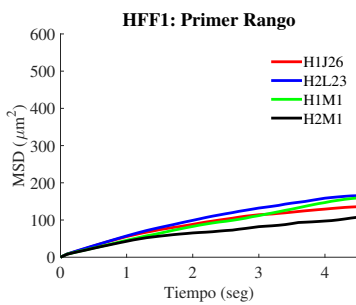
En la Fig. 3.3(a) se muestran las curvas de MSD para los tripomastigotes del grupo control. Como se puede observar, para tiempos largos el comportamiento es monótonamente creciente al menos para dos de los experimentos. Esto sugiere que el comportamiento de los tripomastigotes es alejarse de su punto de partida, lo cual era de esperar para este tipo de móviles en ausencia de algún agente que los contenga. Por otro lado, para uno de los experimentos se observa una caída alrededor de los 3 segundos. Lo cual podría deberse a una falta de estadística en ese experimento, o de ser real, podría sugerir un confinamiento de los parásitos a tiempos largos. Sin embargo sería necesario realizar más experimentos para poder confirmar esto.

Otra de las peculiaridades de esta gráfica, es que para tiempos cortos (hasta los 0.5 segundos), el comportamiento de los tres experimentos es muy similar entre. Mas aún, al realizar un ajuste a esta región por medio de la ec. 3.1, se obtiene un valor promedio de λ de 0.96. Por lo cual, de acuerdo a lo mencionado en la sección 2.4.1, el nado de los tripomastigotes a tiempos cortos podría ser subdifusivo, lo cual contradice lo esperado para este tipo de móviles [1], las razones de esto se discutirán más adelante. El cálculo del factor λ hasta los 0.5 segundos también se cálculo para todos los experimentos del grupo de prueba, con la intención de realizar una posterior comparación de estos respecto al del control.

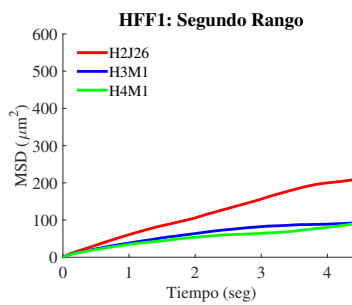
En la Fig. 3.3(b) se puede observar un comportamiento de los tripomastigotes muy similar al del grupo control en presencia de las células HFF1 a bajas confluencias. Sugiriendo con esto que bajo estas condiciones los parásitos se dispersan o alejan de su punto de partida a medida que avanza el tiempo.



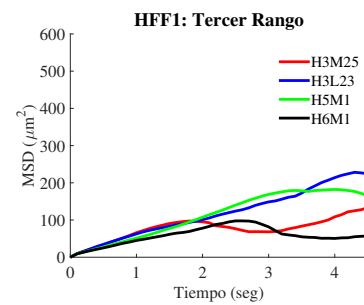
(a) Control Tripomastigotes



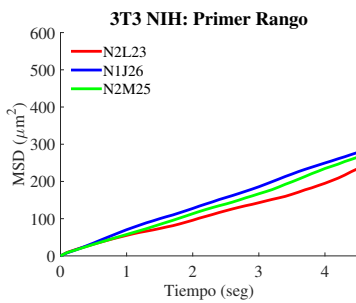
(b) HFF1: Primer rango



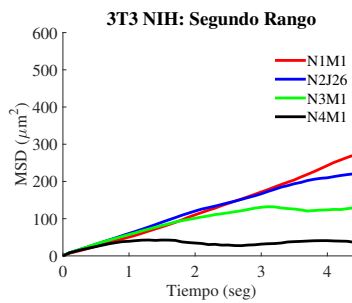
(c) HFF1: Segundo rango



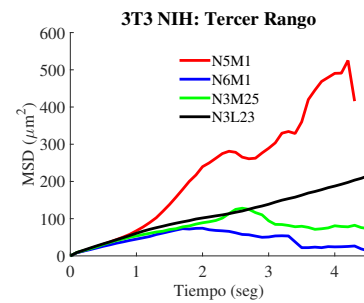
(d) HFF1: Tercer rango



(e) 3T3 NIH: Primer rango



(f) 3T3 NIH: Segundo rango



(g) 3T3 NIH: Tercer rango

Figura 3.3. (a) Curvas de desplazamiento cuadrático medio para los tripomastigotes en el grupo control y para los tripomastigotes del grupo de prueba (b:g) mostrados de menor a mayor confluencia.

