

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE CÓRDOBA**

**Facultad de Ciencias Químicas**



**Tesis de doctorado en Ciencias Químicas**

**Participación del aminoácido esencial L-Triptófano y su vía catabólica en la  
infección de la placenta humana por *Trypanosoma cruzi***

**Tesista: M.Sc. María José Moreira-Espinoza**

Director: Dr. Ricardo E. Fretes

**Lugar de realización:**

Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud  
INICSA-CONICET-UNC,  
e Instituto y Cátedra de Biología Celular, Histología y Embriología  
Facultad de Ciencias Médicas,  
UNIVERSIDAD NACIONAL DE CÓRDOBA

Córdoba, Argentina

Mayo 2019



## COMISIÓN ASESORA

**Dra. Graciela Panzetta-Durati**, Profesora Asociada. Investigadora Independiente CONICET, Centro de Investigaciones en Bioquímica Clínica e Inmunología (CIBICI), Facultad de Ciencias Químicas, UNC.

**Dra. Susana Rubiales**, Profesor Titular. Investigadora Principal CONICET, Instituto de Farmacología Experimental de Córdoba (IFEC), Facultad de Ciencias Químicas, UNC.

**Dra. Claudia Cristina Motrán**, Profesora Asociada, Investigadora Independiente CONICET, Centro de Investigaciones en Bioquímica Clínica e Inmunología (CIBICI), Facultad de Ciencias Químicas, UNC.

### Director

**Dr. Ricardo E. Fretes**, Profesor Titular, Cátedra de Biología Celular, Histología y Embriología. Director del Instituto de Biología Celular (IBC), Facultad de Ciencias Médicas, UNC. Docente Investigador externo de INICSA (CONICET).

### Evaluador Externo

**Dr. Oscar Adelmo Botasso**, Investigador Superior, CONICET, Instituto de Inmunología, Escuela de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Rosario. Centro Científico Tecnológico CONICET – Rosario (CCT-Rosario)

## DEFENSA ORAL Y PÚBLICA

Lugar y Fecha:

Calificación:

### Tribunal

Firma:

Aclaración:

Firma:

Aclaración:

Firma:

Aclaración:

Firma:

Aclaración:

El presente trabajo de tesis fue desarrollado en:  
Universidad Nacional de Córdoba (UNC),  
Facultad de Ciencias Médicas (FCM).  
Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET)  
Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud (INICSA-CONICET);  
Instituto y Cátedra de Biología Celular, Histología y Embriología,  
(IBC-FCM-UNC).  
Córdoba, Argentina



Este trabajo fue realizado gracias al apoyo económico de:  
Secretaría de Ciencia y Tecnología de la Universidad Nacional de Córdoba (SECyT-  
UNC).

Ministerio de Ciencia y Tecnología de la Nación (MINCyT):  
Fondo para la Investigación Científica y Tecnológica (FONCYT-PICT).  
Ministerio de Ciencia y Tecnología de la Provincia de Córdoba: Proyectos de  
Investigación y Desarrollo (PID).

Secretaría de Ciencia y Tecnología, Universidad Nacional de la Rioja (UNLaR).  
Instituto de Investigaciones de la Universidad Nacional de Villa María (UNVM).  
Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) con  
financiamiento de la beca doctoral.



