

TREBALL FINAL DE GRAU
ENGINYERIA DE SISTEMES BIOLÒGICS

Desenvolupament de
mètodes experimentals
de cultius d'amastigots
de *Leishmania* spp. per
millorar la quantificació
dels resultats experimentals

Autora: Berta Raventós Roca

Direcció: Dra. M.Cristina Riera Lizandra
Dr. Daniel López Codina

6 de juliol del 2016



UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE CATALUNYA
BARCELONATECH

Escola Superior d'Agricultura de Barcelona

Resum

La leishmaniosi engloba un conjunt de malalties que causen milers de morts anualment als països del Sud. Aquesta està causada per protozous del gènere *Leishmania* spp., que desenvolupen el seu cicle de vida entre un hoste vertebrat i un vector invertebrat mitjançant el qual es transmeten (flebotoms, família Phlebotominae).

Leishmania spp. pertany a la família Trypanosomatidae, en la que també s'inclouen les espècies del gènere *Trypanosoma* responsables de les diferents formes de tripanosomiasis, coneguda com la malaltia de Chagas al continent Americà i com la malaltia de la son al continent Africà. Totes elles formen part de les 17 malalties tropicals que la Organització Mundial de la Salut (OMS) identifica com a desateses.

L'objectiu principal d'aquest Treball Final de Grau és avançar en les metodologies de quantificació dels resultats experimentals procedents dels cultius *in vitro* d'amastigots de *Leishmania* spp. (forma intracel·lular, pròpia de l'hoste vertebrat).

El treball experimental s'ha realitzat sota la direcció de la Secció de Parasitologia del Departament de Biologia, Sanitat i Medi Ambient a la Facultat de Farmàcia i Ciències de l'Alimentació (Universitat de Barcelona). S'han dut a terme diferents assajos en els que s'han infectat macròfags d'origen peritoneal murí i de línia cel·lular RAW 264.7 amb promastigots (forma extracel·lular, pròpia del vector invertebrat) de diferents espècies del gènere *Leishmania* (*L. infantum*, *L. major* i *L. braziliensis*). Al llarg dels assajos s'han realitzat observacions sobre els procediments utilitzats per l'obtenció de les cèl·lules d'origen peritoneal murí, la infecció i el manteniment dels cultius.

A partir del seu seguiment s'ha pogut establir un patró temporal comú independentment del tipus de macròfags infectats, en el que s'han identificat formes intermèdies extracel·lulars (promastigots que varien la seva morfologia cap a amastigots) i s'ha pogut determinar que el nombre d'amastigots és màxim a les 72 hores.

La digitalització de les preparacions procedents dels cultius s'ha realitzat a l'Escola Superior d'Agricultura de Barcelona (ESAB). S'ha elaborat una col·lecció de més de 700 imatges. Aquestes s'han capturat a 20 i 50 augments per facilitar la comprensió del sistema a nivell dels macròfags i del cultiu.

L'ús de diferents procediments experimentals ha permès avaluar els seus efectes i millorar la metodologia utilitzada. En aquesta línia, hem definit un protocol experimental, tant dels cultius com de la seva digitalització, amb l'objectiu de facilitar el posterior processat de la informació obtinguda.

Per seguir avançant en la comprensió del paràsit, cal seguir treballant per millorar els procediments experimentals i desenvolupar una tècnica d'anàlisi d'imatges que ens permeti processar la informació que se n'obté. De manera paral·lela, cal elaborar un model basat en l'individu (*Individual based Model*; IbM) que ens permeti introduir la complexitat del sistema de manera gradual a nivell individual.

Resumen

La leishmaniosis engloba un conjunto de enfermedades que causan miles de muertes anualmente en los países del Sur. Está causada por protozoos del género *Leishmania* spp., que desarrollan su ciclo de vida entre un hospedador vertebrado y un vector invertebrado mediante el que se transmiten.

Leishmania spp. pertenece a la familia Trypanosomatidae, en la que también se incluyen las especies del género *Trypanosoma* responsables de las diferentes formas de tripanosomiasis, conocida como la enfermedad de Chagas en el continente Americano y cómo la enfermedad del sueño en el continente Africano. Todas ellas forman parte de las 17 enfermedades tropicales que la Organización Mundial de la Salud (OMS) identifica como desatendidas.

El objetivo principal de este Trabajo de Fin de Grado es avanzar en las metodologías de cuantificación de los resultados experimentales procedentes de los cultivos *in vitro* de amastigotes de *Leishmania* spp. (forma intracelular, propia del hospedador vertebrado).

El trabajo experimental se ha realizado bajo la dirección de la Sección de Parasitología del Departamento de Biología, Sanidad y Medio Ambiente de la Facultad de Farmacia y Ciencias de la Alimentación (Universidad de Barcelona). Se han llevado a cabo diferentes ensayos en los que se han infectado macrófagos de origen peritoneal murino y de línea celular RAW 264.7 con promastigotes (forma extracelular, propia del vector invertebrado) de diferentes especies de *Leishmania* spp. (*L. infantum*, *L. major* y *L. braziliensis*). En el transcurso de los ensayos se han realizado observaciones sobre los procedimientos utilizados para la obtención de células de origen peritoneal murino, la infección y el mantenimiento de los cultivos.

A partir de su observación se ha podido establecer un patrón temporal común independientemente del tipo de macrófago utilizado, en el que se han identificado formas intermedias extracelulares (promastigotes que varían su morfología hacia amastigotes) y se ha podido determinar que el número de amastigotes es máximo a las 72 horas.

La digitalización de las preparaciones de los cultivos se ha realizado en la Escuela Superior de Agricultura de Barcelona (ESAB). Se ha elaborado una colección de más de 700 imágenes. Éstas se han capturado a 20 y 50 aumentos para facilitar la comprensión del sistema a nivel de los macrófagos y el cultivo.

El uso de diferentes procedimientos experimentales ha permitido evaluar sus efectos y mejorar la metodología utilizada. En esta línea, hemos definido un protocolo experimental, no sólo de los cultivos sino que también de su digitalización, con el objetivo de facilitar el posterior procesado de la información obtenida.

Para seguir avanzando en la comprensión del parásito, es necesario seguir trabajando para mejorar los procedimientos experimentales y desarrollar una técnica de análisis de imágenes que nos permita procesar la información que se obtiene de ellos. Paralelamente, es necesario elaborar un modelo basado en el individuo (*Individual based Model*; IbM) que nos permita introducir de manera gradual la complejidad del sistema a nivel individual.

Abstract

Leishmaniasis are a group of diseases that cause thousands of deaths every year in the South countries. These diseases are caused by a protozoa of the genus *Leishmania* spp., which develops its life cycle between a vertebrate host and an the invertebrate vector through which they are transmitted (sand flies).

Leishmania spp. belongs to the Trypanosomatidae family, which also includes species of the genus *Trypanosoma*. It causes the different forms of tripanosomiasis, known as Chagas disease in America and sleeping illness in Africa. Both of them are considered by the World Health Organization (WHO) as one of the 17 Neglected Tropical Diseases

The purpose of this work is to go further and deeper in the quantification methods of the experimental results from *in vitro* cultures of *Leishmania* spp. amastigotes (i.e., the intracellular form of the vertebrate stage).

The experimental work has been done in the Parasitology Section of the Department of Health Microbiology and Parasitology of the Faculty of Pharmacy (University of Barcelona). Several assays were carried out, in which macrophages collected from murine animals and from the cell line RAW264.7 were infected with promastigotes (extracellular form of the vector stage) of different species of *Leishmania* (*L. infantum*, *L. major* and *L. braziliensis*).

Different observations on the procedures of collecting murine cells, maintaining and monitoring the cultures were pointed. A common time pattern was established for both types of macrophages. The identification of intermediate forms (promastigotes changing into amastigotes) and the time when amastigotes number reached its maximum peak (72 h) were set up.

The digitalization of the slides from the cultures was done at Barcelona School of Agricultural Engineering (ESAB). More than 700 images were collected. In order to allow for a better understanding the images were captured with 20 and 50 magnification objectives lens.

The use of several experimental procedures allowed to analyse the differences between them and to improve the methodology. An experimental protocol for the cultures and their digitalization was proposed to have a better processing of the obtained information.

The need for improving the experimental protocols and developing an image analysis technique to process the information obtained from them were shown, in order to have a better understanding of the parasite. At the same time, it is necessary to work on an Individual based Model (IbM) in order to introduce the system complexity at an individual level.

Sumari

Índex de figures	6
Índex de taules	7
Agraïments	8
1. Introducció	9
1.1 Malalties tropicals desateses. Malalties provocades per tripanosomàtids.	9
1.2 Leishmaniosi	11
1.2.1 Generalitats	11
1.2.2 Agent etiològic i cicle de vida	13
1.2.3 Aspectes epidemiològics	17
1.2.4 Control	20
1.3 Mètodes experimentals en l'estudi de l'activitat leishmanicida de diferents fàrmacs a través dels cultius <i>in vitro</i> de <i>Leishmania</i> spp.	22
1.4 Models matemàtics	24
1.4.1 Models matemàtics i cultius microbiològics	24
1.4.2 Models de <i>Leishmania</i> spp. i altres trypanosomàtids	26
1.5 Context del treball	28
1.6 Objectius del treball	29
2. Materials i mètodes	31
2.1 Cultius <i>in vitro</i>	31
2.1.1 Obtenció de macròfags	31
2.1.2 Obtenció de promastigots de <i>Leishmania</i> spp.	33
2.2 Infecció de macròfags amb promastigots de <i>Leishmania</i> spp.	35
2.3 Obtenció d'imatges	37

3. Resultats	38
3.1 Observacions de la infecció de macròfags d'origen peritoneal murí amb <i>Leishmania</i> spp	.40
3.2 Observacions de la infecció d'una línia cel·lular de macròfags (RAW 264.7) amb <i>Leishmania</i> spp.	41
3.3 Protocol	44
3.4 Col·lecció d'imatges	46
4. Conclusions	61
5. Perspectives	62
6. Bibliografia	63

Índex de figures

Figura 1. Distribució mundial de les 6NTDs més freqüents	9
Figura 2. Estat endèmic de la leishmaniosi visceral a nivell mundial l'any 2013	12
Figura 3. Estat endèmic de la leishmaniosi cutània a nivell mundial l'any 2013	12
Figura 4: Tipus morfològics dels tripanosomàtids	14
Figura 5. Formes morfològiques de <i>Leishmania</i> spp.	15
Figura 6. El cicle de vida de <i>Leishmania</i>	16
Figura 7. <i>Phlebotomus papatasi</i>	17
Figura 8. Diferències morfològiques de <i>L. donovani</i> en funció de la temperatura, pH i tractaments	22
Figura 9. Imatge digital fluorescent d'una cèl·lula infectada <i>in vitro</i> amb <i>L. donovani</i>	23
Figura 10. Esquema de treball	30
Figura 11. Flascó de cultiu cel·lular	31
Figura 12. Raspat de les cèl·lules adherides al flascó amb un <i>Cell Scrapper</i>	32
Figura 13. Càmera Fuchs-Rosenthal	33
Figura 14. Lab-Tek™	35
Figura 15. Infecció de les cèl·lules adherides als Lab-Tek™	35
Figura 16. Tinció Giemsa	36
Figura 17. Programari Perfect Image 7.6	37
Figura 18. Infecció de cèl·lules d'origen peritoneal murí amb <i>L. infantum</i>	40
Figura 19. Controls de la infecció de cèl·lules RAW 264.7	41
Figura 20. Infecció cèl·lules RAW 264.7 amb <i>L. infantum</i> , <i>L. major</i> i <i>L. braziliensis</i> a les 24 h	42
Figura 21. Infecció cèl·lules RAW 264.7 amb <i>L. infantum</i> , <i>L. major</i> i <i>L. braziliensis</i> a les 48 h	42
Figura 22. Infecció cèl·lules RAW 264.7 amb <i>L. infantum</i> , <i>L. major</i> i <i>L. braziliensis</i> a les 72 h	43
Figura 23. Infecció cèl·lules RAW 264.7 amb <i>L. infantum</i> i <i>L. braziliensis</i> a les 120h	43
Figura 24. Imatges d'un macròfag polinucleat amb amastigots intracel·lulars modificant diferents paràmetres	46
Figura 25. Infecció de cèl·lules d'origen peritoneal murí amb <i>L. infantum</i> a les 24 h	47
Figura 26. Infecció de cèl·lules d'origen peritoneal murí amb <i>L. infantum</i> a les 48 h	48
Figura 27. Infecció de cèl·lules d'origen peritoneal murí amb <i>L. infantum</i> a les 72 h	49
Figura 28. Infecció de cèl·lules RAW 264.7 amb <i>L. infantum</i> a les 24 h	50
Figura 29. Infecció de cèl·lules RAW 264.7 amb <i>L. infantum</i> a les 48 h	51
Figura 30. Infecció de cèl·lules RAW 264.7 amb <i>L. infantum</i> a les 72 h	52
Figura 31. Infecció de cèl·lules RAW 264.7 amb <i>L. infantum</i> a les 120 h	53
Figura 32. Infecció de cèl·lules RAW 264.7 amb <i>L. major</i> a les 24 h	54
Figura 33. Infecció de cèl·lules RAW 264.7 amb <i>L. major</i> a les 48 h	55
Figura 34. Infecció de cèl·lules RAW 264.7 amb <i>L. major</i> a les 72h	56
Figura 35. Infecció de cèl·lules RAW 264.7 amb <i>L. braziliensis</i> a les 24 h	57
Figura 36. Infecció de cèl·lules RAW 264.7 amb <i>L. braziliensis</i> a les 48 h	58
Figura 37. Infecció de cèl·lules RAW 264.7 amb <i>L. braziliensis</i> a les 72 h	59
Figura 38. Infecció de cèl·lules RAW 264.7 amb <i>L. braziliensis</i> a les 120 h	60

Índex de taules

Taula 1. Patologia i distribució de leishmànies patògenes per l'ésser humà.	19
Taula 2. Assajos realitzats al llarg del treball experimental	39
Taula 3. Protocol experimental pels cultius d'amastigots de <i>Leishmania</i> spp. i digitalització	45

Agraïments

Al Daniel López Codina, tutor i company d'aquest treball, per la oportunitat, la confiança i la dedicació. Gràcies per encomanar-me el desig de seguir treballant amb les malalties tropicals desateses.

A la Cristina Riera, la Roser Fisa i la Magdalena Alcover, pels coneixements i la paciència. L'aprenentatge ha estat immens.

A la Clara Prats i a la Trinitat Pradell, pel suport i la disposició. Gràcies per facilitar tant la feina.

I per últim, gràcies a la Núria Pedrós, que amb el seu Treball de Fi de Grau, va obrir les portes a la línia de recerca que es planteja al llarg d'aquest treball.

1. Introducció

1.1 Malalties tropicals desateses. Malalties provocades per tripanosomàtids.

Les malalties tropicals desateses (*Neglected Tropical Diseases; NTD*) són un grup de 17 malalties que prevalen en condicions tropicals i subtropicals de 149 països. Més de mil milions de persones, una sisena part de la població mundial, està afectada per una o més NTDs (Figura 1). Aquestes afecten a les poblacions més vulnerables del planeta, sent pràcticament exclusives de les poblacions pobres i desemparades, que viuen en àrees rurals o suburbis urbans de països del Sud.

Les NTDs suposen un patiment massiu, sent causa d'invalidesa o mort a llarg termini. Provoquen l'estigma i discriminació dels afectats, especialment de dones i nenes. Econòmicament suposen una pèrdua de productivitat, un agreujament de la pobresa i elevats costos de salut. Representen, així, un obstacle pel desenvolupament socioeconòmic que perpetua la pobresa.

Malgrat el patiment i discapacitat que generen, aquestes malalties tenen escassa visibilitat i se'ls assigna una baixa prioritat, ja que afecten exclusivament a poblacions vulnerables que amb prou feines tenen veu política (CDC,2011).

L'Organització Mundial de la Salut (OMS) recomana diferents intervencions de salut pública per accelerar la prevenció, el control, l'eliminació i eradicació de les NTDs. Aquestes inclouen el tractament preventiu a gran escala, una gestió intensificada dels casos als centres d'atenció primària, estratègies de control dels vectors juntament amb mesures de prevenció com l'accés a aigua potable i a un sanejament i higiene bàsic .

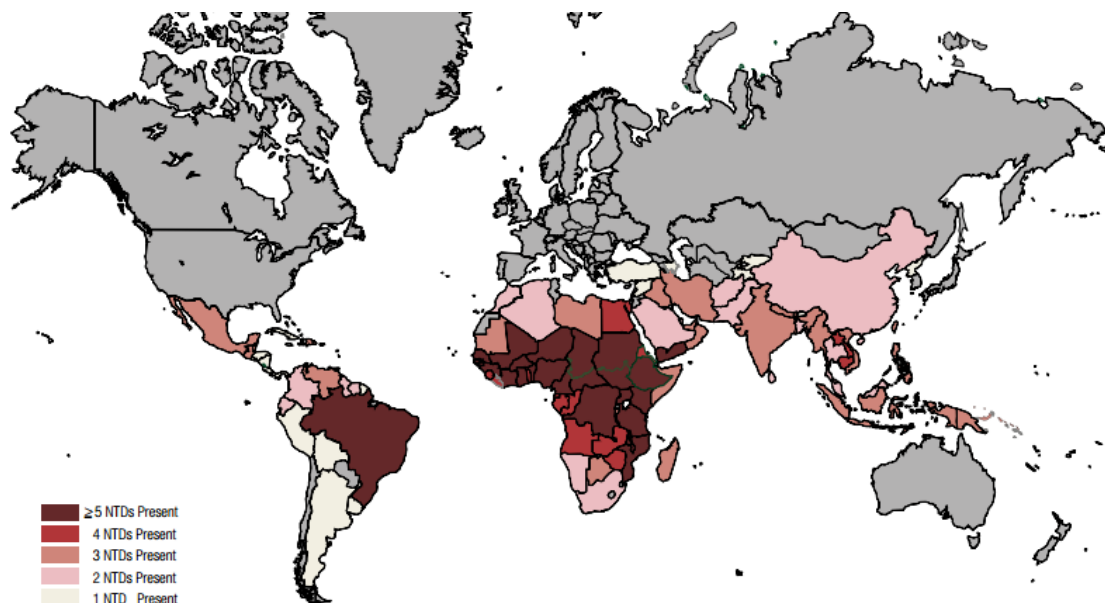


Figura 1. Distribució mundial de les 6 NTDs més freqüents. Ho són: dracunculosi, elefantiasi, oncocercosi, esquistosomiasi, helmintosi i tracoma [Modificat de (*Centres for Disease Control and Prevention; CDC*)].

La tripanosomiasis i la leishmaniosi causen milers de morts anualment als països del Sud. Aquestes estan causades per diferents espècies de protozous del gènere *Trypanosoma* i *Leishmania*, respectivament. Tots dos gèneres pertanyen a la família Trypanosomatidae i presenten un cicle de vida digenètic, en el que viuen entre un hoste vertebrat i un vector invertebrat mitjançant el qual es transmeten.

El paràsit responsable de la tripanosomiasis al continent Americà, coneguda com la malaltia de Chagas, és *Trypanosoma cruzi* i es transmet mitjançant hemípters predadors de la subfamília *Triatominae*. Al continent Africà és coneguda com la malaltia de la son, i és transmesa per dípters hematòfags (*Glossina* spp.). Aquesta es pot presentar com una infecció crònica o aguda causada per *Trypanosoma brucei gambiense* i *Trypanosoma brucei rhodesiense*, respectivament (Pedrós, 2015).

Es coneixen 20 espècies del gènere *Leishmania* causants de la malaltia, transmesa mitjançant dípters nematòcers de la família *Phlebotomus* (OMS, 2015).

El coneixement de l'impacte de les dues malalties és escàs, i el diagnòstic, tractament i seguiment dels afectats, és difícil i costós. Actualment no existeixen eines pel seu control a gran escala, fet que posa en evidència la necessitat tant de destinar recursos per la recerca com per la conscienciació de la població dels països desenvolupats sobre els seus efectes.

1.2 Leishmaniosi

1.2.1 Generalitats

La leishmaniosi engloba un grup de malalties causades per un protozou paràsit del gènere *Leishmania*, transmès mitjançant la picada de flebòtoms femella infectats.

La malaltia, associada a les poblacions més pobres d'Àfrica, Àsia i Amèrica Llatina, està vinculada a la malnutrició, als desplaçaments de població, les males condicions d'habitatge, a un sistema immunitari deprimat i, en general, a la manca de recursos.

La leishmaniosi segueix sent una de les malalties més desateses a nivell mundial; s'estima que es produeixen entre 900000 i 1.3 milions de casos nous i entre 20000 i 30000 morts anualment.

Es coneixen 20 espècies del gènere *Leishmania* causants de la malaltia, juntament amb 90 espècies transmissores i 70 espècies que poden actuar com a reservoris naturals del paràsit. Aquest fet, juntament amb les característiques ecològiques de cada zona, es tradueix amb una alta diversitat clínica i epidemiològica de la malaltia (OMS, 2015).

Manifestacions clíniques principals

Existeixen tres formes principals de leishmaniosi (OMS, 2015):

- Visceral (LV) o kala-azar: Caracteritzada per episodis irregulars de febre, pèrdua de pes, augment de la grandària de la melsa i el fetge, i anèmia. És altament endèmica al subcontinent indi i a l'Àfrica oriental. Cada any s'estima que es produeixen entre 200000 i 400000 casos nous, un 90 % dels quals a Bangladesh, Brasil, Etiòpia, Índia, Sudan i Sudan del sud (Figura 2).

La leishmaniosi dèrmica poskala-azar (PKDL) és una seqüela de la leishmaniosi visceral. Es caracteritza per una erupció macular, papular o nodular localitzada habitualment a la cara, braços, tronc i altres parts del cos. Aquesta manifestació es troba principalment a l'Àfrica Oriental i el subcontinent indi, on fins el 50 % i entre el 5 i el 10 % dels pacients amb LV desenvolupen la malaltia entre 6 mesos i varis anys després de la curació aparent. Es considera que les persones afectades són una font potencial d'infecció. Es produeix a totes les zones on *L. donovani* és endèmica.

- Cutània (LC): Forma més freqüent de leishmaniosi. Produeix lesions cutànies generalment ulceroses a les zones exposades del cos, deixant cicatrius de per vida que poden ser causa de discapacitat greu. Les característiques clíniques tendeixen a presentar variacions entre les regions i dins d'una mateixa regió, depenent de l'espècie del paràsit o del seu cicle zoonòtic, l'estat immunitari del pacient i, probablement, d'una condició genètica a la seva resposta.

El 95 % dels casos es produeix a les Amèriques, la conca del Mediterrani, Orient Mig i Àsia central. Més de dos tercers parts dels casos nous apareixen a Afganistan, Algèria, Brasil, Colòmbia, República Islàmica del Iran i la República àrab de Síria (Figura 3). Es calcula que cada any es produeixen entre 0.7 i 1.3 milions de casos nous.

- Mucocutània (MC): Provoca la destrucció parcial o completa de les membranes mucoses del nas, boca i gola. Aproximadament un 90 % dels casos es produeixen a Brasil, l'Estat plurinacional de Bolívia i Perú. Casi mai cura espontàniament i les infeccions bacterianes secundàries són freqüents.