Conforme la confluencia celular aumente alrededor del 50% (Fig. 3.3(c)), se puede observar que en presencia de las células de humano, el comportamiento de los parásitos no varía cualitativamente respecto a su análogo en el primer rango de confluencias y por tanto tampoco respecto al control.

Sin embargo, cuando el medio se encuentra altamente confluyente, como ocurre para el tercer rango, los resultados de la Fig. 3.3(d) sugieren que los parásitos comienzan a confinarse en el área de estudio. Esto debido a que en al menos dos de los resultados se muestra un comportamiento ondulatorio lo que indicaría que los parásitos tienden a regresar a su punto de origen, sin hacerlo por completo, y posteriormente vuelven a alejarse de éste. Del mismo modo que para el caso control, este comportamiento podría deberse a una baja estadística en los experimentos.

En presencia de una baja confluencia de las células de ratón, los parásitos muestran un comportamiento similar al del control (Fig. 3.3(e)). Es decir, en los tres experimentos, los parásitos tienden a alejarse de su punto de origen a medida que evoluciona el tiempo.

Para el segundo rango de confluencia de las células de ratón (Fig. 3.3(f)), se observa que los parásitos empiezan a disminuir su movimiento, sugiriendo que para tiempo largos existe un efecto de confinamiento debido a que la curva de MSD comienza a presentar una meseta. Sin embargo aún se logra distinguir un comportamiento similar al control para uno de los videos, lo cual podría deberse a que se trata del experimento con menor confluencia celular en este rango de estudio.

El fenómeno de confinamiento se sigue conservando para al menos dos experimentos del tercer rango (Fig. 3.3(g)) e igualmente se observa un resultado en donde los tripomastigotes siguen desplazándose como en el grupo control. Solo un experimento en este rango dista por mucho del comportamiento mostrado para los otros experimentos, lo cual podría deberse a que corresponde al experimento cuyas trayectorias fueron más cortas respecto a las de los demás experimentos.

Comparando ahora las dos líneas celulares en los rangos de confluencia correspondientes se puede apreciar que para confluencias bajas el comportamiento de los parásitos es muy similar respecto al control, no obstante pareciera ser que en presencia de las células 3T3 NIH los parásitos tienden a moverse de manera más dispersa. Otra diferencia es el rango de confluencias a partir de donde los parásitos parecieran estarse confinando. Este fenómeno pudiese ser que se presente en medios altamente confluentes para las células HFF1, mientras que para las células 3T3 NIH, este comportamiento se inicia a partir de medios semiconfluentes.

Hasta ahora se ha estudiado el comportamiento de los tripomastigotes a tiempos largos. Para realizar este análisis a tiempos cortos se determinó el valor de λ de las curvas de MSD en función de la confluencia celular hasta los 0.5 segundos, mostrando los resultados en la Fig. 3.4.

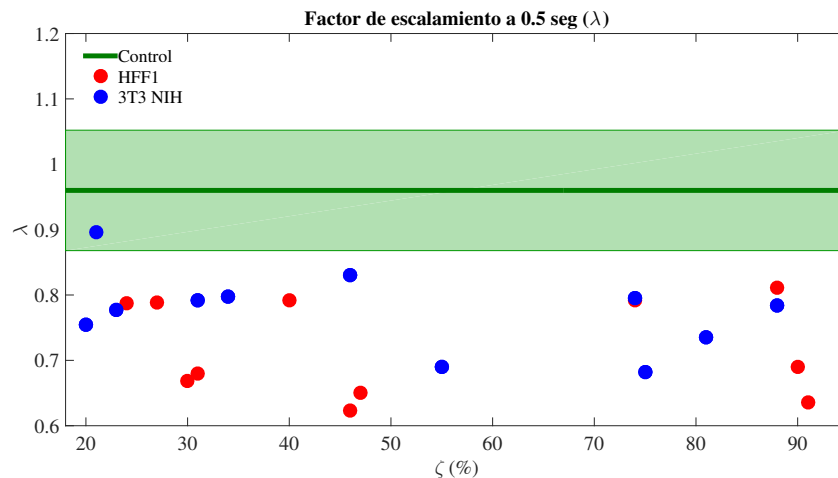


Figura 3.4. Valores del factor de escalamiento λ para los tripomastigotes de todos los experimentos. La línea verde representa el valor λ promedio obtenido de los tres experimentos control, mientras que la región sombreada en verde el intervalo de confianza al 95 % ($2\sigma^2$). Los puntos rojos y azules indican los valores de λ de los tripomastigotes por experimento individual para las líneas HFF1 y 3T3 NIH respectivamente.