## AGRADECIMIENTOS en Argentina

- ✚ A mi director, **Dr. Ricardo E. Fretes**, por haberme abierto las puertas de su laboratorio, por su guía durante todos estos años.
- ✚ A los miembros de la Comisión Asesora: **Dra. Graciela Panzetta-Durati, Dra. Susana Rubiales, Dra. Claudia Cristina Motrán y Dra. Adriana Gruppi** por su guía y disponibilidad en esta tesis.
- ✚ A **Dr. Aldo Eynard y Dra. Mirta Valentich**, agradezco por cada detalle que han tenido conmigo, por los momentos muy especiales y sus consejos, con mucho cariño.
- ✚ A **SECyT-UNC** por haberme otorgado la Beca Latinoamericana de 400 años de la UNC que me ha permitido realizar y llevar a cabo esta tesis.
- ✚ A **CONICET** por haberme otorgado la Beca Doctoral Latinoamericana que me ha permitido realizar y llevar a cabo esta tesis.
- ✚ A **Argentina** un gran e impresionante país que ha sido parte de mi crecimiento personal en estos 6 años de estadía.
- ✚ A **Betina Albrecht, Marina L. Cervera, Erika Pérez Daher**, aunque no es fácil estar en la secretaría de posgrado, les agradezco el ahínco que tienen al atendernos, por cada palabra de aliento y cariño, mil gracias por todo.
- ✚ Al departamento de enfermería, camilleros, personal de quirófano del Hospital Privado: **Carmen Chuychuy, María Bazan, Alcira, Guadalupe, Eugenia, Noelia, Claudia, Leticia, Marcia, Juana, Sandra, Florencia, Alejandra**, a pesar de su arduo trabajo, siempre hicieron un tiempo para brindarme su apoyo. Mil gracias, sin ustedes esto no hubiese sido posible.
- ✚ Mis compañeros de laboratorio y cátedra en Argentina: **Joana, Fernanda, Orne, Cintia, Andrea y Kape, Gina, Luciana, Mariana, Euge, Yanet, Mirta, Maria, Belén, Renata, Eva, Patri Q, Pato K., Isabel, Marce, Belén, Marianella, Georgi, Martin, Gastón, Jorge, Martin, Noelia, Maribel, Nelso, Nestor, Clari, Sonia, Gaby, Mirta R., Luz, Mirta, Gabi, Sr. Cuevas, Ricardo Mattos, Nestor Boeto, Marcos, Silvana, Dani, Romina, Mirta, Mirian, Gaby, Cueva, Patri Jiménez**, gracias por estos años de aprendizaje, de cariño y de esas palabras de aliento. Y por ser una familia en tiempos de subsidios y sin subsidios seguimos en lucha.
- ✚ A **Triquell, Esteban y Valentina, Jessica y Familia, Yanet y Familia, Andrea y Kape, Zulema y Raúl, Tere y Victor, Adriana y Hugo, Belén, Oscar y Luca, Patricia Kunda y Familia**, gracias por darme ese calor de hogar. **Adriana, Nelli, Daniela Mezzano**, gracias porque me ayudaron a encontrarme, renovarme y crecer.



✚ A cada uno de los que me apoyaron a construir este proyecto *Dra. Silvina LoPresti, Dra. Alejandra Báez, Dra. Mariana Strauss, Dra. Patricia Paglini, Dr. Pedro Gil,* por su apoyo incondicional.



## Nicaragua Nicaragüita

*Carlos Mejía Godoy*

Ay Nicaragua, Nicaragüita  
Recibe como prenda de amor  
Este ramo de siempre vivas y jilincos  
Que hoy florecen para vos  
Cuando yo beso tu frente pura  
Beso las perlas de tu sudor  
Más dulcita que la frutita del tigüilote  
Y el jocote tronador

Ay Nicaragua Nicaragüita  
Mi cogoyito de pijibay  
Mi pasión de enterró en el surco de tu querencia  
Como un granito de maíz  
Es tu saliva elaste y dulcita  
Como la savia del marañón  
Que restaña con alegría todos los días  
Mi rebelde corazón  
Que restaña con alegría todos los días  
mi rebelde corazón

La flor más linda de mi querer  
Abonada con la bendita, Nicaragüita,  
Sangre de Diriangen.  
Ay Nicaragua sos más dulcita  
Que la mielita de Tamagas  
Pero ahora que ya sos libre, Nicaragüita,  
Yo te quiero mucho más  
Pero ahora que ya sos libre, Nicaragüita,  
***Yo te quiero mucho más***