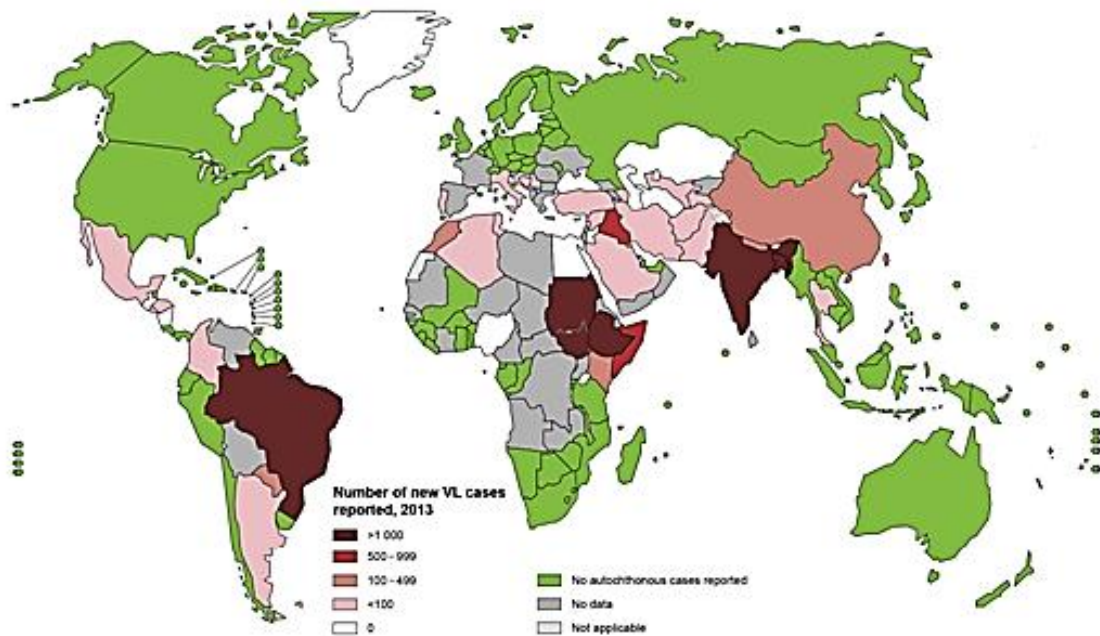


Figura 2. Estat endèmic de la leishmaniosi visceral a nivell mundial l'any 2013 [Modificat de (OMS)]

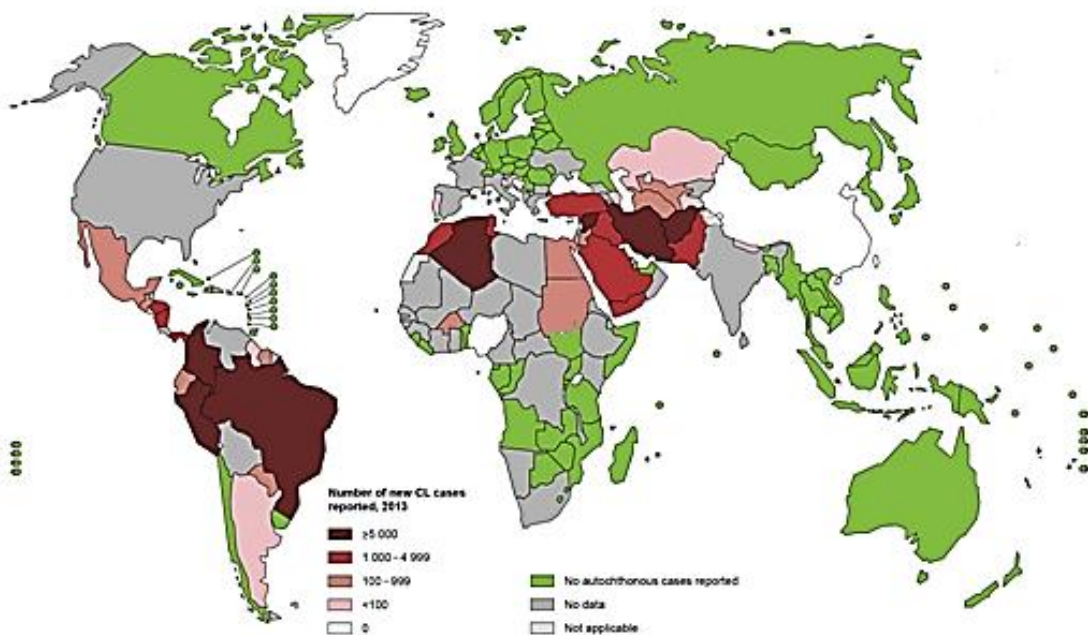


Figura 3. Estat endèmic de la leishmaniosi cutània a nivell mundial l'any 2013 [Modificat de (OMS)]

1.2.2 Agent etiològic i cicle de vida

Leishmania és un protozou monoflagelat de l'ordre Kinetoplastida. Els cinetoplàstids es distingeixen per la presència d'un cinetoplast associat al blefaroplast flagel·lar, així com pels seus hàbits hemolimfàtic i tissular en els seus hostes vertebrats, i entèric en els invertebrats que compleixen el seu paper de vectors.

Els cinetoplàstids d'interès sanitari s'inclouen dins de la família dels tripanosomàtids. Aquests són paràsits del tub digestiu d'insectes molt diversos, altres ho són dels vasos lactífers d'algunes plantes i que són transmesos entre elles per insectes. Existeix un tercer grup, que inclou nombroses formes que alternen el seu parasitisme entre vertebrats, l'home entre ells, i invertebrats, fonamentalment insectes.

A més de la presència del cinetoplast, els cinetoplàstids que parasiten els vertebrats es caracteritzen per posseir un únic flagel, que, segons el seu estadi evolutiu, pot formar el marge d'una membrana ondulant, quedar lliure, o desaparèixer en els estadis que viuen intracel·lularment.

El seu cos està revestit per una pel·lícula reforçada per una capa de microtúbuls subpel·liculars nombrosos que la recorren longitudinalment. En una zona de la pel·lícula, de localització variable segons tipus morfològic aquesta es troba reduïda a la membrana plasmàtica, que s'invagina més o menys profundament formant la cisterna flagel·lar, fins a arribar a la zona on es troba el bleferoplast del qual neix l'únic flagel, que pot quedar lliure o formar el marge ondulant. Aquest, també anomenat cos basal, té la mateixa estructura que un centríol, un cercle de 9 triplets de microtúbuls complets que formen la generatriu d'un cilindre, sent inexistent el parell de triplets central. L'axonema, un filament axial que neix del blefaroplast, està format per un complex de microtúbuls i constitueix part del flagel.

En el citoplasma, i a més de la resta d'òrgànuls ordinaris, s'hi troba un mitocondri molt desenvolupat en què s'hi diferencia una regió, el cinetoplast, la matriu del qual engloba un llarg filament de DNA estretament apretat que se situa sempre en la proximitat del blefaroplast.

La situació de la cisterna flagel·lar i la presència de membrana ondulant o de flagel desproveït d'ella, o la reducció del flagel al seu axonema intracitoplasmàtic, permeten distingir fins a nou tipus morfològics diferents en els tripanosomàtids, dels quals únicament sis es presenten durant el cicle biològic de les espècies pertanyents als gèneres amb interès sanitari (Figura 4) (Gállego, 2001):

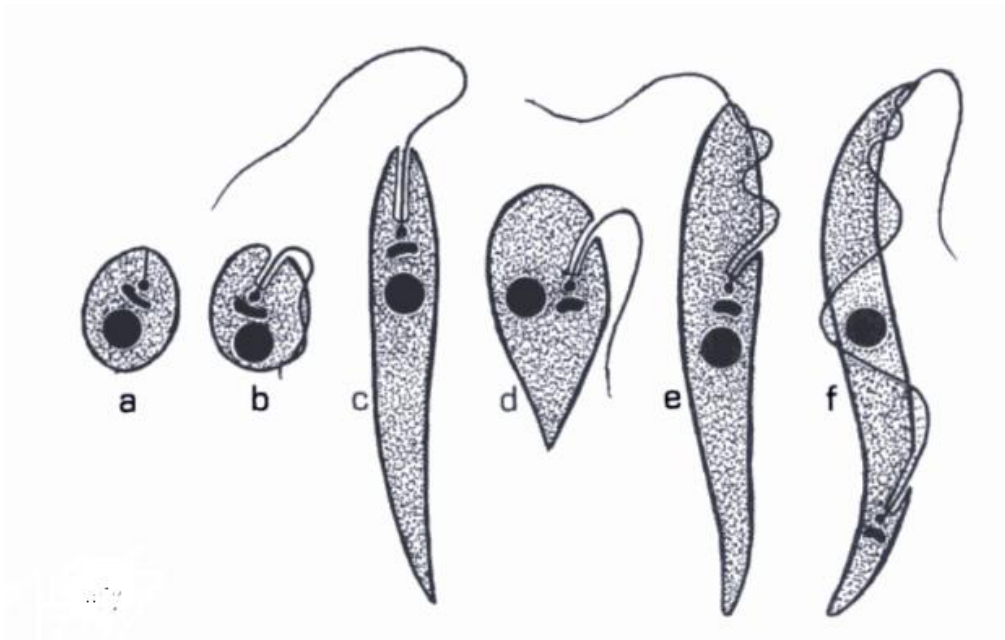


Figura 4: Tipus morfològics dels tripanosomàtids. a, amastigota; b, esferomastigota; c, promastigota; d, paramastigota; e, epimastigota; f, tripomastigota [Extret de (Gállego, 2001)] .

- El tipus tripomastigota, amb la cisterna flagel·lar i el blefaroplast en situació postnuclear i amb la presència d'una membrana ondulant el flagel recurrent de la qual pot prolongar-se o no més enllà d'aquesta membrana.
- El tipus epimastigota, diferenciat de l'anterior perquè la cisterna flagel·lar es localitza en la regió prenuclear del citoplasma.
- El tipus promastigota, amb el cinetoplast prenuclear i la cisterna flagel·lar fins a la zona apical del cos, per on surt el flagel lliure en tota la seva llargada.
- El tipus paramastigota, diferenciat únicament de l'anterior per la situació del cinetoplast i el blefaroplast, en posició lateral respecte al nucli.
- El tipus amastigota que, a més de la seva forma oval o subesfèrica, es distingeix de tots els anteriors per l'absència d'un flagel extern, ja que l'axonema emergeix fora de la cisterna flagel·lar.
- El tipus esferomastigota que, a més de la seva forma, es diferencia de l'anterior perquè existeix un petit flagel extern lliure que es plega sobre el seu cos.

Morfologia del gènere *Leishmania*

Leishmania presenta un cicle digenètic, ja que realitza part del seu cicle en un hoste invertebrat i en un segon hoste vertebrat (Olsen, 1986).

El protozou es desenvolupa i multiplica com a amastigots paràsits intracel·lulars en les cèl·lules macrofàgiques del sistema mononuclear fagocític de la pell, la medul·la òssia, el fetge, la melsa i els nòduls limfàtics de mamífers i rèptils, i com a promastigots al tub canal digestiu del vector invertebrat, i als cultius (Figura 5).

La forma amastigota, l'única que es desenvolupa i multiplica en l'hoste vertebrat, mostra una estructura molt simple quan s'observa al microscopi òptic amb una tinció prèvia amb els colorants d'ús habitual en hematologia.

Les leishmànies es veuen com a petits corpuscles ovals, de 3-5 µm de grandària, en què s'hi pot distingir un nucli voluminós i un corpuscle bacil·liforme que correspon al cinetoplast. El blefaroplast i l'axonema no solen distingir-se.

Les formes promastigotes tenen un aspecte fusiforme i fan entre 7 i 15 µm de llarg, i si bé el flagel és l'única part dels orgànuls cinètics que es pot distingir més o menys netament quan s'observen en fresc, un cop tenyides es poden observar nítidament el nucli, el cinetoplast prenuclear i el flagel (Gállego, 2001).

A la superfície de la membrana cel·lular s'han identificat una sèrie de molècules relacionades amb la capacitat invasiva del paràsit, que mitjançant un sistema d'ancoratge, afavoreixen la penetració del protozou als macròfags (Alvar, 2001).

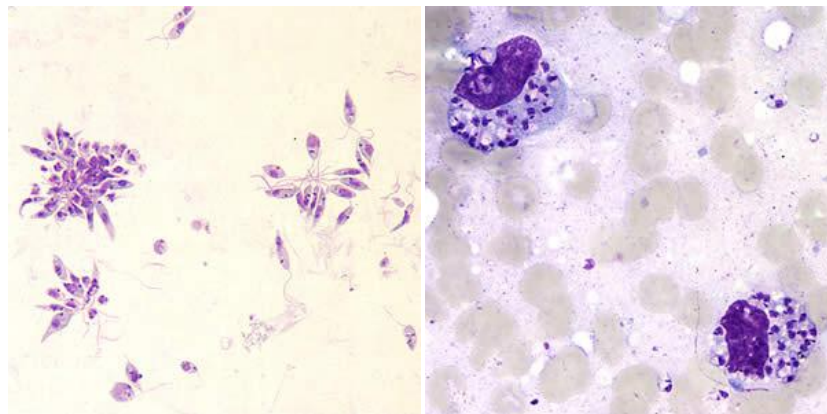


Figura 5. Formes morfològiques de *Leishmania* spp. Promastigots (esquerra) i amastigots intracel·lulars (dreta). [Extret de (*Centres for Disease Control and Prevention, CDC*)]

Cicle de vida

Les leishmànies en forma amastigota ingerides pel vector, espècies del gènere *Phlebotomus* al Vell Món i del gènere *Lutzomyia* al Nou Món, es multipliquen sota la mateixa forma en la fase inicial del cicle. Ràpidament, passen a la forma promastigota, sota la qual té lloc una activa multiplicació a la llum de l'estómac i de l'intestí del insecte, fins que, després d'haver passat per una forma paramastigota, donen de nou origen a noves formes promastigotes, anomenades metacíclics o infestants, que, ja en la cavitat bucal del flebotom, s'encarregaran del pas del paràsit a un nou hoste vertebrat quan aquest sigui picat pel flebotom.

Un cop arribats a un hoste vertebrat adient, els promastigots metacíclics són fagocitats pels macròfags de la dermis en els quals, envoltats per la membrana plasmàtica convertida en la paret d'un vacúol parasitòfor, eviten els processos digestius subsegüents a la fagocitosis.

Els paràsits es multipliquen activament com a amastigots a través de successives divisions binàries, fins que la cèl·lula lisa i els amastigots lliures són capturats per altres cèl·lules fagocítiques que continuaran les seves multiplicacions i, amb elles, la invasió de l'organisme hoste.

Aquesta invasió pot quedar limitada als macròfags de la dermis, amb lesions de tipus dèrmic més o menys localitzades, coneguda com leishmaniosi cutània, o pot passar a envair subsegüentment les mucoses labial, nasal i bucal, donant així lloc a leishmaniosis de tipus mucocutani. El paràsit, transportat pels macròfags circulants i pel torrent circulatori, pot passar a envair òrgans rics en cèl·lules macrofàgiques fixes (melsa, fetge, etc.) donant a lloc a infestacions generalitzades conegudes com a leishmaniosi visceral (Gállego, 2001).

La progressió de la leishmaniosi recau en l'eficàcia de la resposta immunitària i la virulència del protozou. La interacció entre *Leishmania* i la resposta de l'hoste humà determina no només en el desenllaç clínic de la malaltia, sinó que també per les taxes de curació espontània i de recurrència. Les respostes immunitàries excessives o deficientes poden conduir a presentacions cròniques de la malaltia (OMS, 2010).

La multiplicació de les espècies de *Leishmania* en les diferents porcions del tracte digestiu dels vectors permet la seva classificació en hipo-, peri- i suprapilàries. Les primeres són les més primitives a nivell evolutiu i, actualment, estan representades per *Sauroleishmania* spp.. Aquestes són pròpies de rèptils i es transmeten amb vectors del gènere *Sergentomyia*. Les leishmànies de multiplicació periplòrica s'agrupen en el subgènere *Viannia*, i parasiten mamífers primitius com els armadillos, els peresosos i els ossos formiguers. Els individus del subgènere *Leishmania* es multipliquen en les porcions suprapilòriques (pròximes a la probòscide) i són parasitàries de mamífers més actuals, com l'home (Ezquerria, 2001).

Els paràsits varien constantment la forma externa i la estructura interna a mesura que van d'un hoste a un altre (Figura 6). Aquest procés es completa en 24 hores a una temperatura de 25 a 28 °C (Olsen, 1986).

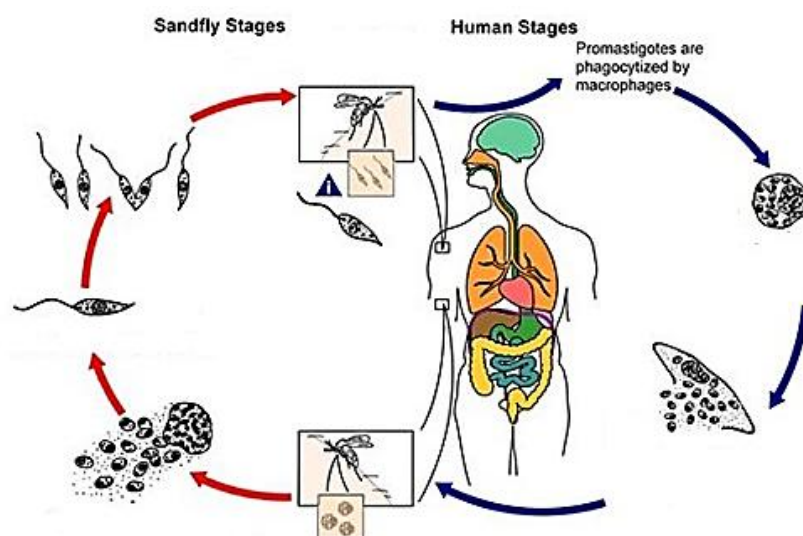


Figura 6. El cicle de vida de *Leishmania*. Els promastigots es transformen a amastigots en l'hoste vertebrat (fletxes blaves) i els amastigots de dins els macròfags es transformen a promastigots dins del vector (fletxes vermelles). [Modificat (Centres for Disease Control and Prevention; CDC)]

De forma general s'accepta la multiplicació asexual, per bipartició longitudinal dels promastigots, amb excepció de les formes metacíclics que no es divideixen. La divisió s'inicia al nucli, després al cos basal i finalment es forma el flagel i el soma. Els amastigots poden dividir-se per bipartició o divisió múltiple (Alvar, 2001).

1.2.3 Aspectes epidemiològics

L'epidemiologia de la leishmaniosi depèn de l'espècie del paràsit, les característiques ecològiques de les zones de transmissió, l'exposició actual i passada de la població humana al paràsit, i del comportament humà, de caràcter molt variable.

Un fet que augmenta la importància sanitària de la leishmaniosi és el canvi sofert en quant als grups de població afectats per la leishmaniosi visceral. Coneguda fins fa uns anys com una afecció preferent en la població infantil, en el moment actual ha passat a ser observada amb una notable freqüència en els adults infectats amb el VIH, en els quals es detecten més de la meitat de les leishmaniosis visceral, que evolucionen d'una manera explosiva, acompanyada d'una falta de resposta als fàrmacs emprats pel seu tractament. En aquest grup de població, i concretament a Europa, la major part dels seus components són persones drogodependents que adquireixen la parasitosi a través de l'ús de xeringues infectades (Gállego, 2001).

La leishmaniosi també es pot transmetre per transfusió de sang i de forma congènita de mare a fill. Aquestes formes de transmissió són més rares que la transmissió per vectors, és per això que aquesta secció es centra en l'epidemiologia de la malaltia en zones amb transmissió vectorial (Figura 7) (OMS, 2010).



Figura 7. *Phlebotomus papatasi*, principal vector de leishmaniosi al Vell Món [Extret de lookfordiagnosis.com]

Entre les principals característiques de l'epidemiologia de la leishmaniosi en molts entorns es troben les pronunciades fluctuacions estacionals i interanuals de la seva incidència, condicionades per factors climàtics, per la dinàmica de poblacions del vector i de l'hoste reservori, i pels comportaments i moviments humans.

Les condicions en les que s'infecta l'ésser humà varien considerablement amb el temps i el lloc. En molts focus de la malaltia la leishmaniosi és una zoonosis, i la "intrusió" de l'ésser humà en els cicles selvàtics representa un augment del risc d'infecció. En altres casos la transmissió és antroponòtica, de naturalesa domèstica o peridomèstica (OMS, 2010).

A la Taula 1 es mostra un recull de la diversitat entre les diferents espècies causants de la malaltia, les seves manifestacions clíniques i la seva distribució.

Focus principals i comportament humà:

Vell Món

A la conca del mediterrani, la principal forma de la malaltia és la leishmaniosi visceral, una zoonosis causada per *L. infantum*. Es produeix en zones rurals, pobles de regions muntanyoses i en algunes zones periurbanes, on les leishmànies viuen en gossos i altres animals.

Als focus antroponòtics de Bangladesh, India i Nepal, la principal forma de la malaltia és la leishmaniosi visceral. La transmissió es produeix generalment per *P. argentipes* en zones rurals situades a menys de 600 metres per sobre el nivell del mar, amb altes precipitacions anuals, una humitat mitjana superior al 70 %, temperatures entre 15 i 38 °C, vegetació abundant, aigües subterrànies i sòl al·luvial. La malaltia és més habitual en pobles agrícoles, on les parets de les cases estan fetes de fang i terra, i el bestiar i els animals viuen prop dels éssers humans.

A l'Àfrica Oriental es produeixen brots freqüents de leishmaniosi visceral a la sabana septentrional de *Acacias-Balanites*, on el principal vector és *P. orientalis*, així com en la sabana meridional i la selva, amb els vectors *P. martini* i *P. celiae*, on els flebòtoms viuen prop dels tèrmits.

Al Vell Món, *L. major* i *L. aethiopica* causen leishmaniosi cutània zoonòtica. El risc pot augmentar amb l'inici de projectes agrícoles i l'ampliació de sistemes de reg, que acompanyen la intrusió d'un gran nombre d'immigrants no immunes al cicle selvàtic existent. En els focus de LC per *L. aethiopica* d'Etiòpia i d'altres regions de l'Àfrica Oriental, es produeix un augment en el contacte entre les persones i el vector en pobles construïts sobre colines rocoses o en les lleres dels rius, hàbitat natural de damans i de *P. pedifer*.

La leishmaniosi cutània per *L. tropica* es produeix en un cicle predominantment antroponòtic. Aquesta és una malaltia urbana i periurbana que es caracteritza per grans brots en ciutats densament poblades, especialment en un context de guerra i de migració a gran escala.

Al Vell Món les lesions mucoses són rares, encara que qualsevol espècie pot causar-les. Poden aparèixer en pacients de la India i Sudan amb LV, PKDL o coinfectats amb el VIH. La gent gran i les persones immunodeprimides poden presentar lesions de la mucosa bucal o laríngia causades per *L. infantum*, *L. major* o *L. tropica* (OMS, 2010).

Nou Món:

La leishmaniosi visceral present a les Amèriques es deu a la transmissió zoonòtica de *L. infantum*, i la seva epidemiologia és molt similar al observada a la conca mediterrània. Es creu que la costum de tenir animals domèstics a l'interior dels habitatges atrau els flebòtoms i facilita la infecció humana, doncs els gossos són hostes reservoris de *L. infantum* i atrauen *Lu. longipalpis*.