En la Fig. 3.4 se puede apreciar que desde el control, el comportamiento de los parásitos se realiza en el régimen subdifusivo y que este comportamiento se presenta para todos los experimentos del grupo de prueba en este estudio. Además cabe señalar, que salvo un experimento de la línea 3T3 NIH, todos los demás se encuentran por debajo del la región sombreado, lo cual podría insinuar que el grado de dispersión de los tripomastigotes del grupo de prueba es menor respecto control.

Este resultado, como se mostró en el Capítulo 2, podría sugerir que el movimiento de los parásitos en presencia de las células tiende a ser menos disperso de lo que se espera para un móvil auto propulsado [1]. Además de que está dispersión es inclusive menor que para aquellos tripomastigotes del grupo control e indistinta de la línea celular empleada. Esto podría deberse a múltiples factores como son la baja resolución temporal de captura, la cual pudo no ser suficiente para registrar los tiempos de nado superdifusivo del parásito. También podría deberse a una baja estadística, esto tomando en cuenta que en promedio el número trayectorias por experimento es de 127 y que la duración máxima de las mismas fue de aproximadamente 3.30 segundos. Sin embargo, las condiciones de este experimento se asemejan en cierto grado a las condiciones que presenta el parásito a partir de la fase crónica asintomática. Bajo este criterio podría ser que este tipo de movimiento por parte del parásito le permita interactuar por más tiempo con las células y con ello aumentar la probabilidad de infectarlas dando pie a la patología propia de la etapa crónico sintomática.

3.2. Mapas de probabilidad de residencia

Lo siguiente que se realizó fue la obtención de los mapas de probabilidad de residencia. Para ello cabe recordar que se trabajó con imágenes de 512x680 pixeles y que las regiones en las que se dividieron fueron de 64x68 pixeles.

Este tipo de mapas se realizó para todos los experimentos mencionados al inicio del capítulo, sin embargo en la Fig. 3.5 se muestran solo algunos de los mapas representativos

para el grupo control y para las dos líneas celulares.

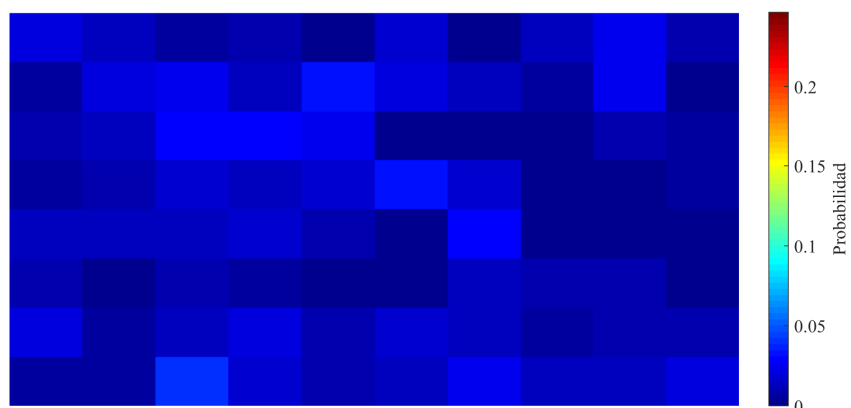
En la Fig. 3.5 (a) se presenta uno de los mapas correspondientes al grupo control. En este se puede observar que todas las regiones presentan valores bajos de probabilidad menos a 1×10^{-5} , además de que estos se muestran distribuidos de manera muy homogénea.