## AGRADECIMIENTOS en NICARAGUA

- ✚ A *Dios*, se supremo, mi energía, mi fuerza, mi todo.
- ✚ A nuestra buena Madre "*María Santísima*", que, en los días difíciles, me ha consolado.
- ✚ A mi *niña interior*, mi otro yo, mi motivo, mi motor, si te lastime en todos estos seis años te pido perdón, pero ha llegado la hora de cerrar este ciclo y seguir adelante.
- ✚ A mis padres *Alba María y José* mis grandes pilares, mis polos a tierra, mis amigos, hermanos, mis grandes amores, mi todo y mi nada.
- ✚ *Nani (Roxana)* tan diferentes y tan iguales, mi gran hermana, más que orgullosa estoy de ti.
- ✚ *Sofi*, eres mi otra mitad, mi razón de ser, y de levantarme día a día. Te amo por siempre mi bebida.
- ✚ A mi *NICARAGUA*, mi patria, mi ombligo, mi cultura, mi herencia. Soy tú y tú eres yo. Y aunque eres pequeña, *SIEMPRE TE SUEÑO GRANDE*.
- ✚ Abu *Rosa y Anita*, me dejaron un tesoro invaluable, *GRACIAS POR SU AMOR*, su ejemplo de mujeres valientes y aguerridas.
- ✚ *María Cristina*, te extraño mucho fuiste la mejor madrina que pude haber elegido y aunque no estas presente, sé que desde el cielo estás conmigo. *TE AMARÉ SIEMPRE*.
- ✚ *Luzmillia*, gracias por ser luz en mi vida, me enseñaste un cachimbo de cosas y aun desde el cielo siempre sigues brillando. *GRACIAS*.
- ✚ *Edel Paredes y Carmen Caballero*, gracias por ser además de jefas, grandes maestras, amigas y consejas.
- ✚ *Monset y Francisco*, gracias por ser mis ángeles mexicanos.
- ✚ A cada uno de mis *maestros*, los hermanos *Maristas* y monjas de *La Pureza de María*, que poco a poco dieron su granito de arena para ser de mí una extraordinaria mujer. Dejaron grandes huellas.
- ✚ A mi pequeña y gran familia, gracias por estar siempre conmigo en la distancia: *Mita Andrea y mi abuelita Celina, Martha Lucia, Betty, Guadalupe, Elvin, Douglas y Marlin, Roberto, Otto y Piedad, Marta Eugenia, Yasmina, Paquita, Miguel y Mercedes, Sole y Don Hugo, Rodrigo y Luquitas*.





- ✚ A esas personas muy especiales que siempre están a mi lado, y me han demostrado su cariño y amor; *Tía Luz, Tía Amparo, Doña Lilian, Doña Rosita, Doña Ivon, Doña Elbita, Doña Tona, Padre Western mi abuelo adoptivo.*
  
- ✚ A mis amigos en Nicaragua: *Claudia Molina, Melissa y Angel Francisco, Cristel, Fabiola, Kenia, Marielos, Meyling, Jeffrey, Silvio, Alberto M., Martha y Sergio, Rodrigo, Alma Nubia, Byron, Elvira, Joana, Martita Jose, El gato (Cristiam), Mayerling, Lidice*, gracias por animarme y hacerme sentir en casa. *Katya, Arnoldo, Heysell, Massiel, Carlos*, por ser unas víboras muy especiales. Y mis amigos en Argentina: *Juli, Desi, Ana, Alda, Adriana, Jessi.*
  
- ✚ A mis *estudiantes* en Nicaragua, quienes siempre fueron un aliento para seguir día a día.

*“Dulce es el fruto de la adversidad,  
que, como el sapo feo y venenoso,  
lleva en la cabeza una preciosa joya”*  
**William Shakespeare**



## Contenido

|  |    |
|--|----|
| RESUMEN.....   | 1  |
| ABSTRACT.....  | 4  |
| ABREVIATURAS.....  | 6  |
| INTRODUCCIÓN.....  | 8  |
| ENFERMEDAD DE CHAGAS: Generalidades.....   | 8  |
| Agente causal.....   | 9  |
| Transmisión.....   | 10 |
| Transmisión congénita.....   | 10 |
| PLACENTA HUMANA.....   | 11 |
| Características estructurales.....   | 11 |
| Vellosidades coriónicas.....   | 12 |
| Barrera placentaria.....   | 14 |
| Cultivo de explantos placentarios.....   | 15 |
| VÍA CATABÓLICA DEL L-TRIPTÓFANO.....   | 17 |
| Indoleamina 2,3-dioxigenasa.....   | 21 |
| HIPÓTESIS.....   | 25 |
| OBJETIVOS.....   | 26 |
| Objetivo General:.....   | 26 |
| Objetivos Específicos:.....  | 26 |
| MATERIALES Y MÉTODOS.....  | 27 |
| Placenta.....  | 27 |
| Parásitos.....   | 27 |
| Explantos placentarios de vellosidades coriónicas: obtención y diseño experimental básico de cultivo.....  | 28 |
| Diseño de la infección de los explantos placentarios por <i>T. cruzi</i> .....                             | 28 |
| Tratamiento de explantos placentarios con L-Trp.....   | 28 |
| Ensayo de inhibición y estimulación de IDO.....  | 29 |
| Tratamiento con 3-HK y 3-HAA y cuantificación de la movilidad de Tps de <i>T. cruzi</i> .....              | 29 |
| Tratamiento con metabolitos de la vía de la Kyn de los explantos infectados o no con <i>T. cruzi</i> ..... | 29 |
| Viabilidad de los explantos placentario por el ensayo de MTT.....  | 30 |
| Cuantificación de proteínas totales.....   | 30 |
| Extracción de ADN de tejido placentario infectado con <i>T. cruzi</i> .....                                | 30 |
| PCR en tiempo real.....  | 31 |
| Análisis de L-Trp mediante HPLC.....   | 33 |
| Ensayo de Actividad enzimática de IDO.....   | 34 |