L'epidemiologia de la leishmaniosi cutània en aquesta regió és complexa i presenta variacions en els cicles de transmissió, els reservoris animals, els flebotoms vectors, les manifestacions clíniques, la resposta al tractament; a més, hi ha múltiples espècies de *Leishmania* circulants en la mateixa zona geogràfica. Tots els cicles de LC en el Nou Món són predominantment zoonòtics, però els hostes reservoris presenten variacions d'espècie i localització, i en molts casos no es coneixen plenament.

El terme leishmaniosi mucocutània només s'aplica correctament a la malaltia observada al Nou Món i és causada per espècies del complex *L. braziliensis* i *L. panamensis*, pertanyents al subgènere *Viannia* (OMS, 2010).

Taula 1. Patologia i distribució de leishmanies patògenes per l'ésser humà. Entre parèntesi s'indica el subgènere de l'espècie. [Modificat de (Prats, 2006)]

Espècie/complex		Patologia	Distribució
<i>L. donovani complex</i>	<i>L. (L.) donovani</i>	Visceral PKDL	Subcontinent indi, península aràbiga. Àfrica Oriental i Xina
	<i>L. (L.) infantum</i>	Visceral i Cutània	Conca mediterrània
	<i>L. (L.) chagasi</i>	Visceral i Cutània	Amèrica central i nord de l'Amèrica del Sud
<i>L. (L.) tropica</i>		Cutània antropònica	Europa oriental, Àsia Central i focus aïllats Àfrica
<i>L.(L.) major</i>		Cutània zoonòtica	Nord i centre d'Àfrica i Àsia occidental (Península Aràbiga inclosa)
<i>L. (L.) aethiopica</i>		Cutània	Etiòpia, Kenya
<i>L. mexicana complex</i>	<i>L. (L.) mexicana</i>	Cutània	Sud Texas, Mèxic, Centre Amèrica, nord d'Amèrica del Sud
	<i>L. (L.) amazonensis</i>	Cutània difusa	Conca amazònica (nord del Brasil)
	<i>L. (L.) venezuelensis</i>	Cutània	Veneçuela
<i>L. braziliensis complex</i>	<i>L. (V.) braziliensis</i>	Mucocutània, Cutània	Brasil i Veneçuela
	<i>L. (V.) peruviana</i>	Cutània	Perú i Argentina
<i>L. guyanensis complex</i>	<i>L. (V.) guyanensis</i>	Cutània	Amèrica sud (exceptuant Argentina i Xile)
	<i>L.(V.) panamensis</i>	Cutània i Mucocutània	Panamà, Costa Rica, Colòmbia.

1.2.4 Control

Prevenció i control

Degut a que la transmissió es produeix en un sistema biològic complex que engloba l'hoste humà, el paràsit, el vector i, en alguns casos un reservori animal, la prevenció i control de la leishmaniosi requereixen una combinació d'estratègies d'intervenció. Les principals estratègies inclouen (OMS, 2015):

- El diagnòstic prematur i la gestió eficaç dels casos per reduir la prevalença de la malaltia i prevenir els seus efectes. Actualment existeixen medicaments molt eficaços i segurs contra la leishmaniosi, especialment de tipus visceral, i cada cop es millora l'accés a aquests.
- El control dels vectors per reduir o interrompre la transmissió de la malaltia, especialment al context domèstic. Els mètodes de control inclouen els insecticides en aerosol, les mosquiteres tractades amb insecticida, la gestió del medi ambient i la protecció del personal.
- La vigilància eficaç de la malaltia. La detecció i el tractament prematur dels casos ajuda a reduir la transmissió i contribueix a vigilar la propagació i la càrrega de la malaltia.
- El control dels reservoris animals és complex i ha d'adaptar-se a la situació local.
- La mobilització social i la consolidació de les aliances per tal de mobilitzar i informar a les comunitats mitjançant estratègies de comunicació adaptades a la situació local. Les aliances i la col·laboració amb diferents sectors interessats i altres programes de lluita contra malalties transmeses per vectors són essencials a tots els nivells.

La resposta de la OMS engloba el següent:

- Recolzament als programes nacionals de lluita contra la leishmaniosi.
- Activitats de sensibilització i promoció respecte la càrrega mundial de la malaltia, i foment d'un accés equitatiu a la prevenció i gestió dels casos.
- Elaboració de directrius, estratègies i normes polítiques basades en dades científiques per la prevenció i la lluita contra la leishmaniosi, i vigilància de la seva aplicació.
- Prestació de recolzament tècnic als Estats Membres amb l'objectiu de crear un sistema de vigilància i mecanismes de preparació i resposta sostenibles i eficaços.
- Enfortiment de la col·laboració i coordinació entre els associats, les parts interessades i altres organismes.
- Seguiment de la situació i les tendències de la leishmaniosi al món i mesura dels progressos en la lluita contra la malaltia, i finançament.
- Promoció d'investigacions sobre els mitjans per lluitar eficaçment contra la leishmaniosi, especialment pel que fa referència a medicaments, eines de diagnòstic i vacunes segures, eficaços i assequibles, i difusió dels resultats de la investigació (OMS,2015).

Diagnòstic i tractament

El diagnòstic de la LV es realitza mitjançant la combinació d'un examen clínic amb probes parasitològiques o serològiques.

Les proves serològiques tenen un valor limitat en les LC i MC. En el cas de la leishmaniosi cutània, el diagnòstic es confirma quan els anàlisis parasitològics corroboren les manifestacions clíniques.

La leishmaniosi és una malaltia que es pot tractar i curar. El tractament de la leishmaniosi només s'administra un cop es confirma la malaltia i depèn de diferents factors, com la forma i extensió de la malaltia, l'espècie del paràsit i la ubicació geogràfica.

Tots els pacients diagnosticats amb LV requereixen l'administració immediata d'un tractament complet. El tractament dels pacients amb formes cutànies de la malaltia, que no posen en risc la vida del malalt, presenta un ventall més ampli que inclou intervencions terapèutiques, tractaments tòpics i sistemàtics.

Els antimonials pentavalents són el tractament convencional per la LV, i s'administren per via intramuscular o intravenosa, i directament a les lesions en el cas de LC. Aquest principi actiu presenta un elevat risc d'intolerància, provocant reaccions d'hipersensibilitat, insuficiència renal, cardíaca o hepàtica en alguns dels pacients tractats.

Malgrat la comercialització d'alguna vacuna contra la leishmaniosi canina al Brasil i recentment a Europa, no hi ha cap vacuna d'ús general en humans (OMS, 2010).

1.3 Mètodes experimentals en l'estudi de l'activitat leishmanicida de diferents fàrmacs a través dels cultius *in vitro* de *Leishmania* spp.

Malgrat els amastigots són els responsables de totes les manifestacions clíniques en l'hoste vertebrat, la majoria d'informació del funcionament metabòlic i molecular de *Leishmania* es deriva d'estudis realitzats amb formes promastigotes, fàcils de mantenir en cultius *in vitro* entre 25 i 28 °C. Els amastigots s'han obtingut de cultius *in vitro* de macròfags d'origen peritoneal murí i d'altres línies cel·lulars o de teixits infectats. Aquestes preparacions són sovint contaminades amb components absorbits de l'hoste, fet que pot dificultar-ne el cultiu.

Els anomenats amastigots axènics són formes similars als amastigots presents en mamífers però que apareixen fora de la cèl·lula. La transformació dels promastigots a amastigots axènics s'inicia amb un augment de la temperatura, sola o combinada amb una reducció del pH (Figura 8). Aquestes formes, arrodonides i sense flagel, tenen una capacitat infectiva superior a la dels promastigots *in vivo* i *in vitro*, similar a la dels amastigots intracel·lulars. Els amastigots axènics reverteixen a promastigots quan la temperatura disminueix fins als 26 °C (Gupta et al., 2001).

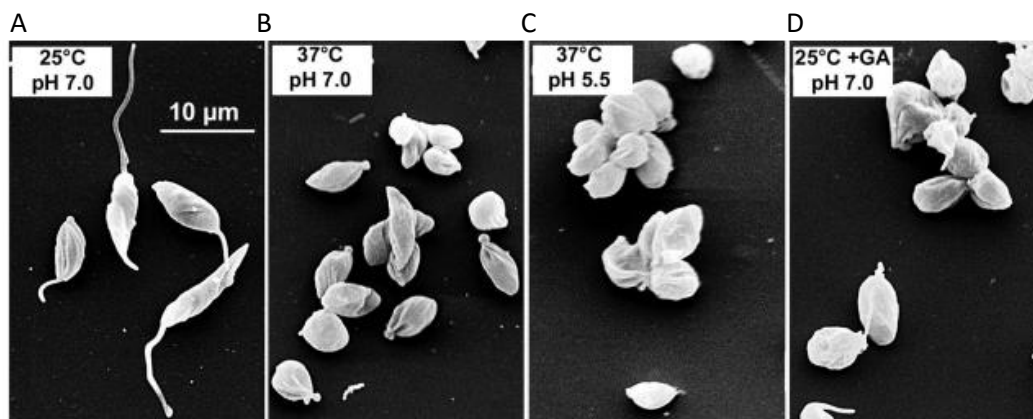


Figura 8. Diferències morfològiques de *L.donovani* en funció de la temperatura, pH i tractaments aplicats. Cultiu de promastigots a 25 °C (A), cultiu incubat durant 24 h a 37 °C (B), amastigots axènics després de 5 d a 37 °C i pH 5.5 (C) i paràsits tractats a 25 °C amb 100 ng Geldamicina/ml a les 24 h(D). Imatges capturades amb microscopi electrònic de rastreig (SEM) .[Extret de (Wiesiggl & Clos, 2001)]

Els estudis amb cultius *in vitro* de promastigots i amastigots axènics són utilitzats principalment per l'*screening* de medicaments anti-leishmania. Aquests poden no ser apropiats degut a les significatives diferències cel·lulars, fisiològiques, bioquímiques i moleculars amb els amastigots intracel·lulars. Els estudis amb models d'amastigots intracel·lulars es consideren els més similars a les condicions patofisiològiques de la leishmaniosis, i els més apropiats pel seu *screening in vitro* (Jain et al., 2012).

L'*screening* consisteix en la determinació de l'índex d'infecció, utilitzat com una mesura del creixement i supervivència del paràsit. Aquest es determina multiplicant el percentatge de macròfags infectats per la mitjana de leishmànies per cèl·lula (Leal et al., 2012).

Hi ha diferents mètodes disponibles per l'*screening* de medicaments en models d'amastigots intracel·lulars. Els estudis es poden realitzar mitjançant macròfags extrets d'hostes animals com cèl·lules d'exsudat peritoneal, cèl·lules mononuclears de sang perifèrica, macròfags

derivats de la medul·la òssia o de línies cel·lular de monòcits de ratolí (J774 i RAW264.7) i humanes (THP1,U937, HL-60).

Els macròfags recol·lectats d'animals murins no es divideixen naturalment, però les seves preparacions poden tenir poblacions no homogènies. Les cèl·lules de línia cel·lular són naturalment homogènies i són més adequades per l'*screening* d'amastigots intracel·lulars (Jain et al., 2012)

El comptatge clàssic de cèl·lules i paràsits es realitza manualment al microscopi, i malgrat ser una feina molt laboriosa, pot ser poc acurada.

Actualment s'estan estudiant mètodes automàtics per l'avaluació de l'índex d'infecció a través de tècniques d'anàlisi d'imatge. Aquestes fan servir la segmentació individual del nucli i el citoplasma dels macròfags així com la segmentació i localització del paràsit de les imatges obtingudes amb un microscopi de fluorescència (Figura 9). Aquestes tècniques es poden combinar amb filtres locals a les zones de la imatge que presenten la mida específica del objecte que volen detectar (Leal et al., 2012).

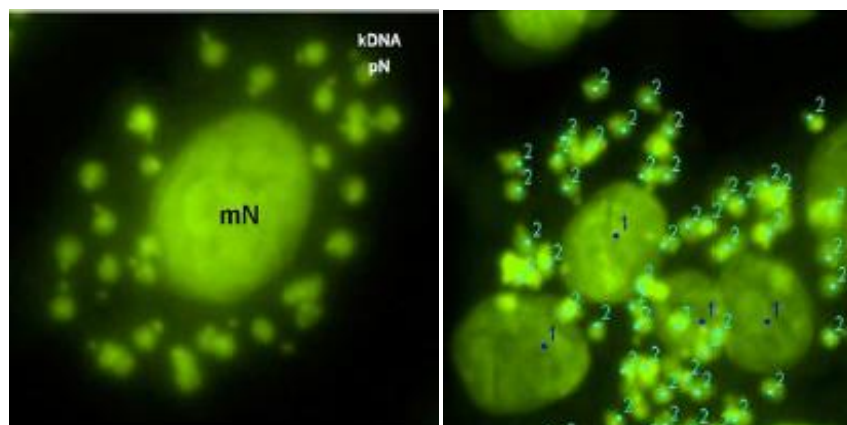


Figura 9. Imatge digital fluorescent d'una cèl·lula infectada *in vitro* amb *L. donovani*. Es diferencien el nucli del macròfag (mN, 1) i el del paràsit (pN,2). [Extret de (Jain et al., 2012)]

1.4 Models matemàtics

1.4.1 Models matemàtics i cultius microbiològics

Els models són una representació ideal d'un aspecte concret de la realitat física emprada amb finalitats d'interpretació i quantificació dels fenòmens i dels comportaments.

Modelitzar és una activitat fonamental entre els humans: utilitzem els models per comunicar una perspectiva del món. Qualsevol sistema amb els seus objectes específics i les relacions està definit, si no és arbitrari, per cert grau de conveniència.

Un sistema pot ser considerat com una capsula negra (un objecte del sistema, S) amb una sola entrada (excitació, E), i una sola sortida (resposta, R) en el que qualsevol estructura addicional de la forma dels objectes i les relacions podria ser proporcionada dins la mateixa caixa. La sortida és produïda per l'objecte com a resposta a l'entrada.

Aquest marc conceptual ens permet identificar tres usos principals dels models científics:

- Comprensió d'un sistema físic o d'un sistema lògic com podria ser una altra teoria científica: Síntesi de la informació de les entrades i sortides per inferir en les característiques del sistema.
- Predicció del futur o d'algun estat que actualment és desconegut: Anàlisi de la informació relativa als estímuls i al sistema per conèixer les sortides.
- Control per limitar o manipular un sistema amb l'objectiu de produir una condició desitjada: Disseny i instrumentació d'un sistema de manera que la sortida desitjada s'obtingui com a resposta d'una entrada específica.

Mètodes de modelització matemàtica

Els models matemàtics són una representació simplificada i abstracta de la realitat que ens permeten donar una explicació matemàtica a un fenomen físic de naturalesa complexa. Els models matemàtics són instruments útils per l'estudi de sistemes complexos ja que permeten revelar propietats emergents dels sistemes, ens ajuden a definir prioritats en la investigació i que permeten comparar els patrons generats amb el comportament del sistema real.

Les simulacions són representacions de fenòmens de naturalesa física, tècnica, biològica, psicològica o econòmica mitjançant un model físic o matemàtic que en permet una anàlisi més senzilla, econòmica o innòcua que si aquesta es realitzés sobre la original. Les simulacions són una tècnica emprada en recerca operacional consistent a construir un model simbòlic d'un sistema o procés complex, de manera que els seus elements siguin representats mitjançant els processos lògics i aritmètics que hom pot executar amb un programa d'ordinador, a fi d'estudiar el comportament del sistema i mesurar-ne les propietats dinàmiques, a base d'obtenir les característiques estadístiques de dit comportament.

Podem classificar els models matemàtics segons diferents criteris. Aquests tenen en compte si el llenguatge matemàtic incorpora (o no) una estructura matemàtica particular (Haefner, 2005).

Els models poden ser empírics o mecanicistes. Els models empírics són una representació matemàtica del sistema o del seu comportament merament descriptiva. Els models mecanicistes, en canvi, reflecteixen l'estructura i les relacions del sistema.

Atenent a si consideren una representació explícita dels estats del futur o els condicionants, podem diferenciar els models en estàtics o dinàmics. Aquests últims poden considerar el temps com una variable contínua (models temporalment continus) o discreta (models temporalment discrets). Generalment, l'estudi de sistemes complexos requereix una resolució numèrica de les equacions algèbriques i, per tant, cal tractar el temps com una variable discreta.

També podem diferenciar els models atenent a si consideren l'espai de forma explícita o no. Els models amb espai explícit es poden dividir en models temporalment continus i discrets. De la mateixa manera que amb el temps, generalment cal discretitzar l'espai en elements finits. Aquesta discretització determina la precisió amb la que podem determinar la posició del sistema. Els models que no consideren l'espai s'anomenen de "camp mig" i eviten complicacions innecessàries en sistemes homogenis.

Per últim, segons si en el model hi intervé l'atzar o no, diferenciem els models deterministes i estocàstics. En els primers l'estat del sistema en un moment concret determina unívocament i exactament quin serà l'estat del sistema en qualsevol instant del futur, o permet conèixer quin era l'estat del sistema en qualsevol instant passat. Un model és estocàstic quan en ell hi intervé l'atzar. La utilització de components estocàstics és indispensable en models de sistemes biològics, ja que han d'intentar acostar-se a la descripció i comportament dels sistemes reals, que presenten diversitat i es comporten de manera variant al llarg del temps. L'atzar determina la velocitat i la trajectòria de les evolucions dels sistemes biològics al llarg del temps, especialment de la durada dels estats transitoris (Ferrer et al., 2008).

Modelització basada en l'individu (IbM)

Models que tracten els individus com a entitats úniques i discretes que com a mínim tenen una propietat, més enllà de l'edat, que canvia durant el seu cicle de vida (Grimm, 1999).

Els IbMs són models discrets que consideren regles lògiques (equacions) que controlen les variables que caracteritzen a cada individu a cada pas de temps, de manera que l'estat de la totalitat del sistema és estadísticament inferit.

El comportament estadístic del sistema és estudiat i comparat amb observacions experimentals o amb resultats teòrics obtinguts de models poblacionals.

Els IbM són necessaris per tractar amb sistemes compostos per entitats diferenciables que es comporten seguin diferents regles, que depenen de l'estat de l'individu i el seu entorn. Són especialment útils per corroborar la validesa de qualsevol mecanisme proposat que operi a un nivell individual i que la seva sortida sigui avaluable per una observació macroscòpica de la comunitat.

Els IbMs permeten una introducció gradual de la complexitat a un nivell individual i l'estudi esglaonat dels seus efectes globals. Fenòmens que no són evidents o implícits a les regles d'entrada del model són freqüentment observats. Són anomenats comportaments emergents (Ferrer et al., 2008).

Els models de simulació descriuen organismes individuals autònoms (IbM) o agents (*Agent-based Models*, AbM) s'han convertit en una eina àmpliament utilitzada, no només en ecologia, sinó que també en moltes altres disciplines que tracten amb sistemes complexos formats per entitats autònomes (Grimm et al., 2006).

1.4.2 Models de *Leishmania* spp. i altres trypanosomàtids

Existeixen diferents models en la família Trypanosomatidae. La varietat és ampla, des de models moleculars amb l'objectiu de modelitzar la interacció entre els protozous i el sistema immunitari, cultius *in vitro* i *in vivo*, òrgans, hostes; fins a cases, ecosistemes, a escala local o continental. Les equacions presentades en models epidemiològics són principalment contínues (Pedrós, 2015).

Els models matemàtics capaços de capturar la dinàmica de la leishmaniosi a nivell epidemiològic, àmpliament considerats per planificar i assessorar l'eficàcia de les intervencions, són sorprenentment escassos degut a la manca d'informació que envolta les NTDs. La caracterització de la capacitat infectiva dels diferents estadis de la malaltia són crucials per la seva eliminació.

L'estudi publicat per Rock *et al.* (2015) fa una revisió de 24 articles relacionats amb models matemàtics de LV. La majoria d'aquests es centren en la transmissió del protozou entre gossos de França i Brasil, tot i que també apareixen models d'estratègies de control potencials, de l'efecte del tractament i control del vector i del impacte que generaria la vacunació de la població si aquesta es pogués dur a terme.

La majoria de models de LV són compartimentals, en els què els hostes passen a través de diferents estadis de la malaltia en diferents proporcions. Els models no inclouen tota la complexitat biològica de la malaltia, principalment degut a la falta d'informació per definir els estadis, quantificar les velocitats de progressió i per determinar l'evolució temporal de les poblacions infectades entre els estadis.

La debilitat principal dels models actuals és la manca d'ajust o validació dels resultats en diferents moments temporals. Existeix una necessitat urgent per al desenvolupament de més models de LV que puguin ajudar les polítiques de salut pública mitjançant l'anàlisi de les dades de vigilància i orientant la política en les àrees on les estratègies actuals necessitin millores.

Respecte els diferents models matemàtics, els IbMs poden incloure més complexitat incorporant fenòmens com l'estacionalitat, la migració i la localització. L'ús de l'atzar en aquests models pot estimar la probabilitat d'eliminació del paràsit així com la probabilitat de recaure dels afectats. Actualment no hi ha cap model IbM estocàstic que capturi la dinàmica de transmissió de la LV.

Existeixen IbMs per altres NTDs que han demostrat tenir gran valor en la política sanitària, com l'estimació del impacte de doblar la freqüència de l'administració de medicaments per accelerar l'eliminació d'oncocercosis i filariosi limfàtica, així com combinar diferents intervencions terapèutiques i preventives per interrompre la transmissió de la lepra (Rock et al., 2015).

Un exemple de com un model pot ser emprat per integrar i investigar múltiples factors i explorar les seves interaccions és l'estudi publicat per Rajabi *et al.* (2016) que explora la propagació de la LC en una província altament endèmica d'Iran. L'estudi integra un model AbM amb espai explícit i, al mateix temps, agrupa els individus de manera compartimental.

La propagació de la malaltia es modelitza representant les interaccions socioecològiques entre els vectors, els humans i el seu ambient, obtenint així la simulació de la seva dinàmica espacial i temporal.

A través de les simulacions, el model mostra com la malaltia es propaga en diferents parts de l'àrea estudiada, variant l'accés a tractament mèdic, els patrons de poblacions i les característiques ambientals. Els resultats indiquen que les àrees desertificades són el principal origen de la LC i que les poblacions del voltant dels rius són les més exposades al vector i, per tant, les que haurien de rebre més mesures de prevenció per part de les autoritats sanitàries. Els resultats també mostren com l'accés a l'atenció mèdica redueix la infectivitat de les exposicions i que les àrees amb nous habitants presenten més infeccions per un mateix nombre d'exposicions (Rajabi et al., 2016).

1.5 Context del treball

El grup de recerca de Biologia Computacional i Sistemes Complexos (BIOCOM-SC, Universitat Politècnica de Catalunya-BarcelonaTech) ha treballat durant molts anys amb la modelització en l'àmbit de la biomedicina des d'una perspectiva interdisciplinària, abordant els sistemes microbians des de la Modelització basada en l'individu. El Dr. Daniel López, la Dra. Clara Prats i el Dr. Quim Valls han treballat amb malalties com la malària i la tuberculosi i, més recentment, amb malalties tropicals desateses.

En aquest àmbit d'estudi i com a precedent d'aquesta línia de recerca, la Núria Pedrós va realitzar el Treball de Fi de Grau amb l'objectiu de facilitar la comprensió del comportament *Trypanosoma cruzi* en cultius *in vitro* i *ex vivo* (*Analysis and modelling of Trypanosomatidae family in vitro and ex vivo cultures. Chagas disease and Leishmaniasis*). Per tal de continuar millorant la comprensió d'aquestes malalties i apropar-nos més al seu comportament *in vivo*, vam considerar necessari reproduir el procés infectiu *in vitro*. Degut a la necessitat de treballar amb un laboratori de bioseguretat P3 per realitzar aquest procediment amb *T. Cruzi* i a les semblances entre els cultius *in vitro* dels dos protozous, es va decidir desenvolupar el procés infectiu amb *Leishmania* spp. amb l'objectiu d'obtenir la informació necessària per fer viable la seva modelització matemàtica.