Por otra parte, los mapas ilustrados en las Fig. 3.5 (b) y (c) pertenecen a las líneas HFF1 y 3T3 NIH respectivamente. Las líneas blancas que se observan en estas figuras corresponden a los contornos de las células presentes en cada uno de los experimentos. Como se observa, la distribución de los parásitos en presencia de las células HFF1 no muestra diferencia alguna respecto al control, al menos de manera cualitativa.

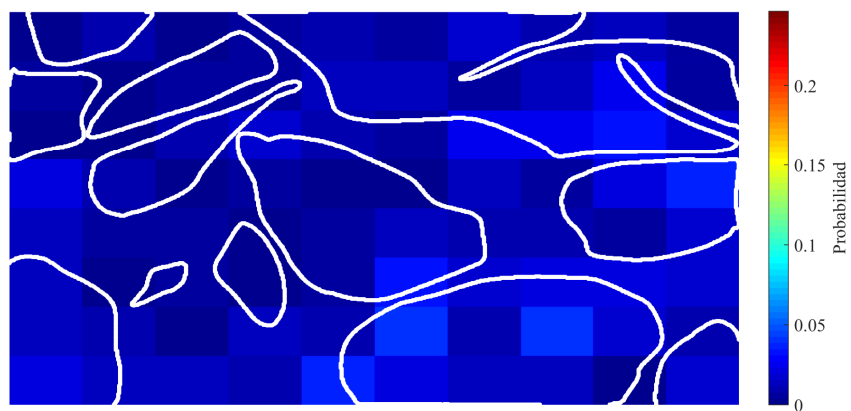
El mapa mostrado en la Fig. 3.5(c), muestra que en presencia de las células 3T3 NIH, los parásitos si llegan a frecuentar ciertas regiones en el área de estudio. Estas regiones con valores de probabilidad mayores a 2.2×10^{-5} se localizan tanto fuera como sobre las células formando pequeños clusters con valores de probabilidad mayores al control. También cabe destacar, que este caso existen diversas regiones agrupadas con valores cercano a cero. Si bien, en los dos mapas anteriores se llegan a presentar estas regiones, en ninguno de ellos se encuentran clusters de estos como los mostrados en la Fig. 3.5(c).

No obstante, para tener un criterio objetivo que evidencie lo observado en estos mapas se decidió a utilizar la varianza. Esto para determinar de manera cuantitativa si la distribución del parásito en presencia de las células es diferente de su distribución en condiciones control. Entre más pequeña sea la varianza, más homogéneo será el mapa de probabilidad. Por otro lado, a medida que la distribución se vuelve más heterogénea, es decir, que comienzan a formarse regiones en donde es muy probable encontrar al parásito, el valor de la varianza irá en aumento.

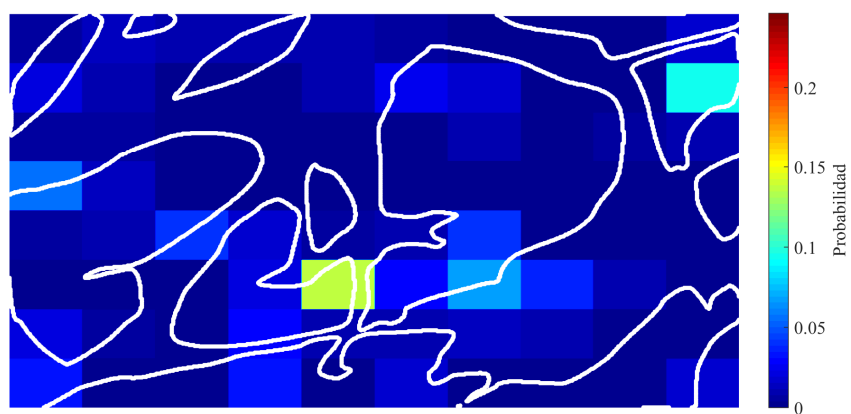
En la Fig. 3.6 se muestra la varianza de la probabilidad σ^2 en función de la confluencia celular ζ .



(a) Control



(b) HFF1 al 40 %



(c) 3T3 NIH al 46 %

Figura 3.5. Mapas de probabilidad de los tripomastigotes.