|   |    |
|---|----|
| Determinación de quinurenina en homogenato de explantos placentarios .....  | 34 |
| Determinación de quinurenina en sobrenadantes de medios de cultivos .....   | 35 |
| Análisis inmunohistoquímico:.....   | 36 |
| Procesamiento de las muestras biológicas.....   | 36 |
| Adquisición imágenes .....  | 36 |
| Análisis de las imágenes .....  | 36 |
| Análisis estadístico.....   | 37 |
| RESULTADOS.....   | 38 |
| Objetivo 1. Analizar el efecto de la infección por <i>T. cruzi</i> en la activación del catabolismo de L-Trp en explantos placentarios.....   | 38 |
| Efecto del tiempo de cultivo sobre la viabilidad de los explantos placentarios .....  | 38 |
| Efecto de la infección por <i>T. cruzi</i> sobre la actividad de IDO en explantos placentarios ...  | 39 |
| Efecto de la infección por <i>T. cruzi</i> sobre la localización y expresión proteica de la enzima IDO.....   | 39 |
| Efecto de la infección por <i>T. cruzi</i> en explantos placentarios sobre la producción de Kyn   | 41 |
| Efecto de la infección por <i>T. cruzi</i> sobre la localización y expresión de AhR.....  | 42 |
| Conclusión parcial.....   | 44 |
| Objetivo 2. Evaluar la participación de la actividad de IDO, enzima limitante de la vía de L-Trp, en el control de la infección de explantos placentarios con <i>T. cruzi</i> . .....     | 45 |
| Ensayo de inhibición y estimulación de IDO.....   | 45 |
| Producción de L-Kyn en explantos placentarios tratados con L-1MT o IFN- $\gamma$ .....  | 46 |
| Efecto de la inhibición y estimulación de la actividad de IDO sobre la infección de explantos placentarios a 24 h y 72 h de infección.....  | 47 |
| Conclusiones parciales .....  | 50 |
| Objetivo 3. Determinar la participación de metabolitos de la KP como antimicrobianos en la infección con <i>T. cruzi</i> .....  | 52 |
| Efecto de la adición exógena de L-Trp sobre IDO en explantos placentarios infectados o no con <i>T. cruzi</i> .....   | 52 |
| Efecto de la adición exógena de L-Trp sobre la producción de Kyn en el tejido placentario y sobrenadante de cultivo de explantos placentarios infectados o no con <i>T. cruzi</i> . ..... | 53 |
| Efecto de L-Trp sobre replicación de <i>T. cruzi</i> en explantos placentarios .....  | 55 |
| Efecto de los metabolitos de la vía de la Kyns en la infección de los explantos placentarios .....  | 57 |
| Efecto de metabolitos de la vía de la Kyns sobre la carga parasitaria en explantos placentarios infectados con <i>T. cruzi</i> .....  | 58 |
| Conclusiones parciales .....  | 60 |
| Objetivo 4. Analizar la expresión proteica de la IDO, AhR e IFN- $\gamma$ en placentas provenientes de mujeres con enfermedad de Chagas .....   | 62 |
| Expresión de IDO en placentas de mujeres con enfermedad de Chagas.....  | 62 |
| Localización y expresión de AhR en placentas de mujeres con enfermedad de Chagas ....   | 63 |



|   |    |
|---|----|
| Localización y expresión de IFN- $\gamma$ en placentas de mujeres con enfermedad de Chagas .. | 64 |
| Conclusiones parciales .....  | 65 |
| DISCUSIÓN .....   | 66 |
| BIBLIOGRAFÍA.....   | 73 |
| ANEXOS.....   | 87 |
| RESÚMENES PUBLICADOS EN REVISTAS CON REFERATO.....  | 87 |
| COLABORACIONES EN RESUMENES EN REVISTA CON REFERATO .....                                     | 88 |
| HOJA DE INFORMACION AL PACIENTE.....  | 92 |
| • Procedimiento del estudio .....   | 92 |
| • Posibles riesgos e incomodidades .....  | 93 |
| • Beneficios.....   | 93 |
| • Confidencialidad .....  | 93 |
| • Participación voluntaria.....   | 93 |
| Consentimiento informado.....   | 94 |
| COMITÉ DE ETICA .....   | 95 |
| INDICE DE FIGURAS .....   | 96 |
| INDICE DE TABLAS .....  | 97 |