La Dra. Cristina Riera, la Dra. Roser Fisa i la Dra. Magdalena Alcover, actualment treballant en l'aplicació de noves eines per al diagnòstic, tipació molecular i assaig de fàrmacs per *Leishmania* spp. i *Trypanosoma cruzi*, han aportat la base del coneixement sobre el paràsit, els cultius i les malalties. El treball experimental s'ha realitzat sota la seva direcció a la Secció de Parasitologia del Departament de Biologia, Sanitat i Medi Ambient a la Facultat de Farmàcia i Ciències de l'Alimentació (Universitat de Barcelona) des del Gener fins l'Abril del 2016.

La digitalització dels cultius s'ha realitzat a l'Escola Superior d'Agricultura (ESAB) des de l'Abril fins el Juny del 2016 amb el suport de la Dra. Trinitat Pradell, qui ens ha cedit l'equip de microscòpia del Grup de Caracterització de Materials (GCM, Universitat Politècnica de Catalunya-BarcelonaTech).

Malgrat el treball finalitza amb la digitalització dels cultius, la perspectiva de realitzar un model matemàtic requereix una anàlisi de les imatges obtingudes. Amb aquesta finalitat, s'ha establert contacte amb la Dra. Elisa Sayrol del Grup de Processament d'Imatge i Vídeo (GPI, Universitat Politècnica de Catalunya-BarcelonaTech) i el Jaume Fernández, actualment realitzant el Treball de Fi de Màster pel diagnòstic automàtic de la malària.

1.6 Objectius del treball

Aquest document representa la posada en marxa d'una línia de recerca complexa que té com a objectiu final fer viable la modelització matemàtica dels cultius.

Amb aquest treball s'inicia el desenvolupament de mètodes experimentals de cultius d'amastigots de *Leishmania* spp. per millorar l'estat dels cultius i els resultats que se'n deriven, facilitant així la quantificació dels resultats experimentals i, d'aquesta manera, la comprensió del cicle del paràsit a nivell intracel·lular.

Objectius generals:

Desenvolupar un procediment experimental de cultius d'amastigots de *Leishmania* spp. en macròfags que permeti millorar la quantificació dels resultats experimentals.

Objectius específics

1. Optimitzar el procediment d'obtenció de macròfags d'origen peritoneal.
2. Dissenyar un protocol per la infecció i seguiment dels cultius d'amastigots intracel·lulars.
3. Definir un procediment d'obtenció digital d'imatges.

Esquema de treball:

El treball presentat és fonamentalment experimental, l'esquema del qual s'especifica a la Figura 10. S'han dut a terme diferents assajos en els que s'han infectat macròfags de línia cel·lular RAW 264.7 i d'origen peritoneal murí amb *Leishmania* spp.. De manera prèvia a la infecció, s'han desenvolupat diferents procediments per l'obtenció i l'ajust de les concentracions dels dos cultius.

S'han realitzat diferents operacions pel manteniment dels cultius *in vitro* dels amastigots intracel·lulars, dels quals se n'ha fet un seguiment. Les franges temporals estudiades, entre les 24 i 240 h, han variat al llarg dels assajos.

Les preparacions, prèviament fixades i tenyides, s'han digitalitzat amb l'objectiu de sotmetre-les a un tractament d'imatges. El seu processament permetrà millorar la comprensió del sistema i obtenir la informació necessària per elaborar un model IbM.

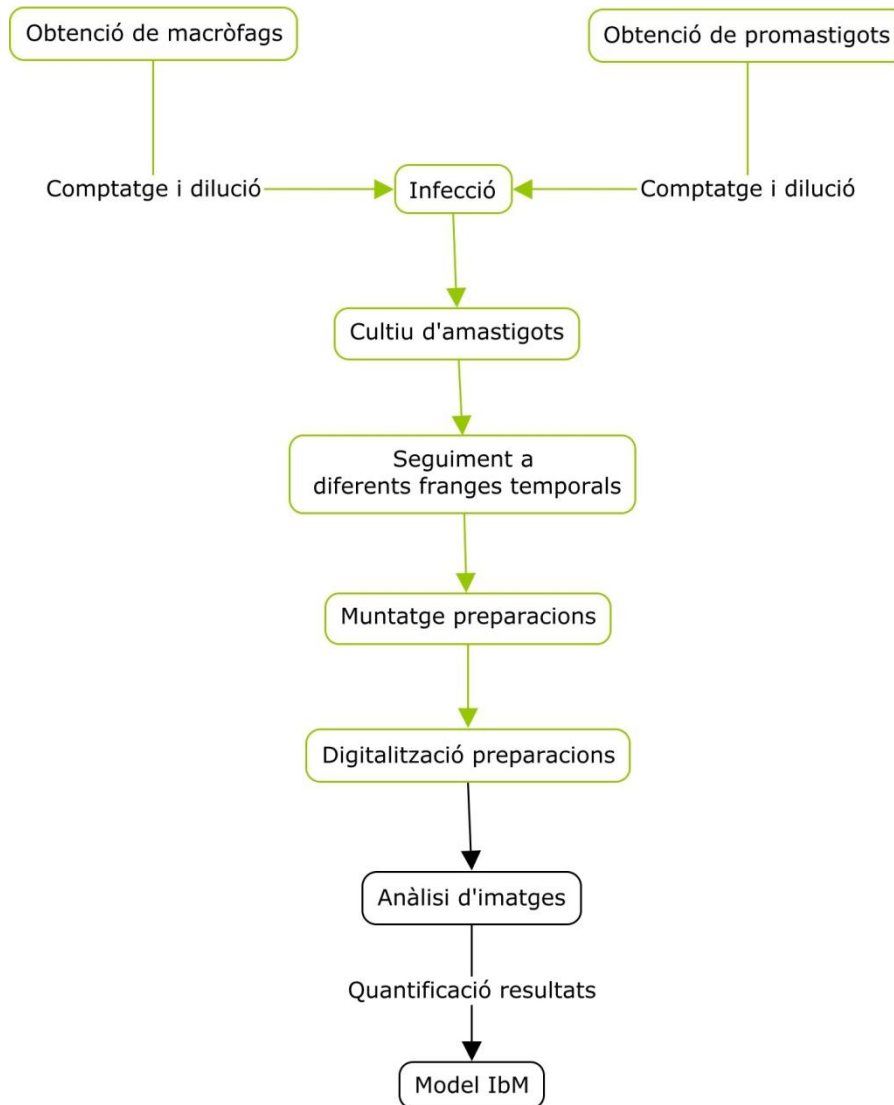


Figura 10. Esquema de treball. S'inclou els passos experimentals realitzats (en verd) i les perspectives (en negre).

2. Materials i mètodes

2.1 Cultius *in vitro*

2.1.1 Obtenció de macròfags

El procediment per l'obtenció de macròfags varia segons el seu origen. Aquestes poden provenir de la cavitat peritoneal d'un ratolí o d'una línia cultiu cel·lular. El medi de cultiu cel·lular emprat està compost per RPMI 1640 suplementat amb 10 % SBF (Sèrum fetal boví) i 1 % P/S (Penicil·lina/Estreptomicina).

Tots els procediments que han implicat una manipulació del cultiu cel·lular, s'han realitzat sota campana de seguretat biològica.

- Origen peritoneal:

Injecció peritoneal de 1 mL de solució de tioglicolat de sodi al 10 % a un ratolí de 9 a 12 setmanes per provocar un abscess cel·lular. La solució es prepara en aigua, dissolent-la 3 hores a 100 °C, i es sotmet dues vegades a l'autoclau (20 minuts a 121 °C i 1 kg/cm²).

L'animal es sacrifica tres dies després. S'injecten 4ml de PBS (*phosphate buffered saline*) fred i s'extreu el líquid de la cavitat peritoneal amb la mateixa agulla. El líquid recollit es diposita en un Falcon. L'ús de medi fred retarda l'adhesió de les cèl·lules del recipient. Es centrifuga (2500 rpm, 5 minuts), es decanta el sobrenedant i es re-suspèn amb PBS estèril. Es repeteix la centrifugació i es re-suspèn amb 5 mL de medi de cultiu cel·lular.

- Línia cel·lular contínua:

Pel cultiu dels macròfags es va utilitzar un cultiu original congelat de la línia cel·lular contínua RAW 264.7 (10⁶ cel·l/mL), d'origen tumoral murí i en permanent procés de divisió. Aquest es va fer créixer en medi de cultiu cel·lular un flascó de cultiu de 75 cm³ a 37 °C i 5 % CO₂ (Figura 11). Es va realitzar una observació diària del cultiu amb el microscopi invertit per garantir la seva adherència a la superfície del flascó (aparença cel·lular allargada) i es va canviar el medi cada 3 dies.



Figura 11. Flascó de cultiu cel·lular.
[Extret de capitolscientific.com]

Comptatge i dilució:

La concentració cel·lular desitjada per la infecció és de $5 \cdot 10^4$ cel/mL. El comptatge de macròfags es va realitzar mitjançant un comptador cel·lular automàtic, que proporciona un comptatge de cèl·lules total i en determina la seva viabilitat. L'obtenció de les cèl·lules es va realitzar mitjançant el rascat de les cèl·lules adherides a la superfície del flascó amb un *Cell Scrapper* (Figura 12). Mitjançant una pipeta Pasteur, es va dipositar un volum de 1 mL de suspensió cel·lular en un Eppendorf.

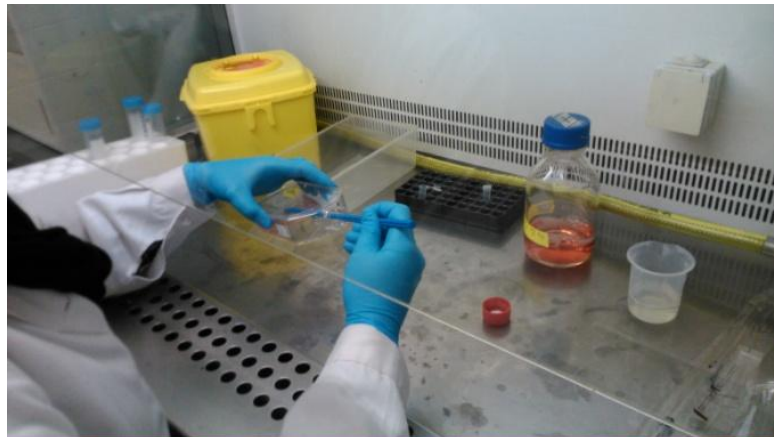


Figura 12. Raspat de les cèl·lules adherides al flascó amb un *Cell Scrapper* sota la campana de seguretat biològica

Mitjançant una micropipeta, es van diluir 50 μ l de la suspensió cel·lular extreta amb 50 μ l de blau Tripà al 0.04 % (reactiu específic de l'equip, tenyeix de blau els nuclis de les cèl·lules mortes) en un segon Eppendorf. La preparació es va introduir a l'equip, que va determinar la concentració de cèl·lules vives i mortes del cultiu. Es va calcular el volum del cultiu necessari, sabent que:

$$v \cdot c = v_f \cdot c_f$$

On:

- c: Concentració de cèl·lules vives del cultiu
- v: Volum del cultiu (incògnita)
- v_f : Volum final de medi (segons disseny experimental)
- c_f : Concentració desitjada ($5 \cdot 10^4$ cel/mL)

La dilució es va realitzar introduint en un Falcon els volums corresponents a la suspensió cel·lular i al medi de cultiu cel·lular (RPMI 1640 suplementat amb 10 % SBF i 1 % P/S).

2.1.2 Obtenció de promastigots de *Leishmania* spp.

Es van utilitzar les següents soques:

- *Leishmania infatum* (BCN 877): MHOM/ES/2016/BCN-877
- *Leishmania major* (BCN 834): MHOM/SU/73/SASKH
- *Leishmania braziliensis* (BCN 25): MHOM/BR/88/BCN-25

Les leishmànies es van sembrar en un medi Schneider suplementat amb 20 % SBF, 1 % orina i 1 % Gentamicina en flascons de cultiu de 75 cm³ a 26 °C. Es va realitzar un seguiment diari del cultiu al microscopi invertit per tal de garantir la seva viabilitat i es va canviar el medi cada 4 dies. Els cultius emprats per la infecció són cultius vells, d'aproximadament 8 dies.

De la mateixa manera que amb els cultius cel·lulars, tots els procediments que han implicat una manipulació del cultiu de leishmànies s'han realitzat sota campana de seguretat biològica.

Comptatge i dilució:

La concentració desitjada de promastigots és de 5·10⁵ promastigots/mL. El seu comptatge es va realitzar amb una Càmera Fuchs-Rosenthal (Figura 13), formada per una àrea de 16 mm² dividida en 16 quadrats de 1 mm². Aquests, alhora, estan dividits per 16 quadrats petits de 0.25 mm de costat, amb una àrea de 0.0625 mm².



Figura 13. Càmera Fuchs Rosenthal
[Extret de laborchemiker.com.br]

Per tal d'obtenir els promastigots, es va dipositar 1 mL del cultiu en un Eppendorf mitjançant una pipeta Pasteur. Mitjançant una micropipeta i per tal de matar els paràsits, es van diluir 100 µl de la mostra amb 1000 µl de formol al 2 % en un segon Eppendorf (dilució 1/10). La suspensió obtinguda es va introduir a la Càmera Fuchs-Rosenthal i es va procedir al comptatge al microscopi.

Es varen comptar els promastigots presents en 16 quadrats petits 3 cops (és a dir 3 quadrats grans diferents: n_1, n_2, n_3).

$$N^{\circ}promastigots = \frac{n_1 + n_2 + n_3}{3 \cdot 16} \cdot k \cdot FD$$

On:

-k: Factor de conversió per obtenir ml/quadre gran (16 de petits)

$$k = \frac{1000}{0.0125} = 80.000$$

-FD: Factor de dilució, segons la dilució realitzada amb formol.

$$FD = \frac{1000ul \text{ formol}}{100ul \text{ mostra}} = 10$$

Un cop calculat el numero de promastigots es va calcular el volum de suspensió necessària per assolir la concentració desitjada. Aquest es va determinar de la mateixa manera que en el cas de les cèl·lules, i la seva dilució es va realitzar amb el corresponent medi de cultiu (Schneider suplementat amb 20% SBF, 1% orina i 1% Gentamicina).

2.2 Infecció de macròfags amb promastigots de *Leishmania* spp.

La infecció es va realitzar amb una proporció 1:10 (macròfag:promastigots) en sistemes de càmeres de cultiu sobre portaobjectes anomenades Lab-Tek™ (Figura 14). Aquestes consten d'una estructura formada per 8 pous adherits sobre un portaobjectes. Aquesta estructura es pot desmuntar un cop finalitzat el cultiu, fet que permet la tinció i l'observació de la mostra en el mateix portaobjectes. Es van emprar tantes càmeres com franges de temps volíem observar.



Figura 14. Estructura d'un Lab-Tek™
[Extret de medicalexpo.es]

Els assajos es varen fer en macròfags de ratolí i cèl·lules RAW 264.7. L'assaig amb macròfags de ratolí es va realitzar amb *L. infantum*, i es van infectar els 8 pous de 4 Lab-Tek™ per fer-ne un seguiment a les 24, 48, 72 i 96 h. Les cèl·lules RAW 264.7 es van infectar amb les tres soques detallades a “2.1.2 Obtenció de promastigots de *Leishmania* spp.”. En aquest cas, es van infectar dos pous de cada Lab-Tek™ per cada espècie. Els dos pous restants es van fer servir com a controls. Es va fer un seguiment a les 24, 48, 72 i 120 h.

A continuació es detalla el procediment seguit per la infecció dels macròfags, que presenta certes variacions en els dos assajos.

Es van distribuir 0.3 mL de la suspensió cel·lular ($5 \cdot 10^4$ cèl·lules vives/mL) a cada pou de la cambra cultiu porta. Les cèl·lules es van deixar adherir 24 h a 37 °C i 5 % CO₂.

Es va extreure el medi del pou amb una micropipeta (només romanen les cèl·lules adherides a la superfície) i es van pipetejar 0,3 mL de la suspensió de promastigots a cada un d'ells (Figura 15).

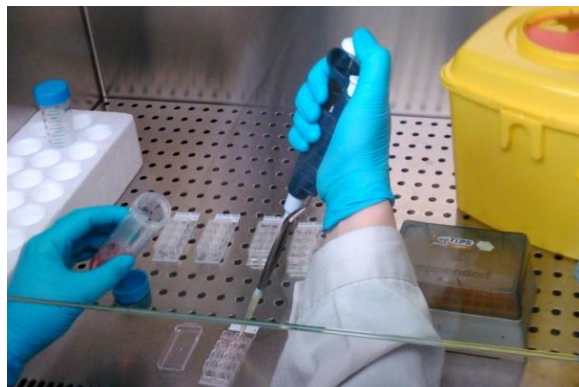


Figura 15. Infecció de les cèl·lules adherides als Lab-Tek™ mitjançant una micropipeta

Els Lab-Teks™ es van deixar a l'estufa a 37 °C i 5 % CO₂ durant 24 h. En el cas de l'assaig amb macròfags de línia cel·lular RAW 264.7, es van mantenir prèviament a 37°C sense CO₂ durant 2 h.

Cada 24 h es va afegir medi nou (RPMI 1640 suplementat amb 10 % de SBF i 1 % P/S). De manera prèvia al canvi de medi, es van realitzar dos rentats amb RPMI 1640.

Per tal de procedir a l'observació dels macròfags infectats a les diferents franges horàries, es va extreure el medi dels pous, es van realitzar dos rentats amb PBS estèril i es va separar l'estructura dels Lab-Tek™.

En el cas de l'assaig amb macròfags de línia cel·lular RAW 264.7, no es va realitzar cap manipulació després de la infecció. No es va canviar el medi dels cultius ni es va realitzar cap rentat amb PBS estèril.

La preparació es va fixar amb metanol i es va realitzar una tinció Giemsa (1/10) durant 10 minuts (Figura 16). Es va procedir al muntatge i observació de la preparació.

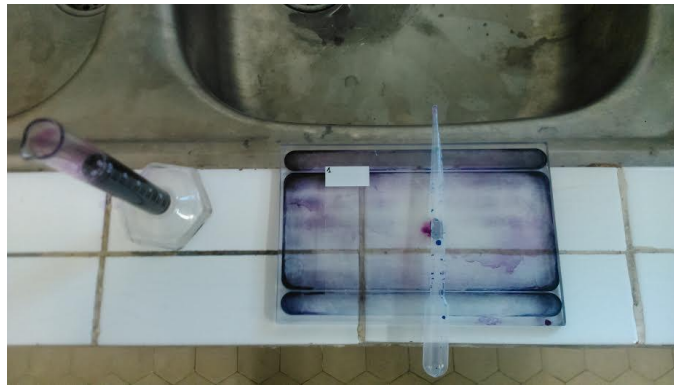


Figura 16. Tinció Giemsa.

2.3 Obtenció d'imatges

L'obtenció d'imatges s'ha realitzat amb la càmera INFINITY 1-5 acoblada al microscopi òptic Nikon LV100D mitjançant el software Perfect Image 7.6 (Figura 17).

S'ha treballat amb el microscopi utilitzant la llum de transmissió i la tecnologia *brightfield*, àmpliament utilitzada en preparacions biològiques prèviament tintades. La preparació s'ha il·luminat des de la part inferior de l'equip i les seves propietats no s'han vist alterades (no s'han utilitzat dispositius com polaritzadors o filtres).

Les imatges s'han capturat a 20 i 50 augments per facilitar la comprensió dels diferents nivells de complexitat del sistema. Per cada camp òptic s'ha adequat l'enfocament i la necessitat d'il·luminació i posició del condensador del microscopi. Els paràmetres propis del software s'han mantingut constants al llarg de la digitalització de les preparacions. Les imatges capturades s'han guardat indicant la espècie de *Lesihmania* fotografiada i els augments utilitzats.

Les imatges, de 24 bits, són de 201.773 x 272.393 μm (1920 x 2592 Píxels) amb una superfície de 54961.55 μm^2 .

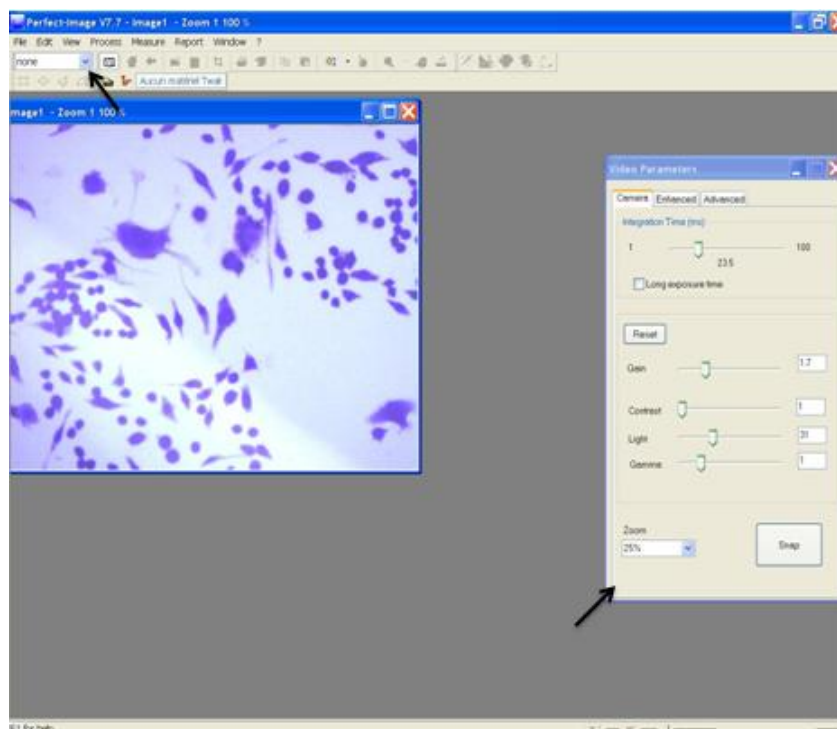


Figura 17. Programari Perfect Image 7.6. S'indiquen els augments i els paràmetres propis del software.

3. Resultats

El treball experimental ha inclòs fins a cinc assajos diferents, en els que s'han avaluat diferents procediments per la infecció i el posterior seguiment dels cultius (Taula 2).

El treball experimental es va iniciar amb cèl·lules de línia cel·lular RAW 264.7, degut a la facilitat que suposa treballar-hi. Es va realitzar una infecció inicial, en la que es va avaluar el cultiu d'amastigots a les 72, 120, 144 i 240 hores. Un cop observats els resultats, es va decidir estudiar el procés durant les primeres hores, realitzant una segona infecció a les 24, 48, 72, 96 i 144 hores. En tots dos casos, els macròfags apareixien excessivament tintats, fet que dificultava la observació i comprensió de les preparacions. Degut a aquest fet, es va decidir reduir el temps de la tinció de 20 a 10 minuts.

Degut a la naturalesa de les cèl·lules de línia cel·lular, que es multipliquen ràpidament i sovint presenten morfologies polinucleades, es va decidir estudiar la infecció amb cèl·lules d'origen peritoneal murí. L'obtenció d'aquestes cèl·lules requereix un procediment molt més complex, fet que fa que el seu ús sigui menys freqüent.