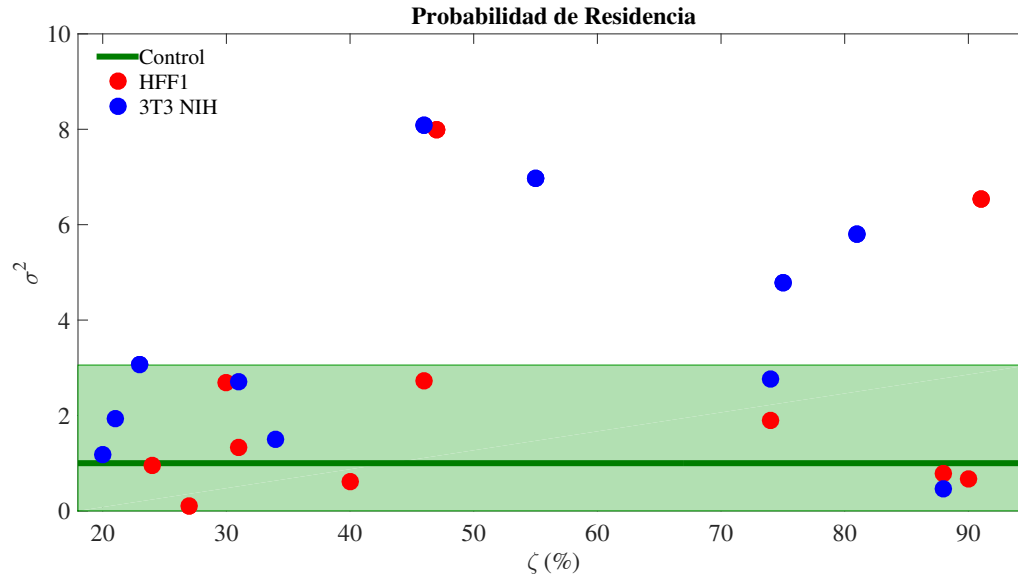


Figura 3.6. Valores de la varianza σ^2 como función de la confluencia celular ζ para todos los experimentos en el estudio. La línea verde nuevamente representa el promedio de las varianzas para los experimentos del grupo control y la franja sombreada el intervalo del 95 % ($2\sigma^2$). Los puntos rojos corresponden a los resultados individuales de los experimentos con la línea HFF1, y los puntos azules a los realizados con la línea 3T3 NIH.

Lo interesante del resultado mostrado en la Fig. 3.6 es que en presencia de las células 3T3 NIH se muestran dos regiones de confluencia donde los parásitos tienden a reunirse. Una de estas regiones se sitúa alrededor de 50% de confluencia y se presenta en dos experimentos, mientras que la otra se genera alrededor del 75% de confluencia igualmente presente en dos experimentos. Sin embargo, en presencia de las células HFF1 se presentan solamente experimentos únicos cercanas a los mismos valores de confluencia. Todos estos puntos corresponden a aquellos experimentos cuyas curvas de MSD presentan una meseta como lo son: H3M1 y H5M1 para la línea HFF1; y N3M1, N4M1, N6M1 y N3M25 para la línea 3T3 NIH (Fig. 3.3).

Mas aún, es importante hacer notar que mientras que para la línea HFF1 los valores de la varianza se encuentran aleatoriamente situados arriba y abajo de la línea control

(línea verde), mostrando con esto un comportamiento azaroso; para las 3T3 NIH, salvo el último punto, todos los demás se muestran por arriba de la línea control. Este resultado podría sugerir por tanto la predilección de los parásitos a reunirse en ciertas regiones en presencia de las células 3T3 NIH.

Capítulo 4

Conclusiones y perspectivas

4.1. Conclusiones

En este trabajo se estudiaron parámetros que permitieron caracterizar el comportamiento de la forma tripomastigote de *T. cruzi* en presencia de fibroblastos 3T3 NIH y HFF1 al variar la confluencia celular de estas. Con base en los resultados obtenidos se puede sugerir que la presencia de estas células sí afecta el movimiento del tripomastigote.

Los resultados para el grupo control mostraron que el nado de los epimastigotes en ausencia de células presenta un nado poco disperso ya que lo realiza en un régimen subdifusivo. Mas aún, los tripomastigotes tienden a distribuirse de manera homogénea por todo el área de estudio, lo cual era de esperar en ausencia de células.