La primera vegada que vam infectar cèl·lules d'origen peritoneal murí es van fer servir les cèl·lules procedents de 3 ratolins diferents. El fet de barrejar-les sense contemplar la possibilitat que es produís algun tipus de rebuig entre elles i no mantenir-les en medi fred per retardar la seva adhesió abans de realitzar el comptatge i posterior dilució, va fer que els resultats de la infecció no fossin els esperats. Es volia fer el seguiment a les 24, 48 i 72 hores.

Es va repetir l'assaig utilitzant les cèl·lules d'un únic ratolí i es van mantenir en fred. El fet d'utilitzar un sol ratolí va requerir la centrifugació de les cèl·lules per concentrar la suspensió extreta, fet que també va millorar el resultat obtingut. Es va realitzar un seguiment a les 24, 48 i 72 hores. No es va poder realitzar el seguiment a les 96 h degut a la identificació de fongs a la preparació. Degut a que les diferents franges horàries s'estudien en Lab-Tek™ diferents, es va poder treballar amb els resultats obtinguts a la resta de preparacions.

Degut a que havíem realitzat els assajos únicament amb *L. infantum*, es va realitzar una última infecció amb cèl·lules de línia cel·lular RAW 264.7 amb diferents espècies: *L. infantum*; *L. major* i *L. braziliensis*. A més, es va incloure controls per realitzar un seguiment de l'estat de multiplicació de les cèl·lules. Les franges temporals estudiades van ser: 24, 48, 72 i 120 hores. El seguiment de *L. major* només es va realitzar fins a les 72 hores.

El procediment exposat a l'apartat "2. Materials i Mètodes" juntament amb els resultats que es presentaran a continuació, corresponen als dos últims assajos citats anteriorment. Aquest fet rau en la millora del procediment experimental a mesura que han transcorregut els assajos, que resulta en una millora de l'estat dels cultius i en l'aparença dels macròfags i les diferents formes del paràsit a les preparacions.

Taula 2. Assajos realitzats al llarg del treball experimental.

Assaig	Origen cèl·lules	<i>Leishmania</i> spp.	Franges temporals	Observacions
1	Línia cel·lular RAW 264.7	<i>L. infantum</i>	72, 120, 144 i 240 h	<ul style="list-style-type: none"> - No s'observen les primeres fases de la infecció. - Elevat estat multiplicatiu dels macròfags. - Tinció en excés.
2	Línia cel·lular RAW 264.7	<i>L. infantum</i>	24,48, 72, 92 i 144 h	<ul style="list-style-type: none"> - Tinció en excés.
3	Origen peritoneal murí	<i>L. infantum</i>	24, 48 i 72 h	<ul style="list-style-type: none"> - Fenomen de rebuig entre les cèl·lules dels diferents ratolins. - Adhesió cel·lular a les parets del recipient.
4	Origen peritoneal murí	<i>L. infantum</i>	24, 48, 72 i 96 h	<ul style="list-style-type: none"> - Cèl·lules en bon estat. - S'identifiquen diferents fases en el cicle del paràsit a nivell cel·lular. - Contaminació al cultiu de 96 h.
5	Línia cel·lular RAW 264.7	<i>L. infantum</i> <i>L. major</i> <i>L. braziliensis</i>	24, 48, 72, 96 i 120 h	<ul style="list-style-type: none"> - Índex d'infecció elevat. - S'identifiquen diferents fases en el cicle del paràsit a nivell cel·lular.

3.1 Observacions de la infecció de macròfags d'origen peritoneal murí amb *Leishmania* spp.

Els macròfags apareixen petits, arrodonits i separats entre ells. El nucli i la membrana estan ben definits.

A les 24 h *L. infantum* apareix en forma de promastigots a la superfície dels macròfags (Figura 18A). S'identifiquen formes arrodonides de mida superior a la forma típica d'amastigot i sense flagel visible tan a l'interior com a l'exterior de les cèl·lules. Aquestes són similars a formes paramastigotes i poden tenir el seu origen en promastigots que varien la seva morfologia cap a amastigots axènics.

A partir de les 48 h els macròfags apareixen més difuminats, fenomen que s'accentua a mesura que les hores transcorren. El nombre de paràsits extracel·lulars es redueix significativament tot i que es pot identificar algun promastigot fins a les 72 h. S'observen amastigots intracel·lulars en alguns macròfags, que en cap cas arriben a cobrir tota la seva superfície (Figura 18B i 18C).

De manera generalitzada, les cèl·lules apareixen poc infectades. El fet d'haver rentat els cultius cada 24 h pot ser una explicació per aquest fenomen.

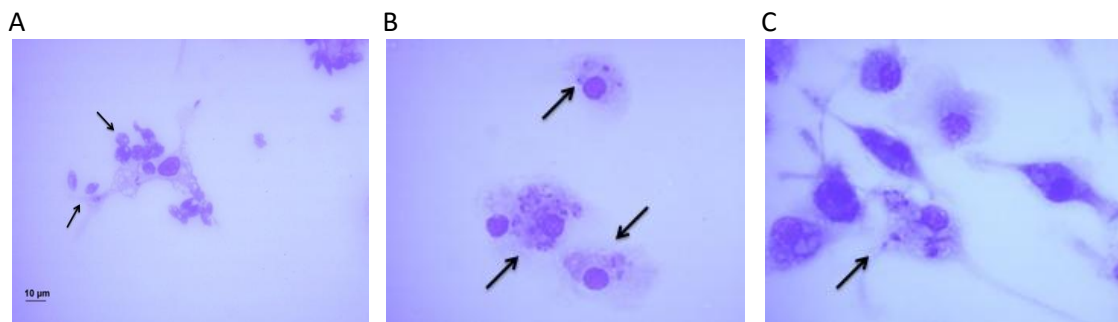


Figura 18. Infecció de cèl·lules d'origen peritoneal murí amb *L. infantum*. Fotografies a 50 augments a les 24, 48 i 72 h (A,B i C respectivament). A la Imatge A s'indiquen formes promastigotes (fletxa esquerra) i intermèdies (fletxa dreta) a la superfície del macròfag. A les Imatges B i C es senyalen amastigots intracel·lulars.

3.2 Observacions de la infecció d'una línia cel·lular de macròfags (RAW 264.7) amb *Leishmania* spp.

Els macròfags de la línia cel·lular RAW 264.7 presenten morfologies diverses (Figura 19B) i sovint són polinucleades (Figura 19A i 19C). La distància entre elles és menor que en les cèl·lules d'origen peritoneal, fenomen que s'accentua a mesura que es divideixen. A partir de les 72 h, l'augment del nombre de macròfags es fa molt evident i les cèl·lules noves apareixen molt més petites i arrodonides, amb un citoplasma molt reduït (Figura 19D).

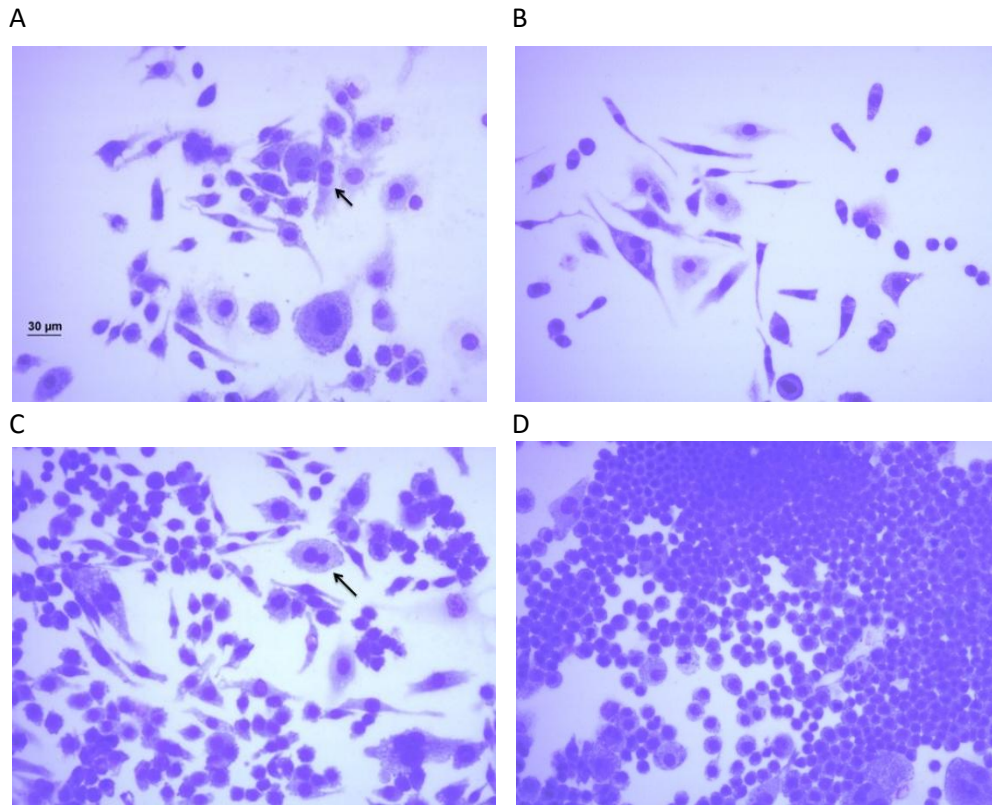


Figura 19. Controls de la infecció de cèl·lules RAW 264.7. Fotografies a 20 augments a les 24 i 48 h (Imatges A i B) i a les 72 i 120 h (Imatges C i D). Les fletxes indiquen la presència de cèl·lules polinucleades (Imatges A i C).

Al cap de 24 h la superfície dels macròfags apareix totalment coberta per formes promastigotes, especialment allargades en el cas de *L. major*. S'observen clares diferències entre la capacitat infectiva de totes tres espècies, sent *L. braziliensis* la més infectiva i *L. major* la que menys (Figura 20).

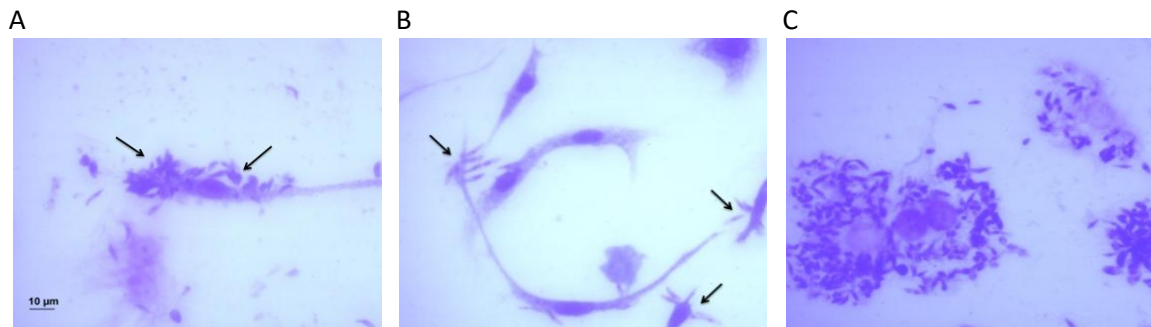


Figura 20. Infecció de cèl·lules RAW 264.7 amb *L. infantum* (A), *L. major* (B) i *L. braziliensis* (C) a les 24 h. Fotografies a 50 augments. Les fletxes assenyalen promastigots a la superfície dels macròfags, especialment allargats en la Imatge B. *L. braziliensis* apareix envoltant la totalitat de les cèl·lules (Imatge C).

A les 48 h, malgrat apareixen promastigots lliures, la majoria de les formes estan adherides o molt properes a la superfície cel·lular (Figura 21A i 21C). Es poden identificar alguns amastigots intracel·lulars (Figura 21B).

De la mateixa manera que en les cèl·lules d'origen peritoneal murí, apareixen formes intermèdies a l'exterior de les cèl·lules (Figura 21A i 21B). Aquestes corresponen a promastigots que varien la seva forma cap a amastigots axènics i que presenten una morfologia similar als paramastigots. S'identifiquen com a formes arrodonides i sense flagel, i són especialment freqüents en *L. infantum* i *L. major*. Aquest fet és probablement degut a la menor capacitat infectiva de les dues espècies, que fa que romanguin més temps fora de la cèl·lula.

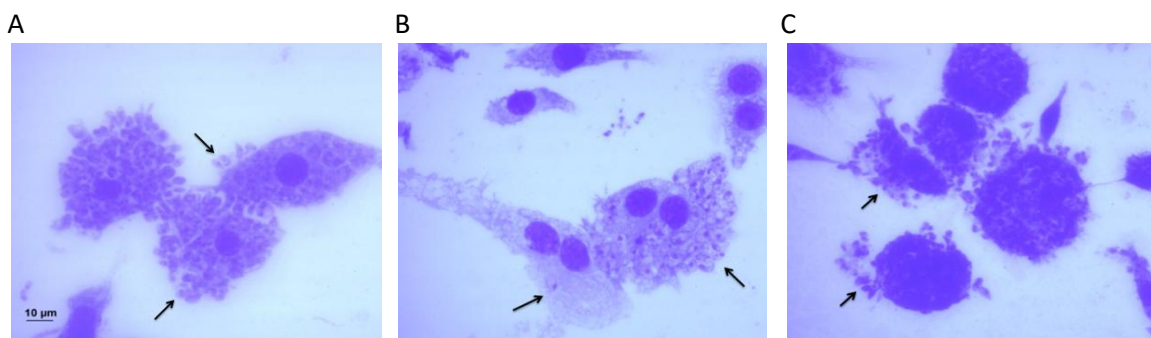


Figura 21. Infecció de cèl·lules RAW 264.7 amb *L. infantum* (A), *L. major* (B) i *L. braziliensis* (C) a les 48 h. Fotografies a 50 augments. Les fletxes de la imatge A (superior) i C indiquen la presència de promastigots a la superfície dels macròfags. S'observen formes intermèdies (Imatge A (fletxa inferior) i Imatge B (fletxa dreta)). Apareixen amastigots intracel·lulars (Imatge B (fletxa esquerra)).

A les 72 h les cèl·lules apareixen més difuminades. La forma del paràsit es mostra més homogènia i més petita, assolint la forma completa d'amastigot, especialment en *L. infantum* i *L. braziliensis*. Observem macròfags amb un elevat nombre d'amastigots (Figura 22A i 22C).

No apareixen les formes parasitàries intermèdies identificades 24 h abans, probablement degut a la mort de les leishmànies que no han pogut parasitar als macròfags. L'índex d'infecció

dels macròfags varia. Algunes cèl·lules mostren la superfície totalment coberta d'amastigots, i d'altres presenten poques formes al seu interior, havent estat infectades més tard, per formes amastigotes (procedents de macròfags ja lisats o axèniques) o promastigotes, presents a les 72 h de manera molt menys freqüent.

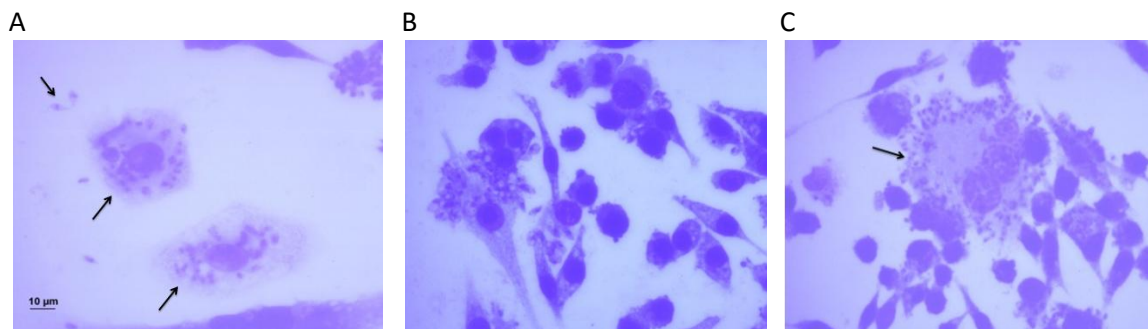


Figura 22. Infecció de cèl·lules RAW 264.7 amb *L. infantum* (A), *L. major* (B) i *L. braziliensis* (C) a les 72 h. Fotografies a 50 augments. S'observen formes amastigotes, que apareixen petites i arrodonides a l'interior del citoplasma dels macròfags. S'identifica algun promastigot lliure (imatge A (fletxa superior)).

A les 120 h, el número de macròfags ha augmentat exponencialment i apareixen un al costat de l'altre. Les cèl·lules noves apareixen petites i arrodonides, mentre que les cèl·lules més velles són de mida superior i apareixen majoritàriament infectades (Figura 23). Malgrat que el nombre d'amastigots a l'interior dels macròfags és elevat, sembla que l'índex infecció a nivell del cultiu és menor que a les primeres hores.

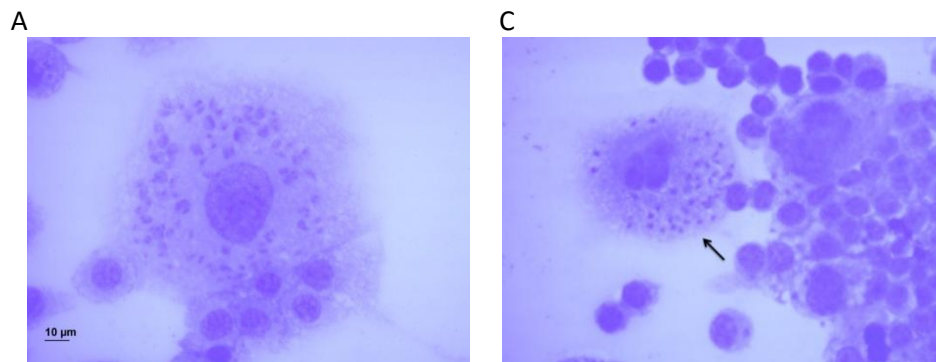


Figura 23. Infecció de cèl·lules RAW 264.7 amb *L. infantum* (A) i *L. braziliensis* (C) a les 120 h. Fotografies a 50 augments. S'identifiquen formes amastigotes intracel·lulars en els macròfags de mida superior.

3.3 Protocol

A partir dels resultats obtinguts hem elaborat un protocol experimental dels cultius d'amastigots de *Leishmania* spp. (Taula 3). Aquest s'ha detallat amb l'objectiu de millorar l'estat de les preparacions i així facilitar la quantificació dels resultats experimentals, procediments que no s'han detallat en aquest treball i que formen part de les seves perspectives.

Aquest inclou els dos tipus de macròfags amb els que s'ha treballat, ja que el paràsit segueix el mateix patró temporal en els dos casos i el seu comportament individual és independent del nombre de cèl·lules parasitades. La seva elecció dependria, doncs, de la disponibilitat i facilitat a l'hora de treballar amb unes o altres.

A les 24 i 48 h l'avaluació del cultiu és difícil degut a l'elevada concentració de promastigots, que ocupen pràcticament la totalitat de la superfície cel·lular. Per facilitar la comprensió del comportament dels cultius, proposem reduir en propers assajos la proporció macròfags:promastigots de 1:10 a 1:4. Degut a que reduïm la proporció de promastigots, caldria facilitar la infecció de les cèl·lules mantenint-los sense CO₂ les dues primeres hores després de la infecció.

En la mateixa línia, creiem que rentar els cultius cada 24 h i canviar el seu medi pot simplificar el sistema. Gran part de les formes promastigotes en suspensió s'eliminarien, fent que la infecció inicial de les cèl·lules fos simultània i que el nombre de formes intermèdies es reduís. A més, evitaríem l'acidificació del medi (que també facilita l'aparició de formes intermèdies) i deficiències nutricionals en les cèl·lules noves, que apareixen petites i arrodonides.

Creiem necessari realitzar els rentats amb PBS estèril previs a la fixació de la preparació per reduir restes cel·lulars lisades i altres elements que puguin quedar tintats i dificultar l'observació de la preparació.

Referent a les franges temporals, considerem interessant estudiar les 24, 48, 72, 96 i 120 hores, mantenint dos pous de cada Lab-TekTM sense infectar per poder fer un seguiment de l'estat de multiplicació dels macròfags.

A nivell de la digitalització dels cultius i degut a la manca d'un procediment normalitzat previ, s'ha definit un protocol des de zero. Aquest s'ha elaborat a partir dels coneixements adquirits al llarg del procés, prioritzant aquells paràmetres que permetien una millor qualitat de les imatges.

Taula 3. Protocol experimental pels cultius d'amastigots de *Leishmania* spp i la seva digitalització

Funció	Procediment	
Obtenció macròfags	Origen peritoneal	Injecció peritoneal a un ratolí de 9 a 12 setmanes (1 mL Solució tioglicolat de sodi 10 %)
		Sacrificar l'animal 3 dies després
		Injectar 4 mL RPMI 1640 fred Extreure el líquid de la cavitat peritoneal Mantenir el líquid en fred
		Centrifugació (2500 rpm, 5 min) Decantació i re-suspensió en PBS estèril
		Repetir pas anterior i re-suspendre en RPMI 1640, 10 % SBF, 1 % P/S
	Línia cel·lular	Descongelar cultiu congelat (10^6 cel/mL)
		Sembrar en flascons de cultiu (37 °C, 5 % CO ₂) RPMI 1640, 10 % SBF, 1 % P/S
		Observació diària Canvi de medi cada 3 dies
	Comptatge mitjançant comptador cel·lular automàtic	
	Dilució del cultiu	
Obtenció de promastigots de <i>Leishmania</i> spp.	Sembra en flascons de cultiu (26 °C) Schneider, 20 % SBF, 1 % Orina, 1 % Gentamicina	
	Observació diària Canvi de medi cada 4 dies Per la infecció cultius de 8 dies	
	Comptatge mitjançant Càmera Fuchs-Rosenthal	
	Dilució del cultiu	
Infecció Proporcíó 1:4	Sembrar les cèl·lules al Lab-tek™ Ús de 5 Lap-tek™ pel seguiment a les 24, 48, 72, 96 i 120 h Deixar adherir 24 h	
	Retirar el medi i afegir la suspensió de promastigots Deixar 2 pous per Lab-tek™ sense infectar (controls)	
	2 h a 37 °C 24 h a 37 °C, 5 % CO ₂	
Manteniment diari	2 Rentats amb RPMI 1640 Afegir medi nou (RPMI 1640, 10 % SBF, 1 % P/S)	
Tinció a les 24, 48, 72, 96 i 120 h	2 Rentats amb PBS estèril	
	Desmuntar Lap-tek™	
	Fixar amb metanol	
	Tinció Giemsa (1/10) 10min Muntatge de la preparació	
Digitalització de les preparacions amb el software Perfect Image 7.6	Ús de llum de transmissió i tecnologia <i>brightfield</i> al microscopi	
	Enfocar i adequar la necessitat d'il·luminació i posició del condensador del microscopi	
	Captura d'imatges a 20 i 50 augments	
	Obtenir una quantitat d'imatges representatives (100-300 macròfags)	

3.4 Col·lecció d'imatges

S'han capturat imatges de les preparacions amb cèl·lules d'origen peritoneal infectades amb *L. infantum* i de línia cel·lular RAW 264.7 infectades amb *L. infantum*, *L. major*, *L. braziliensis*.

Tal com s'ha esmentat a la secció "3.3 Protocol", el procediment de digitalització dels cultius s'ha definit des de zero, de manera que la qualitat de les imatges ha millorat significativament al llarg del procés (Figura 24).

En total s'han capturat més de 700 imatges, realitzades a 20 i 50 augments. L'obtenció d'imatges a 20 augments ha permès obtenir una visió general del sistema, fet que ha facilitat la seva comprensió a nivell global. Les imatges capturades a 50 augments permeten avaluar la infecció a nivell cel·lular, diferenciant la morfologia i la quantitat de formes presents. Inicialment es van capturar algunes imatges a 100 augments, però aquestes perdien resolució i dificultaven la comprensió del procés infectiu (Figura 24C).

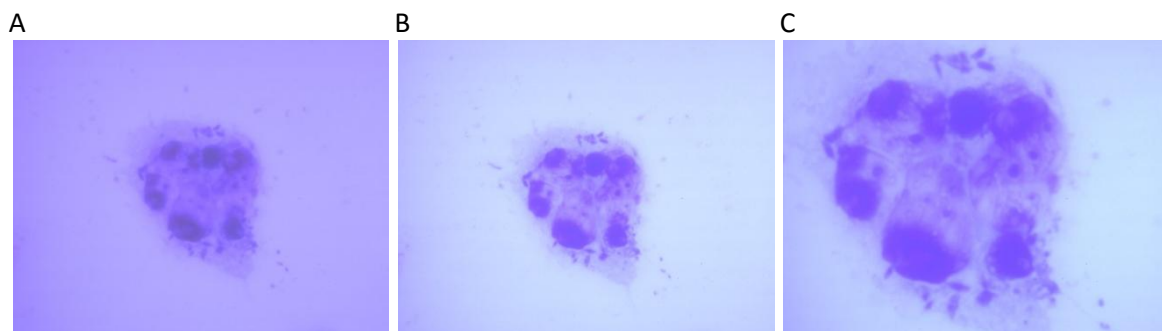


Figura 24. Imatges d'un macròfag polinucleat amb amastigots intracel·lulars modificant diferents paràmetres. S'observen diferències entre les imatges a 50 augments capturades amb la tecnologia *darkfield* i *brightfield* (Imatge B i C respectivament). Les imatges capturades a 100 augments dificulten la comprensió del sistema a nivell global (Imatge C).

A continuació es presenten un recull de les imatges dels assajos 4 i 5, en les diferents franges temporals estudiades, a 20 i 50 augments (Figura 25 a 38).

L'estat de cada preparació ha determinat la necessitat d'il·luminació i posició del condensador del microscopi. Aquest fet fa que les característiques entre les diferents imatges de les preparacions puguin variar.

La majoria de les imatges presentades mantenen les seves característiques originals, mentre que la mida d'alguna d'elles s'ha modificat per tal d'afavorir una millor comprensió de la imatge. Les barres de dimensions s'han inclòs en algunes de les fotografies de la secció "3. Resultats".

Imatges de la infecció de macròfags de ratolí amb *L. infantum*

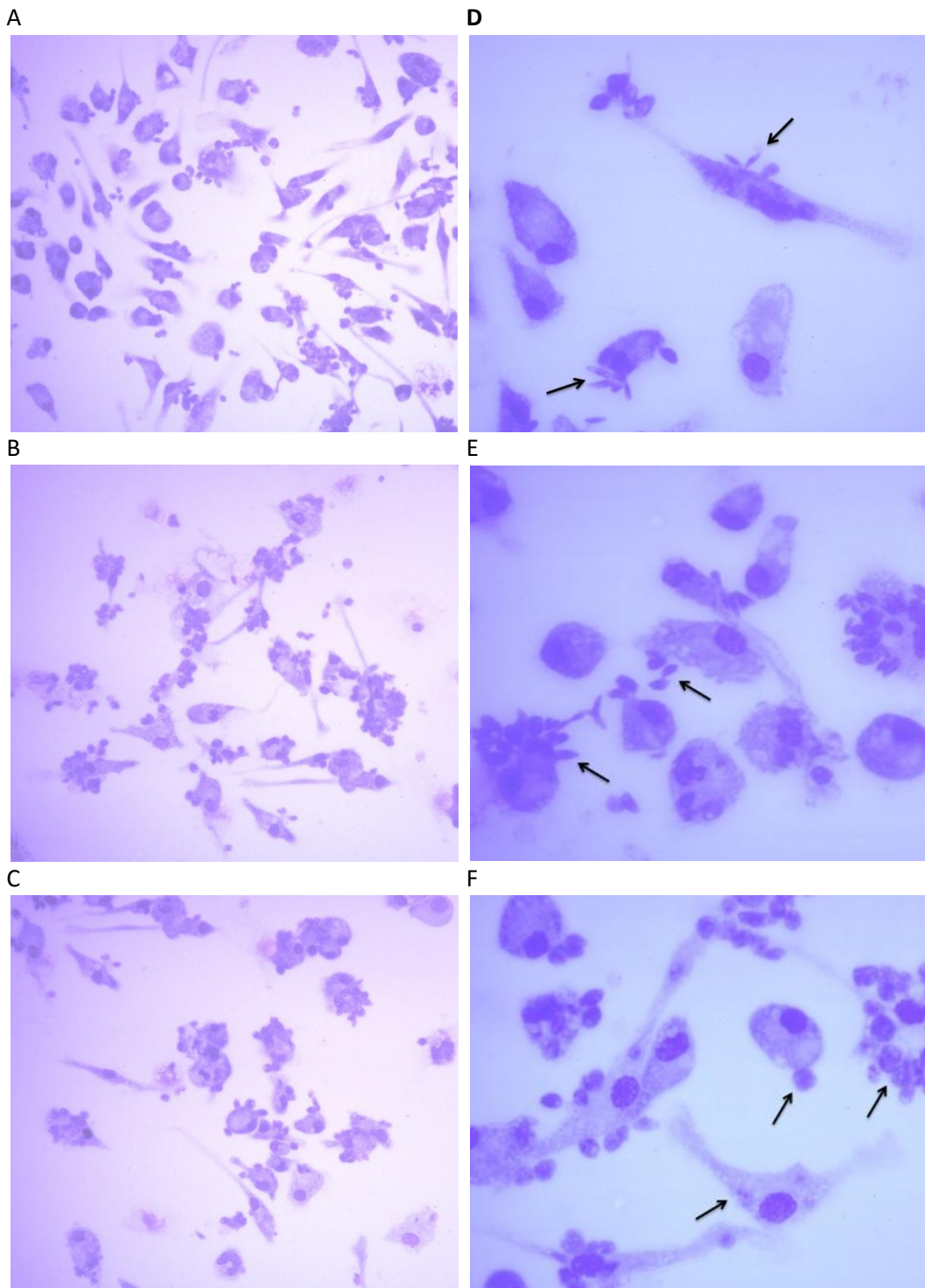


Figura 25. Infecció de cèl·lules d'origen peritoneal murí amb *L. infantum* a les 24 h. Fotografies capturades a 20 (columna esquerra) i 50 augments (columna dreta). A les imatges D i E s'indica la presència de promastigots a la membrana dels macròfags. A la fotografia F es poden identificar formes intermèdies sense flagel i algun amastigot intracel·lular (fletxa inferior).

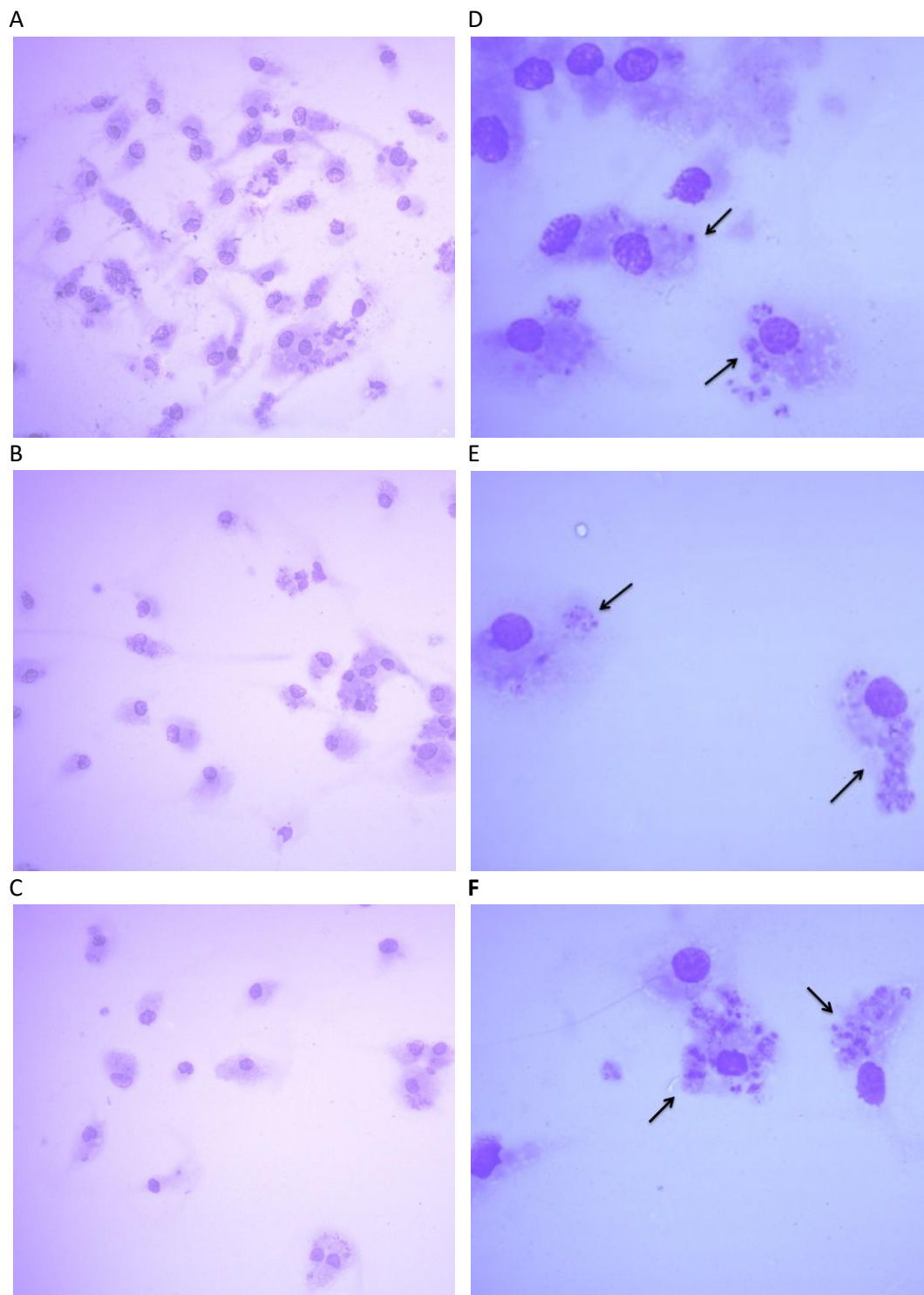


Figura 26. Infecció de cèl·lules d'origen peritoneal murí amb *L. infantum* a les 48 h. Fotografies capturades a 20 (columna esquerra) i 50 augmentos (columna dreta). Les fletxes assenyalen la presència d'amastigots intracel·lulars.

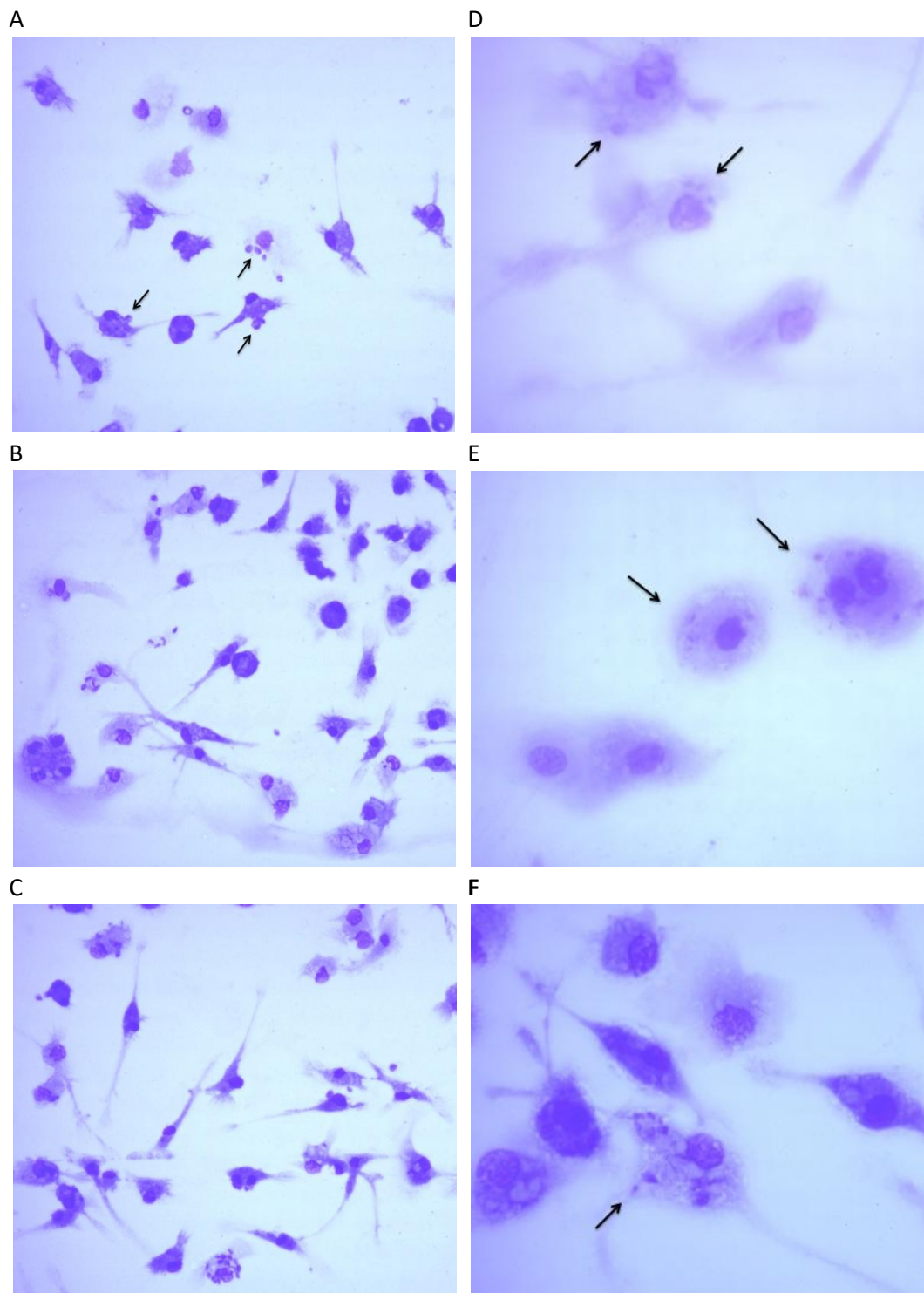


Figura 27. Infecció de cèl·lules d'origen peritoneal murí amb *L. infantum* a les 72 h. Fotografies capturades a 20 (columna esquerra) i 50 augmentos (columna dreta). A la Imatge A s'indiquen formes a la superfície cel·lular. Les fletxes corresponents a les altres imatges assenyalen amastigots intracel·lulars.

Imatges de la infecció d'una línia cel·lular de macròfags (RAW 264.7) amb *L. infantum*

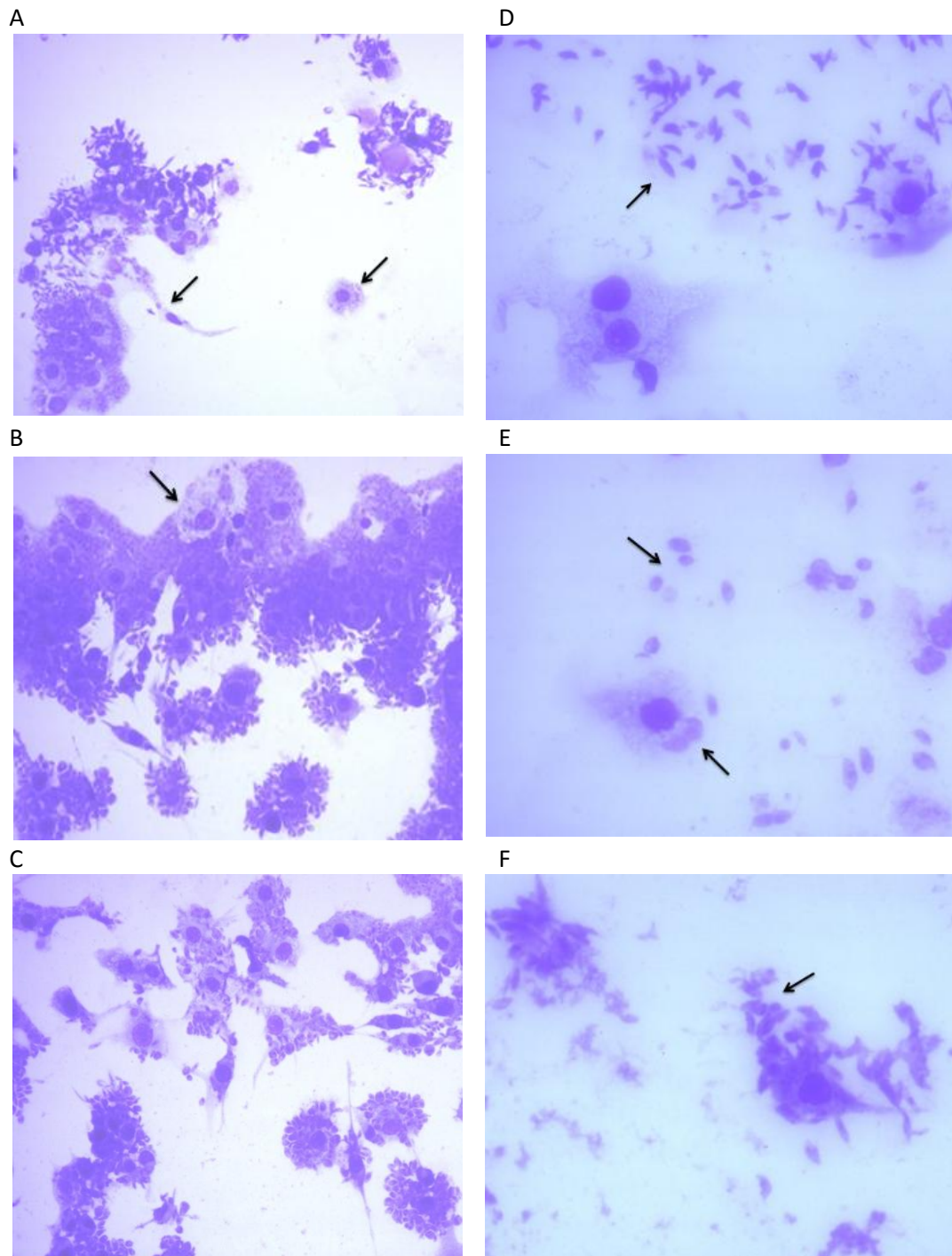


Figura 28. Infecció de cèl·lules RAW 264.7 amb *L. infantum* a les 24 h. Fotografies capturades a 20 (columna esquerra) i 50 augments (columna dreta). S'observen promastigots lliures (imatge D i E (fletxa superior)) i envoltant l'exterior de les cèl·lules (imatges F i E (fletxa inferior)). Les fletxes de les imatges A i B mostren amastigots intracel·lulars.

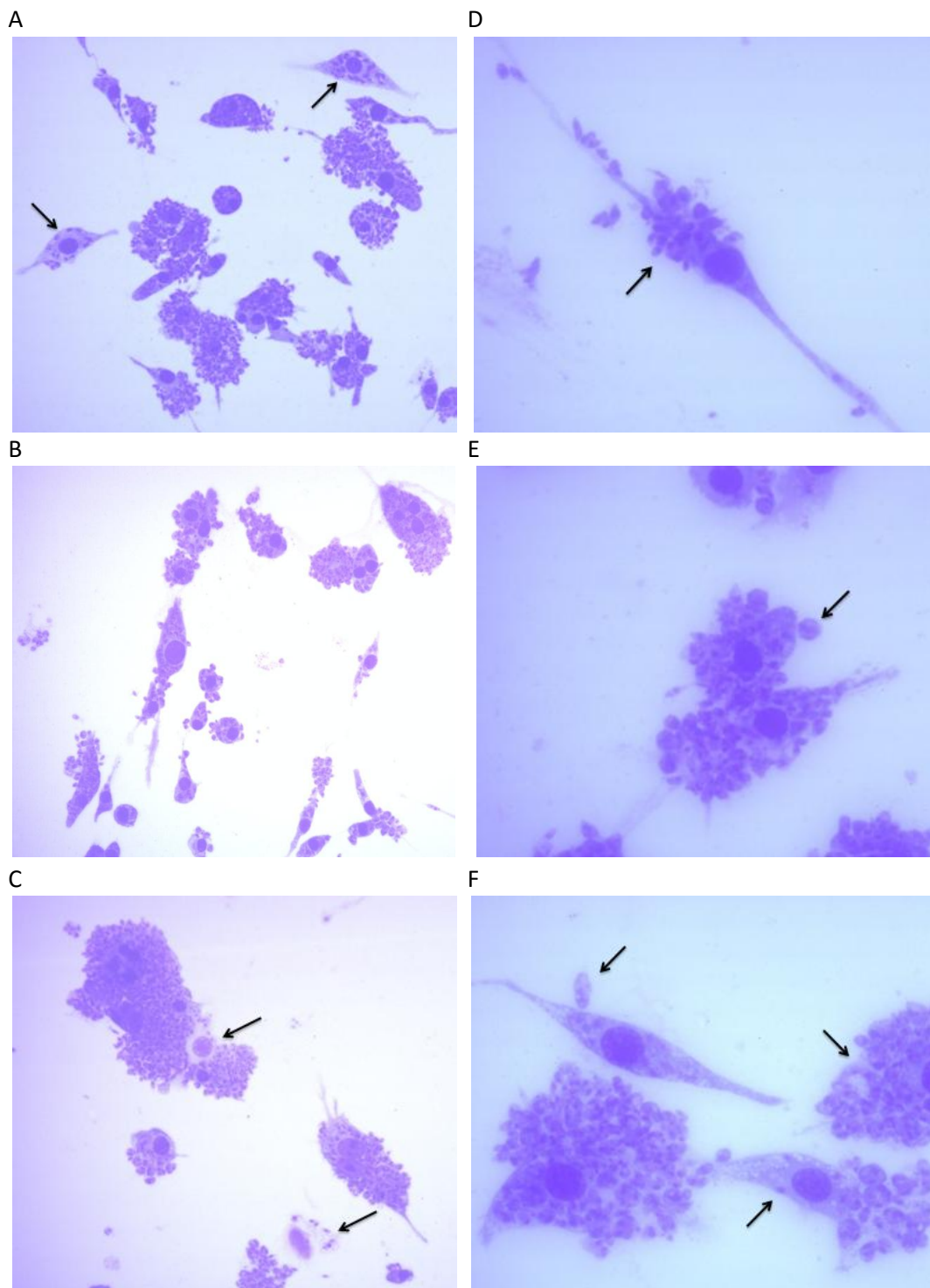


Figura 29. Infecció de cèl·lules RAW 264.7 amb *L. infantum* a les 48 h. Fotografies capturades a 20 (columna esquerra) i 50 augments (columna dreta). Apareixen promastigots a la superfície de les cèl·lules (imatge D i F (fletxa superior)), amastigots intracel·lulars (imatge A, C i F (fletxa inferior)) i formes intermèdies (imatge E i F (fletxa dreta)).