Por su parte, en presencia de las células HFF1, los tripomastigotes pudiesen estar reduciendo aún más su movimiento, presentando valores de λ menores que para el grupo control a tiempos cortos. Para medios semiconfluentes se observa que su dispersión es baja pero sin llegar a restringirse, fenómeno que parece perderse a altas confluencias donde su nado comienza a mostrarse confinado. Además, que al igual que para los del grupo control, los tripomastigotes también suelen distribuirse de manera homogénea en el campo

de estudio.

Del mismo modo, en presencia de las células 3T3 NIH, los parásitos se mueven en un régimen subdifusivo a tiempos cortos sin mostrar diferencia respecto a su movimiento en presencia de los fibroblastos de humano. Sin embargo, para tiempo largos, se observa que a partir de medios semi confluentes los parásitos comienzan a confinar su movimiento. Este resultado se ve reflejado al obtener altos valores de varianza en los mapas de probabilidad de residencia, sugiriendo con esto que los parásitos tienden a agruparse en ciertas regiones a partir de medios semi confluentes.

Cabe mencionar, que para comprobar lo anterior serán necesarios experimentos futuros que permitan aumentar la estadística de los resultados y el mejoramiento de las condiciones experimentales para lograr una mejor reproducibilidad de las condiciones.

4.2. Perspectivas

Se recomienda aumentar la frecuencia de muestreo, ya que con 10 fps es posible que se esté perdiendo mucho de la motilidad del tripomastigote. Esto debido a que su movimiento es muy rápido y esto pudiese estar afectando los resultados del desplazamiento cuadrático medio y evitar a su vez detectar las secciones de nado superdifusivo esperadas en el movimiento de los móviles auto-propulsados.

Así mismo será conveniente grabar más videos y con una mayor duración para aumentar así la estadística en el estudio, además de mejorar el procedimiento de filtraje de los tripomastigote de los videos para obtener la mayor cantidad posible de estos. Para conseguir esto también se recomienda trabajar los experimentos dentro de un dispositivo microfluídico, lo cual ayudará a tener un mejor control de las variables ambientales conllevando con ello a una mejor reproducibilidad de los resultados.

También como parte del trabajo a futuro se sugiere trabajar en los siguientes aspectos:

- **Aspectos biológicos:** Se incluirán al menos la línea celular de fibroblastos 3T3S, así como otro tipo de células como musculares. Se llevarán a cabo cinéticas de infección a corto y largo plazo con los tres estadios del parásito de manera individual y posteriormente en conjunto según sea su probabilidad de coincidencia en una realidad biológica
- **Aspectos físicos:** Se estudiarán parámetros físicos como rapidez promedio, distribuciones de rapidez, componentes de rapidez longitudinal y transversal, componentes de rapidez radial y tangencial respecto a los núcleos de las células; y ángulo de cambio de dirección. Nuevamente se incluirán los datos del coeficiente de difusión y la DPRP.
- **Aspectos bioquímicos:** Se realizarán pruebas de secreción de proteínas en células control y en presencia de parásitos para determinar si existe alguna diferencia que pueda explicar los resultados obtenidos en esta tesis, así como los observados en el proceso de infección para las diferentes líneas celulares.
- **Aspectos de ingeniería:** Se realizará el diseño de diferentes prototipos de dispositivos microfluídicos que permitan tener un mejor control de temperatura y del plano de observación. Se incluirá la variable de flujo para simular una situación más realista del movimiento en vasos sanguíneos.

Al final se espera que al conjuntar toda esta información sea posible formular correlaciones que permitan describir de manera integrativa el comportamiento de los diferentes estadios del parásito y su participación conjunta en el proceso de infección.