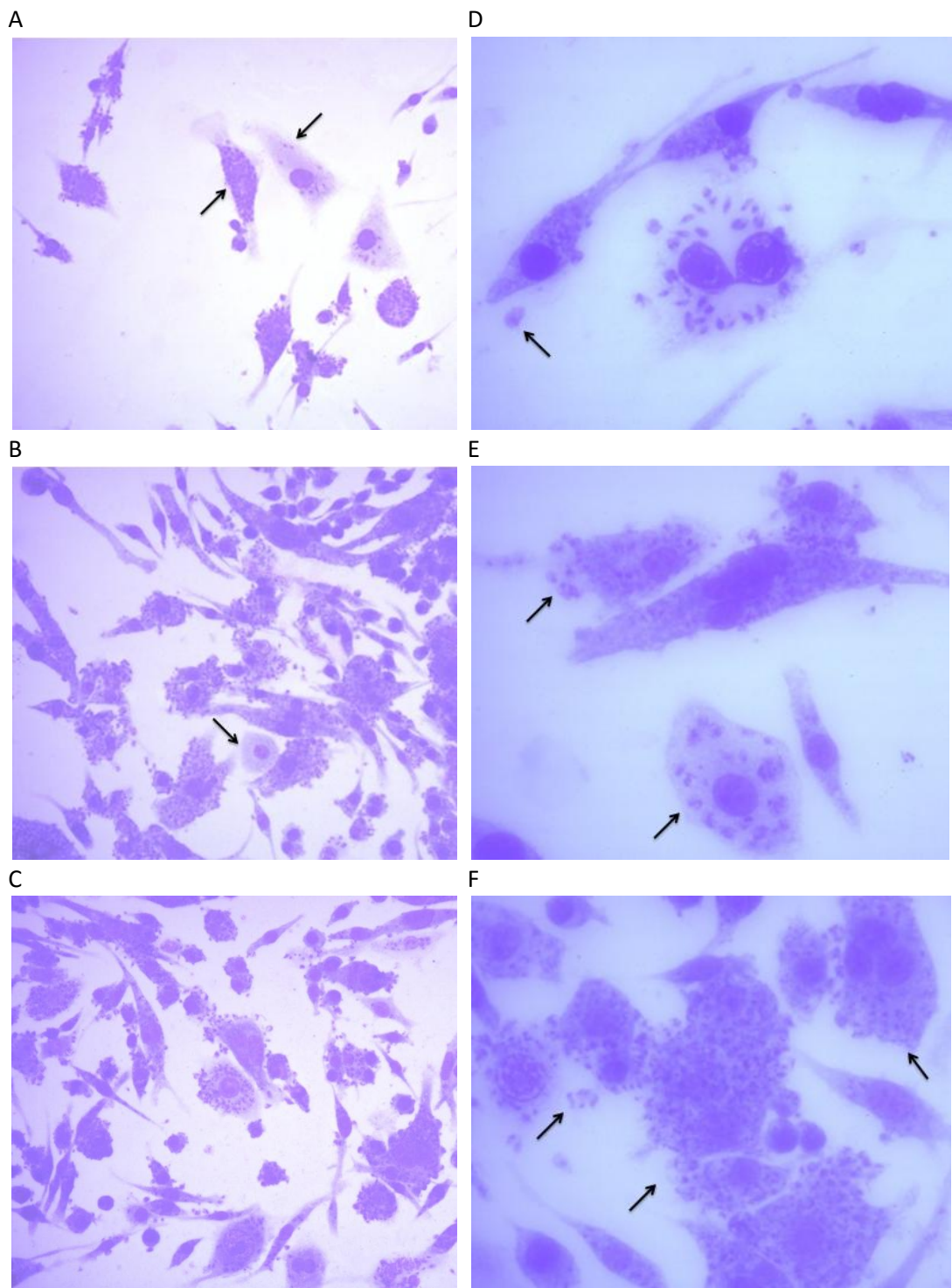


Figura 30. Infecció de cèl·lules RAW 264.7 amb *L. infantum* a les 72 h. Fotografies capturades a 20 (columna esquerra) i 50 augments (columna dreta). S'observa un nombre molt elevat d'amastigots a l'interior i exterior de les cèl·lules (imatge E i F). A la imatge A s'identifiquen els diferents graus d'infecció dels macròfags. Es pot observar algun macròfag no infectat (imatge B) i algun promastigot (imatge D).

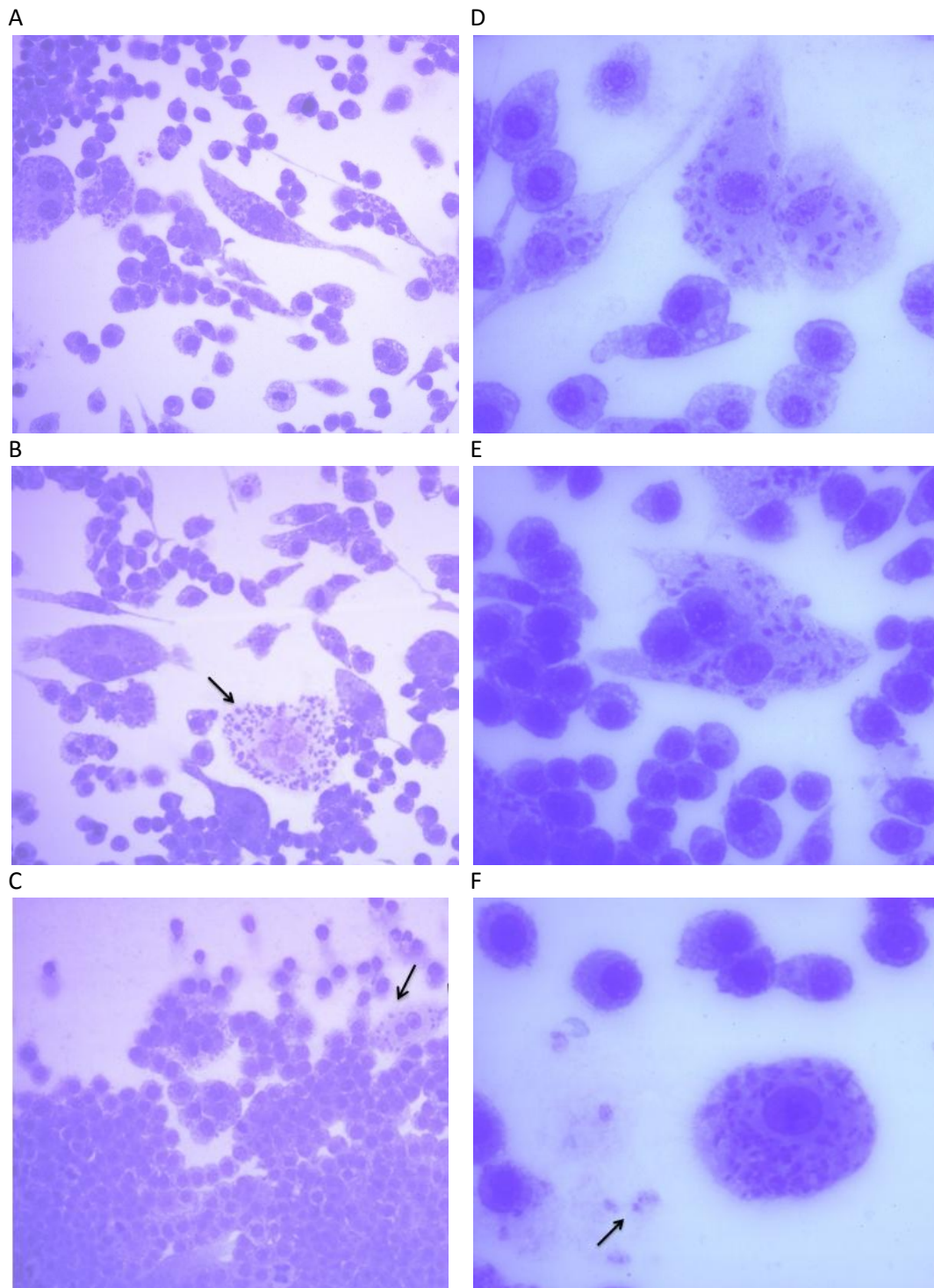


Figura 31. Infecció de cèl·lules RAW 264.7 amb *L. infantum* a les 120 h. Fotografies capturades a 20 (columna esquerra) i 50 augments (columna dreta). Les cèl·lules de mida superior apareixen amb un elevat nombre de formes amastigotes (imatge C), i algunes d'elles es mostren més difuminades, amb aparents signes de lisi (imatge B). A la imatge F s'indiquen amastigots lliures procedents de cèl·lules ja lisades.

Imatges de la infecció d'una línia cel·lular de macròfags (RAW 264.7) amb *L. major*

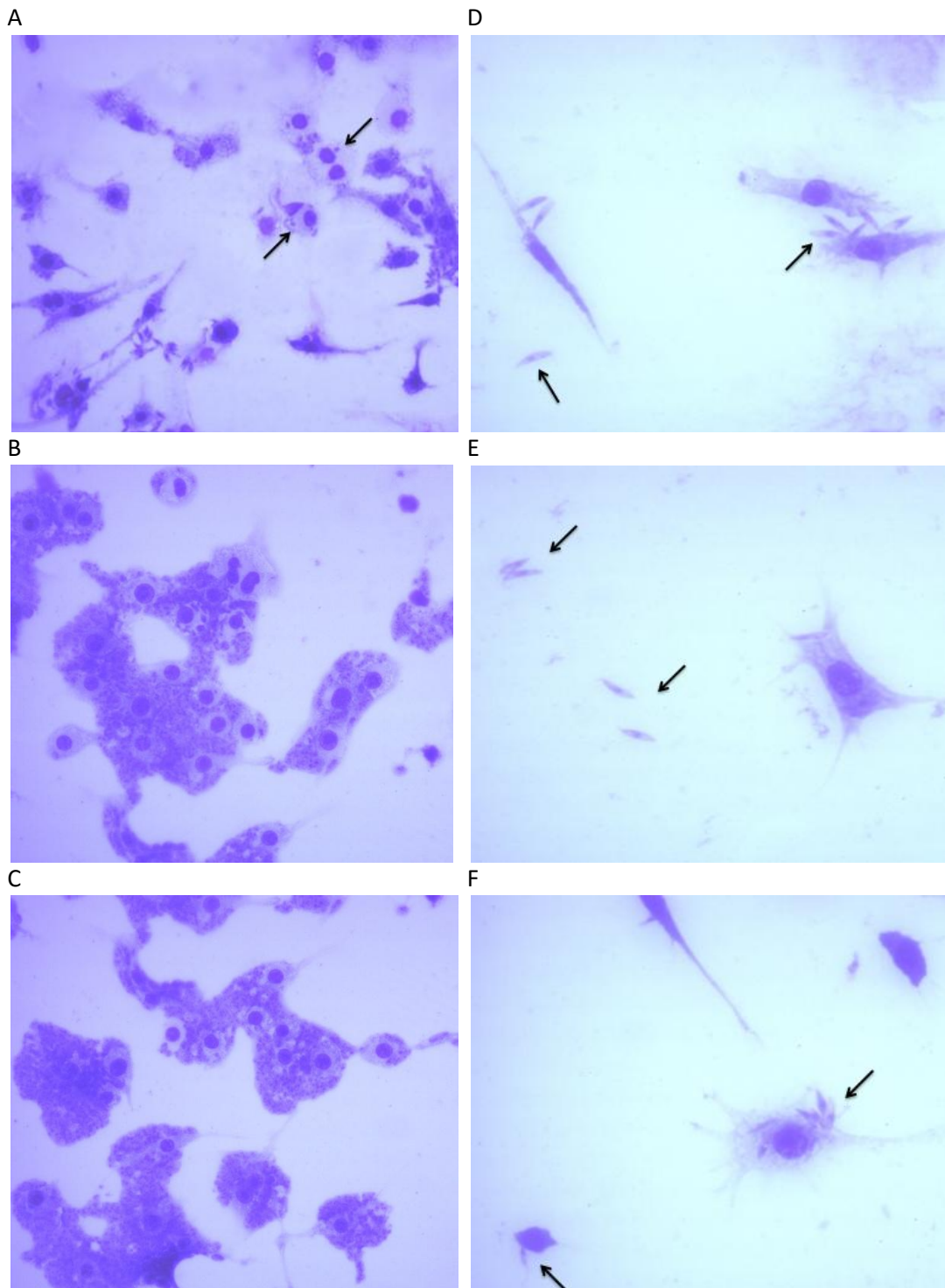


Figura 32. Infecció de cèl·lules RAW 264.7 amb *L. major* a les 24 h. Fotografies capturades a 20 (columna esquerra) i 50 augments (columna dreta). Apareixen promastigots lliures (imatge E i D (fletxa inferior)) i envoltant les cèl·lules (imatge F i D (fletxa superior)). A la imatge A es senyalitzen amastigots intracel·lulars.

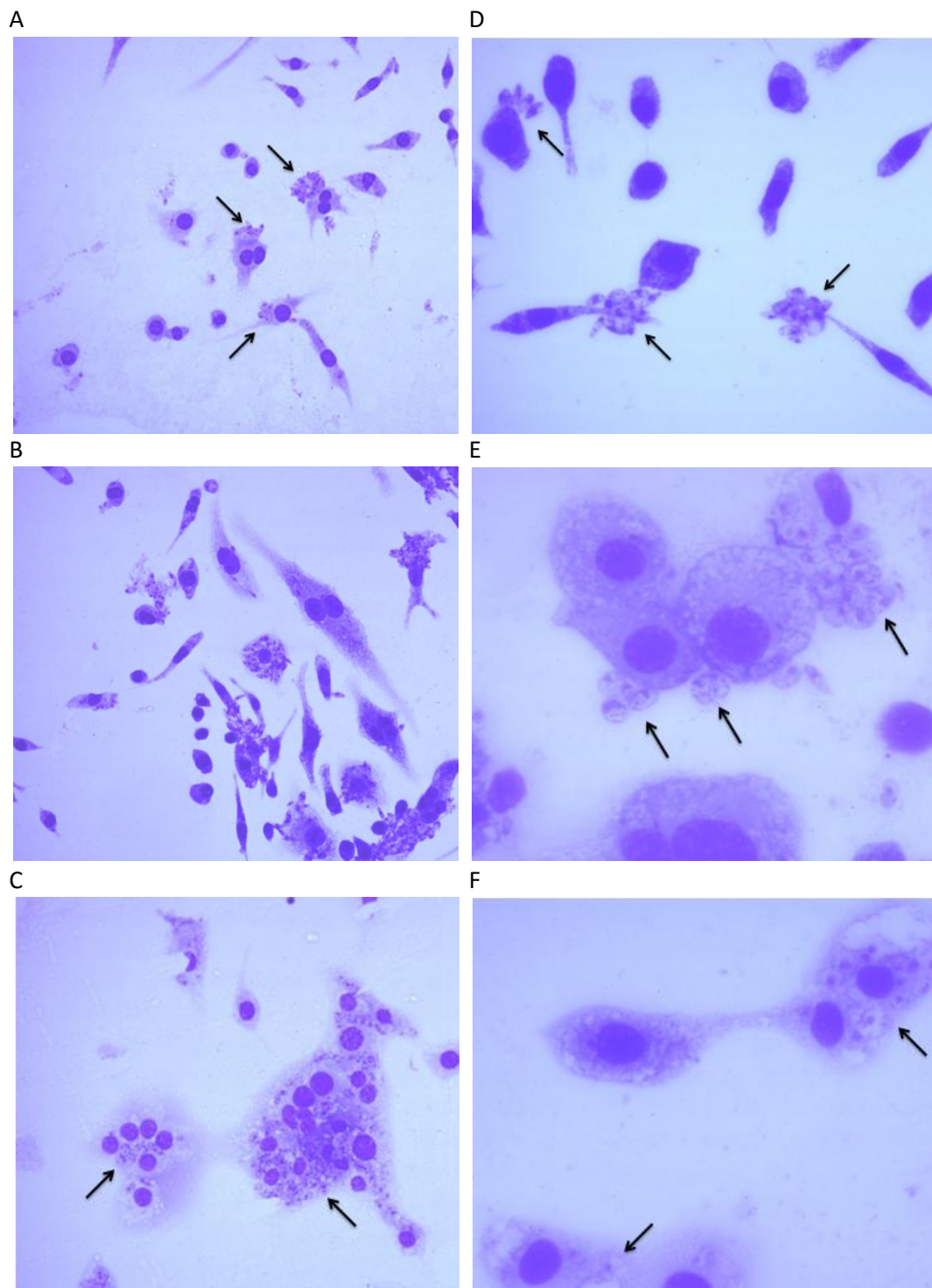


Figura 33. Infecció de cèl·lules RAW 264.7 amb *L. major* a les 48 h. Fotografies capturades a 20 (columna esquerra) i 50 augments (columna dreta). S'identifiquen promastigots a la superfície de les cèl·lules (Imatge A i D) i formes intermèdies sense flagel visible (Imatge E). Apareixen amastigots intracel·lulars (Imatge C i F).

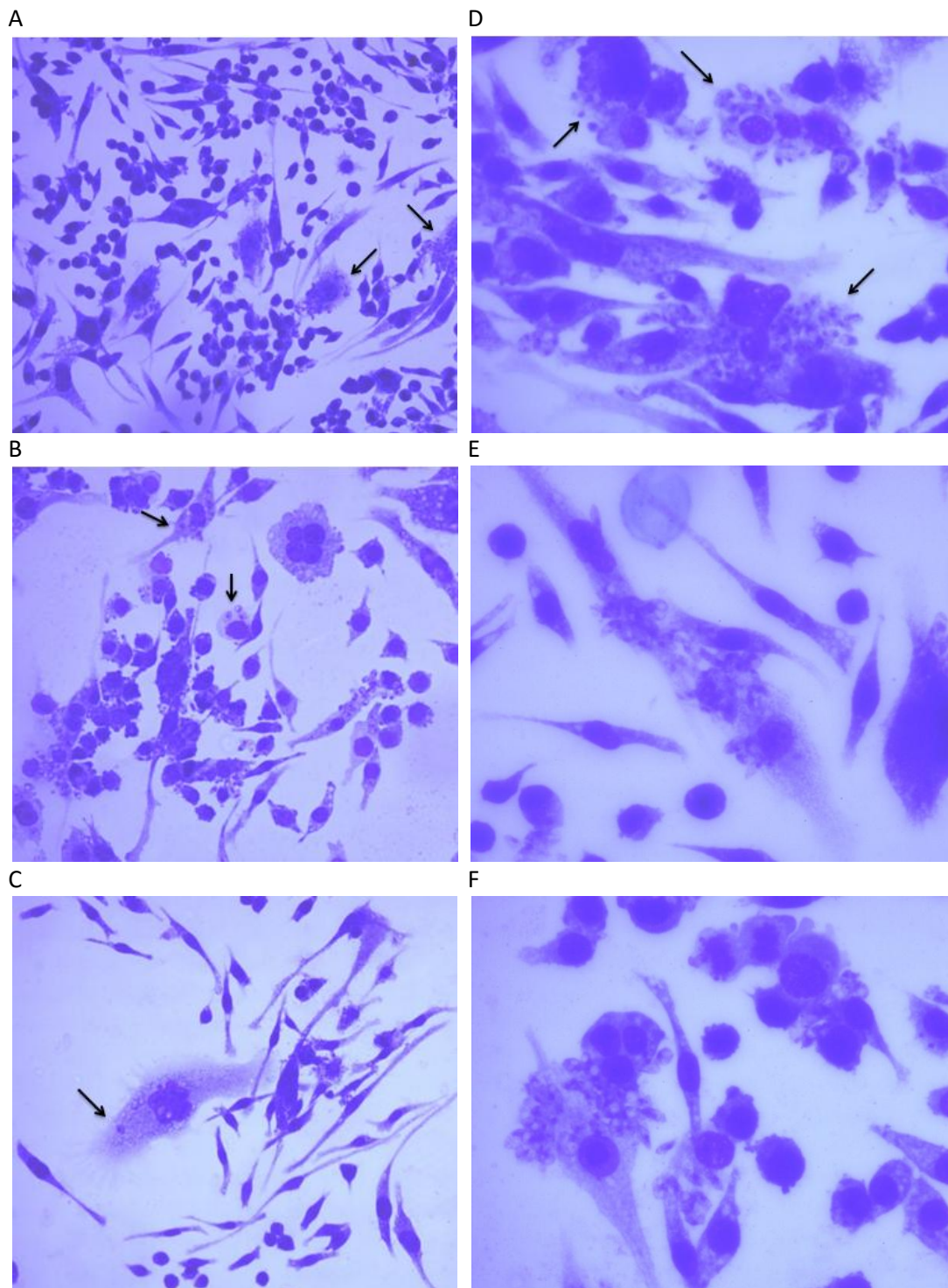


Figura 34. Infecció de cèl·lules RAW 264.7 amb *L. major* a les 72 h. Fotografies capturades a 20 (columna esquerra) i 50 augmentos (columna dreta). A la imatge D apareixen formes promastigotes (fletxa superior) i amastigotes a l'exterior de les cèl·lules (fletxes inferiors). Es diferencien cèl·lules molt infectades (imatge A) i d'altres de nova infecció (imatge B i C).

Imatges de la infecció d'una línia cel·lular de macròfags (RAW 264.7) amb *L. braziliensis*

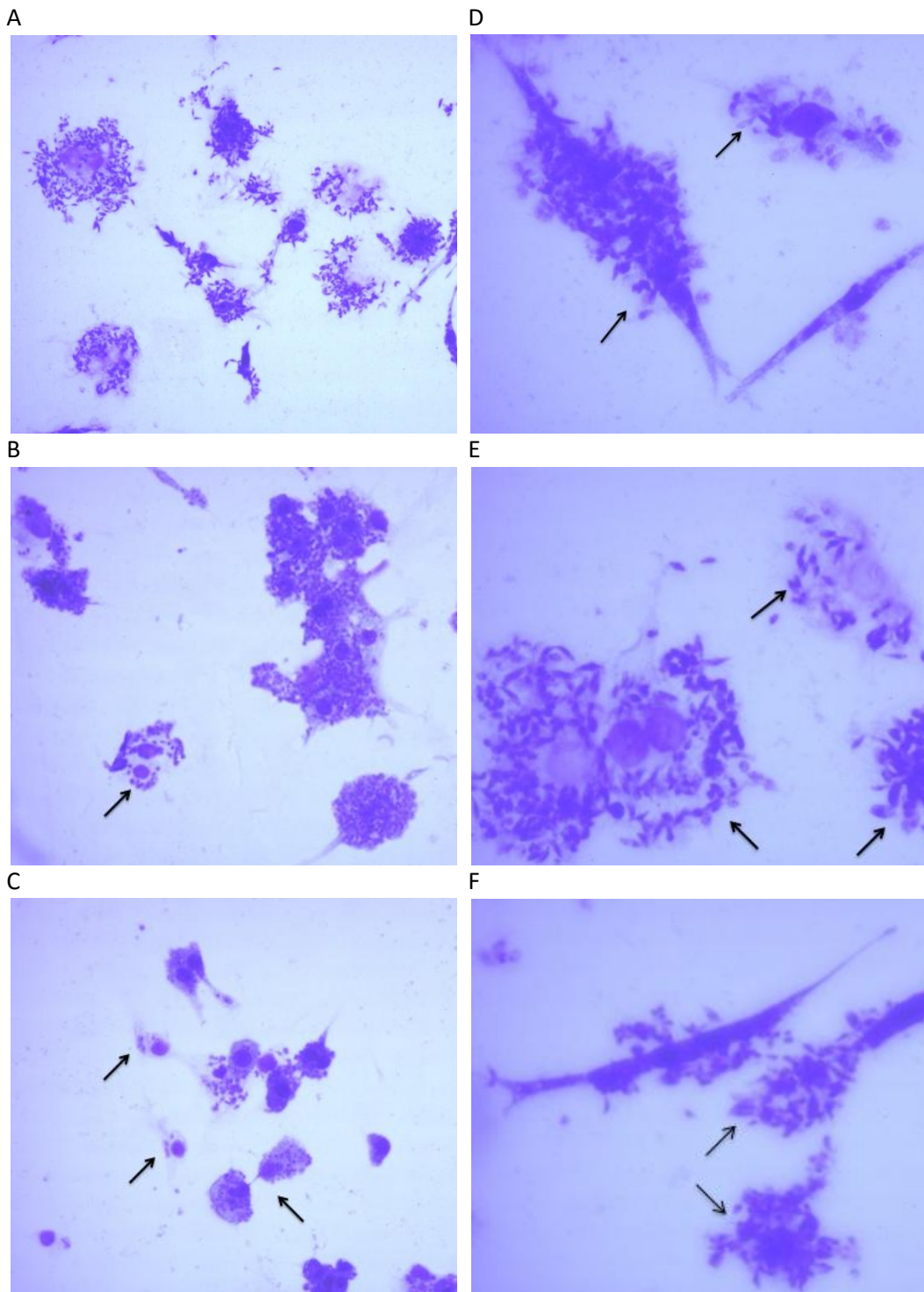


Figura 35. Infecció de cèl·lules RAW 264.7 amb *L. braziliensis* a les 24 h. Fotografies capturades a 20 (columna esquerra) i 50 augments (columna dreta). Apareixen promastigots envoltant pràcticament tots els macròfags (imatge A), aquests es senyalitzen a les imatges D, E i F. També es poden identificar amastigots intracel·lulars (fletxes imatges B i C).

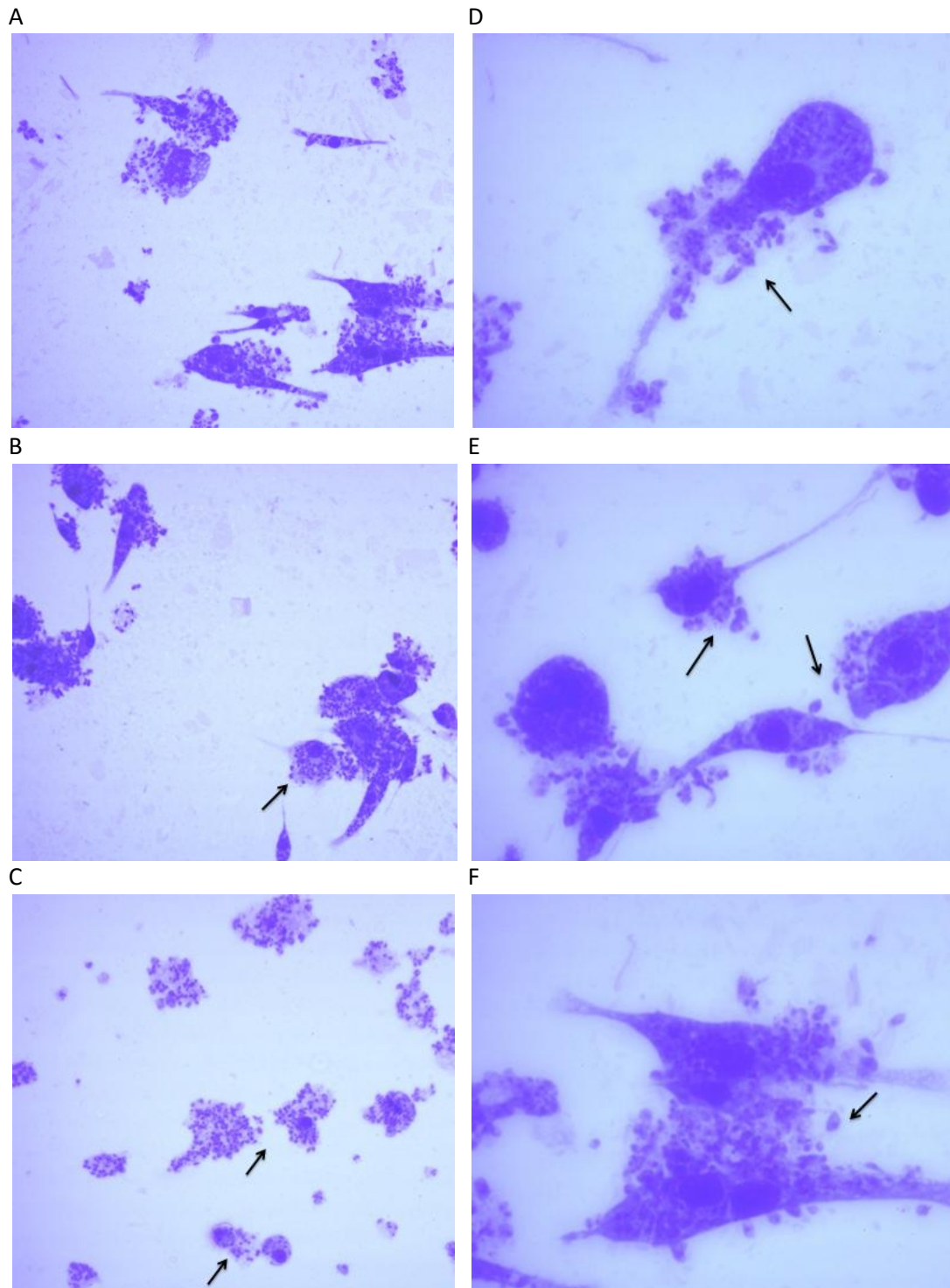


Figura 36. Infecció de cèl·lules RAW 264.7 amb *L. braziliensis* a les 48 h. Fotografies capturades a 20 (columna esquerra) i 50 augments (columna dreta). Apareixen moltes formes promastigotes a l'exterior dels macròfags, aquestes es senyalitzen a les imatges D, E i F. A la imatge B i C es senyalitzen formes intracel·lulars.

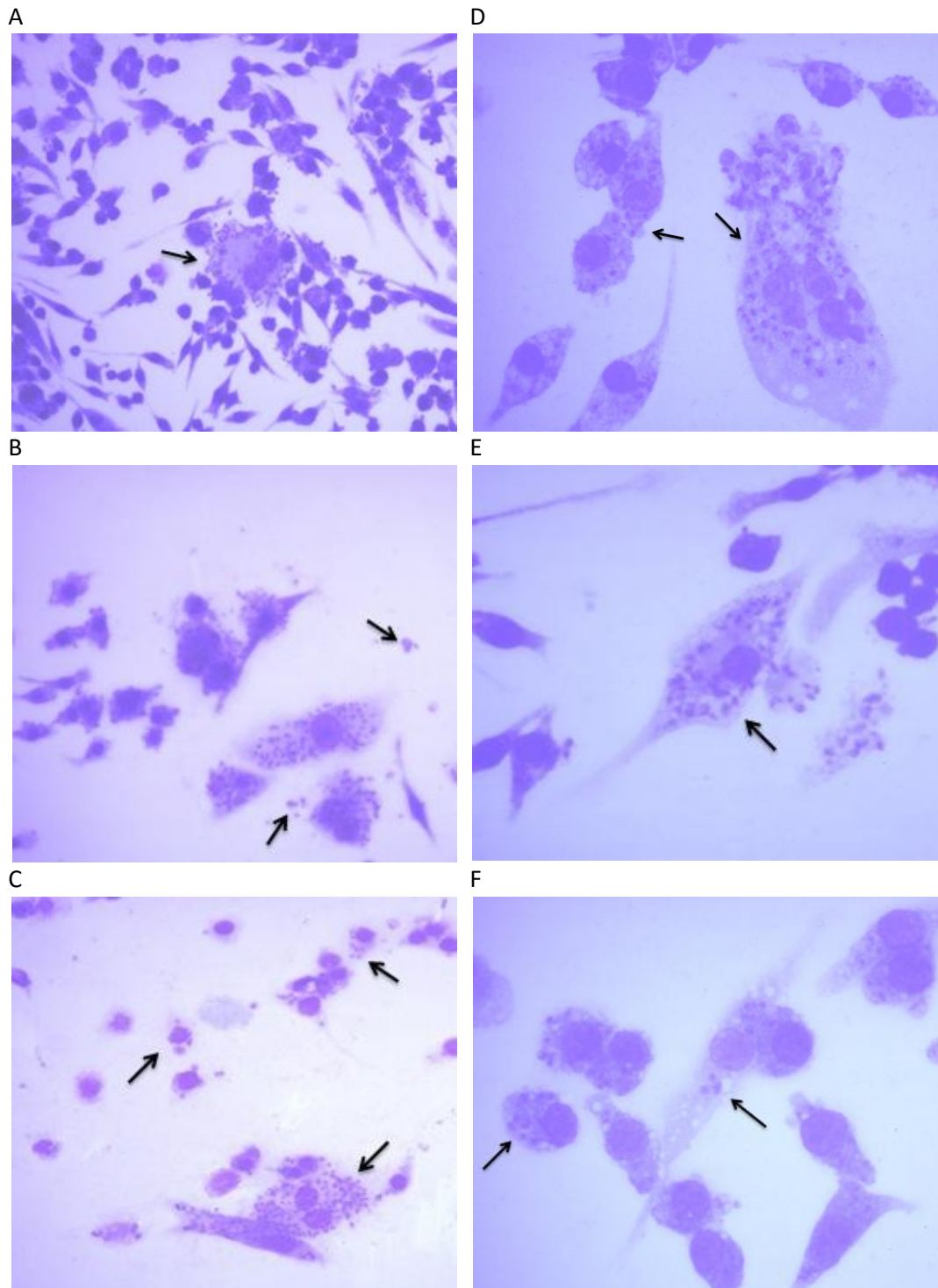


Figura 37. Infecció de cèl·lules RAW 264.7 amb *L. braziliensis* a les 72 h. Fotografies capturades a 20 (columna esquerra) i 50 augments (columna dreta). S'identifiquen macròfags molt infectats, alguns d'aquests es senyalitzen a la Imatge A, D i E. A la Imatge C es pot observar la diferència entre aquestes cèl·lules i les de nova infecció, amb un nombre de formes amastigotes molt inferior. Aquestes també es senyalitzen a la Imatge F. S'observen amastigots lliures procedents de macròfags ja lisats (senyalitzats a la Imatge B).

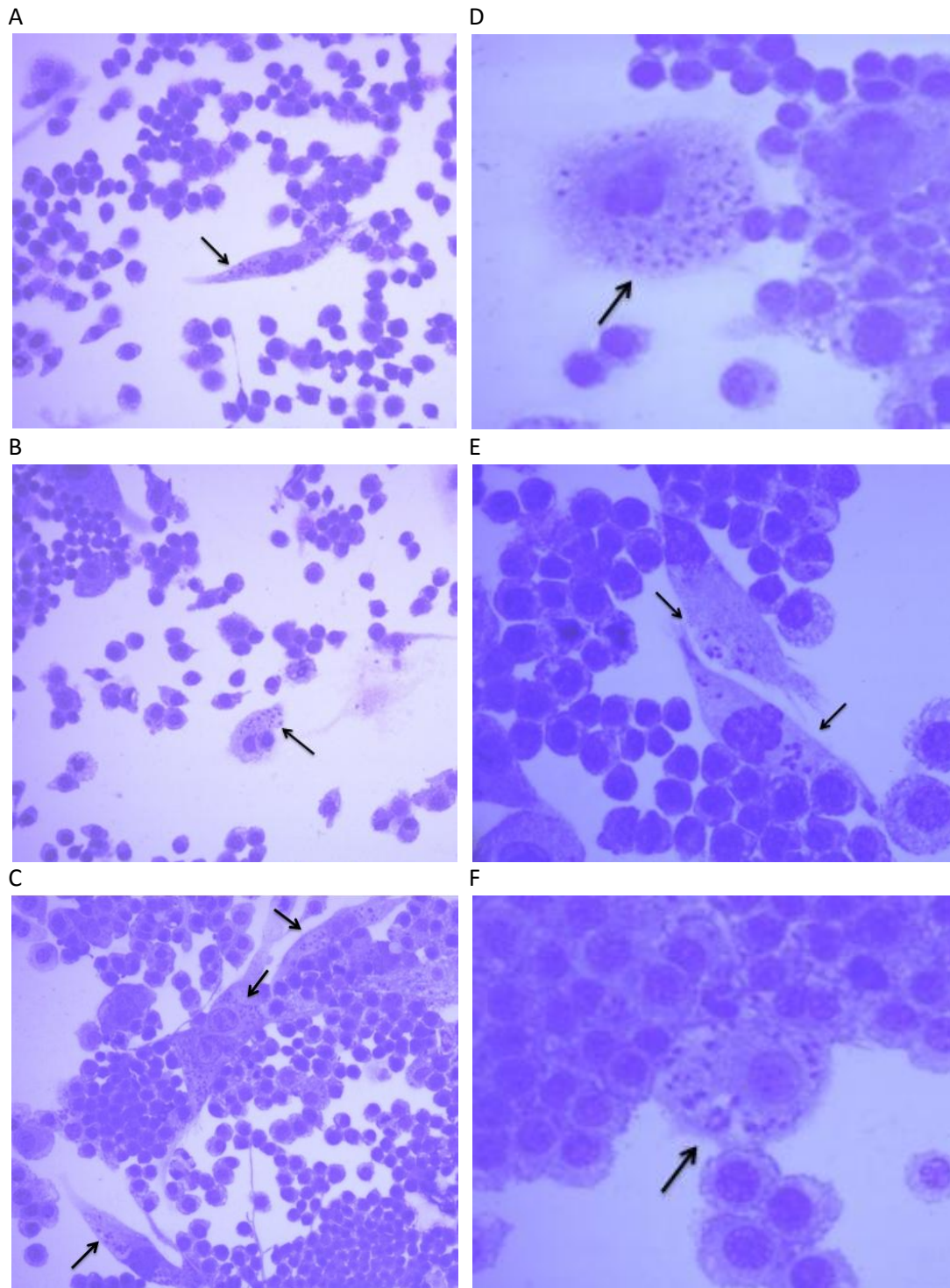


Figura 38. Infecció de cèl·lules RAW 264.7 amb *L. braziliensis* a les 120 h. Fotografies capturades a 20 (columna esquerra) i 50 augments (columna dreta). S'observen macròfags de mida superior amb un elevat nombre d'amastigots intracel·lulars, senyalitzats a les Imatges A, C i D. S'identifiquen macròfags de nova infecció (imatge E)

4. Conclusions

A partir del treball experimental realitzat, hem pogut estudiar la infecció de *Leishmania* spp. amb macròfags de línia cel·lular RAW 264.7 i d'origen peritoneal murí.

Hem optimitzat el procés d'obtenció de macròfags d'origen peritoneal murí, establint diferents procediments per la millora dels resultats (objectiu 1). Hem determinat la importància de mantenir fred el medi injectat i recollit de l'animal per evitar l'adhesió de les cèl·lules al recipient i la necessitat de centrifugar el líquid extret per obtenir una suspensió cel·lular més homogènia. De la mateixa manera, hem establert que les cèl·lules extretes de cada ratolí s'han de manipular separatament.

Hem pogut determinar un patró temporal en la infecció dels macròfags, comú tant en les cèl·lules de línia cel·lular RAW 264.7 com les d'origen peritoneal murí. Aquest mostra com a les 24 h, malgrat aparèixer algun amastigot intracel·lular, la majoria de formes són promastigotes i estan adherides a la superfície de les cèl·lules. A les 48 h, les característiques del cultiu són similars, però s'identifiquen formes extracel·lulars intermèdies, similars a les formes paramastigotes però sense flagel visible. A les 72 h, s'observa el màxim nombre d'amastigots intracel·lulars.

A partir de les característiques i el comportament dels cultius observats al llarg dels diferents assajos, s'ha dissenyat un protocol per la infecció i seguiment de cultius d'amastigots intracel·lulars (objectiu 2). Aquest s'ha elaborat considerant l'efecte observat en utilitzar diferents tipus de macròfags i procediments, amb l'objectiu de facilitar la comprensió del sistema, reduint la concentració de promastigots inicials i establint mesures per reduir la presència de formes intermèdies.

De la mateixa manera s'ha elaborat un protocol per l'obtenció digital d'imatges amb el programari Perfect Image 7.6. Aquest s'ha elaborat sense cap procediment normalitzat prèvi i per tant, s'ha dissenyat a partir del coneixement que hem anat adquirint al llarg del procés de digitalització de les preparacions (objectiu 3).

Amb aquests progressos hem complert l'objectiu general d'aquest treball, desenvolupar un procediment experimental de cultius d'amastigots de *Leishmania* spp. que permeti avançar en la quantificació dels resultats experimentals per tal que aquests siguin el més clars i objectius possibles.

5. Perspectives

El treball experimental presentat s'ha elaborat sota la direcció de la Secció de Parasitologia del Departament de Biologia, Sanitat i Medi Ambient a la Facultat de Farmàcia i Ciències de l'Alimentació (Universitat de Barcelona) amb la col·laboració del grup de recerca de Biologia Computacional i Sistemes Complexos (BIOCOM-SC, Universitat Politècnica de Catalunya-BarcelonaTech).

Malgrat assolir els objectius específics presentats a la secció "1.6 Objectius" i degut a la dificultat per comprendre el cicle del paràsit, cal seguir treballant per millorar el protocol experimental i validar-lo, tan a nivell dels cultius com de la digitalització de les imatges.

Degut a la necessitat de processar la informació procedent dels cultius, s'ha contactat amb el Grup de Processament d'Imatge i Vídeo (GPI, Universitat Politècnica de Catalunya-BarcelonaTech). La seva col·laboració permetrà avançar en el desenvolupament d'una tècnica d'anàlisi d'imatges per quantificar els resultats experimentals obtinguts.

De manera paral·lela a la millora del protocol experimental i al processat de les imatges, és necessari començar a treballar en un model IbM que ens permeti introduir, gradualment i a nivell individual, la complexitat del sistema. En aquesta línia i com a punt de partida, es poden implementar modificacions sobre el model IbM dels cultius *ex vivo* de *Trypanosoma cruzi* presentat en el Treball Final de Grau de la Núria Pedrós ("*Analysis and modelling of Trypanosomatidae family in vitro and ex vivo cultures*").

Totes les estratègies plantejades anteriorment tenen com a objectiu avançar en la comprensió dels cultius d'amastigots de *Leishmania* spp., tan per millorar els assaigs de fàrmacs com per apropar-nos al comportament del paràsit en models *in vivo*.

L'elaboració d'aquest treball m'ha permès conscienciar-me sobre l'important desconeixement que envolta les NTDs i com aquestes, sota la condició de la pobresa, són ignorades voluntàriament pels països desenvolupats. La conscienciació de la població juntament amb la disposició de recursos per la recerca i el treball multidisciplinari són indispensables per posar fi a la negligència tan mèdica com social que acompanya les 17 malalties tropicals que l'OMS considera desateses.

6. Bibliografia

- Alvar, J. P. (2001). *Las leishmaniasis: de la biología al control*. Ed. Laboratorios Inervet S.A.
- CDC. Neglected Tropical Diseases [Internet]. 2011. [citat Maig 2016]. Disponible a: <http://www.cdc.gov/globalhealth/ntd/diseases/index.html>
- Ferrer, J., Prats, C., & López, D. (2008) (2008). Individual-based modelling: an essential tool for microbiology. *Journal of Biological Physics*, 34(1-2), 19–37. <http://doi.org/10.1007/s10867-008-9082-3>
- Gállego, J. (2001). *Manual de parasitología : morfología i biología dels paràsits d'interès sanitari*. Edicions Universitat de Barcelona.
- Grimm, V. (1999). Ten years of individual-based modelling in ecology: What have we learned and what could we learn in the future? *Ecol Modell.*, 115:129–48.
- Grimm, V., Berger, U., Bastiansen, F., Eliassen, S., Ginot, V., Giske (2006). A standard protocol for describing individual-based and agent-based models, 8, 115–126. <http://doi.org/10.1016/j.ecolmodel.2006.04.023>
- Gupta, N., Goyal, N., & Rastogi, A. K. (2001). In vitro cultivation and characterization of axenic amastigotes of *Leishmania*. *Trends in Parasitology*, 17(3), 150–153. [http://doi.org/10.1016/S1471-4922\(00\)01811-0](http://doi.org/10.1016/S1471-4922(00)01811-0)
- Haefner, J. W. (2005). *Modeling Biological Systems:: Principles and Applications*. Springer Science & Business Media. Retrieved from <https://books.google.com/books?id=TeUefW0QHj4C&pgis=1>
- Jain, S. K., Sahu, R., Walker, L. a, & Tekwani, B. L. (2012). A parasite rescue and transformation assay for antileishmanial screening against intracellular *Leishmania donovani* amastigotes in THP1 human acute monocytic leukemia cell line. *Journal of Visualized Experiments : JoVE*, (December), 1–14. <http://doi.org/10.3791/4054>
- Leal, P., Ferro, L., Marques, M., Romao, S., Cruz, T., Tomás, AM., Castro, H., Quelhas, P: (2012). Automatic assessment of *Leishmania* infection indexes on in vitro macrophage cell cultures. *Lecture Notes in Computer Science (including Subseries Lecture Notes in Artificial Intelligence and Lecture Notes in Bioinformatics)*, 7325 LNCS(PART 2), 432–439. http://doi.org/10.1007/978-3-642-31298-4_51
- Olsen, O. W. (1986). *Animal Parasites: Their Life Cycles and Ecology*. Courier Corporation. Retrieved from https://books.google.com/books?id=1WXuP_4lloQC&pgis=1
- OMS, Comité de expertos sobre el control de la leishmaniasis: Informe de una reunión de un Comité de Expertos de la OMS. Ginebra: OMS; 2010. Serie de informes técnicos No. 949.

- OMS, Leishmaniasis [Internet]. Nota descriptiva N°375 [citad Desembre 2015]. Disponible a:
<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs375/es/>
- Pedros Barnils, N. (2015). Analysis and modelling of Trypanosomatidae family in vitro and ex vivo cultures. Chagas disease and leishmaniasis. Universitat Politècnica de Catalunya. Retrieved from <http://upcommons.upc.edu/handle/2117/77057>
- Prats, G. (2006). *Microbiología Clínica*. Ed. Médica Panamericana. Retrieved from <https://books.google.com/books?id=TdsoWPEYaoUC&pgis=1>
- Rajabi, M., Pilesjö, P., Shirzadi, M. R., Fadaei, R., & Mansourian, A (2016). A spatially explicit agent-based modeling approach for the spread of Cutaneous Leishmaniasis disease in central Iran, Isfahan. *Environmental Modelling & Software*, 82, 330–346.
<http://doi.org/10.1016/j.envsoft.2016.04.006>
- Rock, K. S., Rutte, E. A., Vlas, S. J. De, Adams, E. R., Medley, G. F., & Hollingsworth, T. D. (2015). Uniting mathematics and biology for control of visceral leishmaniasis. *Trends in Parasitology*, 31(6), 251–259. <http://doi.org/10.1016/j.pt.2015.03.007>
- Wiesgigl, M., & Clos, J. (2001). Heat shock protein 90 homeostasis controls stage differentiation in *Leishmania donovani*. *Molecular Biology of the Cell*, 12(November), 3307–3316.