Bibliografía

1. Alves L, Scariot D, Guimaraes R, et *al.* Transient superdiffusion and long-range correlations in the motility patterns of trypanosomatid flagellate protozoa. PLoS ONE 11(3): e0152092. doi:10.1371/journal.pone.0152092.
2. Andrade L, Andrews N. The *Trypanosoma cruzi*-host cell interplay: location, invasion, retention. Nature Reviews Microbiology. 2005 doi:10.1038/nrmicrol249.
3. Ballesteros-Rodea G, Santillán M, Martínez-Calvillo S, Manning-Cela R. Flagellar Motility of *Trypanosoma cruzi* Epimastigotes. Journal of Biomedicine and Biotechnology. 2012. doi:10.1155/2012/520380.
4. Débora-Canales D (2012). Análisis estadísticos de las trayectorias del parásito *T. cruzi* en su estadio epimastigote. Tesis. Monterrey: Centro de Investigación y de Estudios Avanzados, Unidad Monterrey.
5. Florencio-Martínez L, Manríquez-Dueñas C, et. *al.* Cellular analysis of host cell infection by different developmental stages of *Trypanosoma cruzi*. Elsevier, Experimental Parasitology. 332 - 336. 2010.
6. Friend W, Smith J. La fisiología de los triatominos con especial referencia a la alimentación por sangre. Factores biológicos y ecológicos en la Enfermedad de Chagas. OPAS, Centro Panamericano de Ecología Humana y Salud, Argentina, Tomo1, Epidemiología - Vectores (Nº especial de Chagas). PP. 55-72.

7. Rogríguez E, Briceño L, et. *al.* Curso latinoamericano sobre enfermedades infecciosas. Nov. 2004. Instituto de Biomedicina, Caracas, Venezuela.
8. Sosa-Hernández E, Ballesteros-Rodea G, Arias-del-Angel J, et. *al.* Experimental and Mathematical-Modeling Characterization of *Trypanosoma cruzi* Epimastigote Motility. PLoS ONE 10(11): e0142478. doi:10.1371/journal.pone.0142478.
9. Tardieux I, Nathanson H, Andrews N. Role in host cell invasion of *Trypanosoma cruzi*-induced cytosolic-free Ca^{+2} transients. J. Exp. Med. 179. 1017–1022. 1994.
10. Toso M. A, Vial U. F, Galanti N. Transmisión de la enfermedad de Chagas por vía oral. Rev. méd. Chile 2011, 139:258-266.
11. Uppaluri S, Nagler J, Stellamanns E, Heddergott N, Herminghaus S, et *al.* Impact of Microscopic Motility on the Swimming Behavior of Parasites: Straighter Trypanosomes are More Directional. PLoS Comput Biol 7(6): e1002058. doi:10.1371/journal.pcbi.1002058.
12. Zingales B, Pereira M, et. *al.* *Trypanosoma cruzi* genome project: biological characteristics and molecular typing of clone CL Brener. Elsevier, Acta Tropical 68. 159 - 173. 1997.
13. Codling E, Plank M, et. *al.* Random walk models in biology. J.R.Soc. Interface(2008) 5,813-834. doi:10.1098/rsif.2008.0014.
14. Berg H. Random Walks in Biology Princeton, United States of America. 1993.
15. Fauci A, Braunwald E, Kasper D, et *al.* Harrison's Principles of Internal Medicine. Mc Graw Hill. 17th edition. 2008. 1300-1305.
16. Ministerio de Sanidad y Política Social. Enfermedad de Chagas en personas procedentes de latinoamérica residentes en España. Sanidad.2009.

17. Open-i - Open Access Biomedical Image Search Engine — Open-i.
https://openi.nlm.nih.gov/detailedresult.php?img=PMC3429381_pntd.0001749.g002
Imagen modificada por Jorge Adrián Arias del Angel.
18. Centers for Disease Control and Prevention.
<http://www.cdc.gov/parasites/chagas/biology.html>.
Imagen modificada por Jorge Adrián Arias del Angel.
19. High Lab Peru.
<http://www.highlabperu.net/enfermedad-de-chagas-tripanosomiasis-americana/>.
Imagen modificada por Jorge Adrián Arias del Angel.
20. Enfermedad de Chagas / Tripanosoma cruzi.
<http://veterinarianava.blogspot.mx/2014/11/enfermedad-de-chagas-tripanosoma-cruzi.html>.

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

*Efecto de la interacción célula - parásito en la motilidad del
Tripomastigote sanguíneo de Trypanosoma cruzi*

Que presenta el **Lic. Jorge Adrián Arias del Angel** para su examen final de **Maestría en Ciencias en Ingeniería y Física Biomédicas**, el día 26 de agosto de 2016.

Dr. Moisés Santillán Zerón

Dra. Rebeca Georgina Manning Cela

Dr. Bruno Alfonso Escalante Acosta

Dr. Jesús Manuel Santana Solano