## RESUMEN

La degradación del aminoácido esencial L-Triptófano (Trp) se inicia con la actividad de la enzima indoleamina 2,3-dioxigenasa (IDO) y se continúa con la vía de la quinurenina (KP). IDO es altamente expresada en la placenta humana. La depleción local de L-Trp y/o la presencia de metabolitos de la KP, participan en inmunoregulación y pueden ejercer funciones antimicrobianas contra patógenos intracelulares. Se ha descrito que esta vía participa en el control de la replicación de *T. cruzi*, sin embargo, no ha sido estudiada en el tejido placentario humano infectado por este parásito. En esta tesis nos propusimos analizar la participación de la vía catabólica del L-Trp en la infección de la placenta humana con el agente causal de la transmisión congénita del Chagas.

Para ello se utilizó un modelo experimental de infección en explantos de placenta humana a término *in vitro* y la expresión de proteínas de la vía de la Kyn en placentas a término provenientes de mujeres con enfermedad de Chagas (PEC), como estudio *in vivo*. Los explantos de vellosidades coriónicas fueron cultivados con  $10^5$  tripomastigotes de *T. cruzi* o sin parásitos (control) en diferentes tiempos de cultivo. Para cada ensayo, se emplearon no menos de 3 placentas distintas. En total se emplearon  $n = 20$  placentas para los ensayos *in vitro*. A fin de inhibir o estimular la actividad de IDO se utilizaron diferentes compuestos como L-1-Metil-triptófano (L-1MT), Interferón- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) y Trp exógeno. También empleamos metabolitos de la KP como 3-hidroxiquinurenina (3-HK) y ácido 3-hidro antranílico (3-HAA). Se valoraron: Trp por HPLC, producción de Kyn, actividad específica de IDO y carga parasitaria (qPCR) en el explanto después de los diferentes tratamientos. Se utilizó inmunohistoquímica (IHQ) para la determinación de la expresión de proteínas IDO, AhR e IFN- $\gamma$ . El análisis estadístico se realizó mediante ANOVA o prueba “t” de student, utilizando el software GraphPad Prism 7.0. Para evaluar la infección de los explantos se empleó un modelo lineal generalizado para cada una de las variables. Los valores de  $p < 0.05$  fueron considerados significativos.

En el transcurso de esta tesis se demostró que a ningún tiempo de cultivo se observaron diferencias significativas tanto en la actividad de IDO como en la expresión relativa de esta enzima entre explantos infectados con respecto a los no infectados. Los niveles de Kyn no se modificaron en explantos infectados respecto al no infectado, sin embargo, las concentraciones de Kyn en explantos infectados se incrementaron significativamente a partir de las 24 h de cultivo. En explantos no infectados se observó



un aumento de niveles de Kyn con el tratamiento de IFN- $\gamma$ . La expresión relativa de AhR no se modificó en explantos infectados respecto a no infectados.

A los fines de determinar la participación de la actividad de IDO en el control de la infección con este parásito, los explantos placentarios fueron tratados con L-1MT (principal inhibidor específico de la actividad de IDO). En esta tesis demostramos que la inhibición de la actividad de IDO incrementa la carga parasitaria en explantos placentarios, lo que se asoció a una menor concentración de Kyn en el sobrenadante de cultivo. Por otro lado, el tratamiento con IFN- $\gamma$  indujo la actividad de IDO e incrementó las concentraciones de Kyn. El tratamiento con IFN- $\gamma$  en explantos infectados no modificó la carga parasitaria en relación con explanto sin tratamiento, este dato sugiere que las concentraciones basales de IDO encontradas en los explantos placentarios son suficientes para limitar la infección *in vitro*.

Posteriormente se demostró que el agregado de L-Trp exógeno al medio de cultivo aumentó la actividad de la enzima, los niveles de Kyn y colaboró en el control de la replicación parasitaria. Por otro lado, se demostró que los metabolitos de la KP (3-HK y 3-HAA) disminuyeron significativamente la carga parasitaria en los explantos placentarios, sin embargo, solamente 3-HK disminuyó el número de tripomastigotes móviles. Estos datos sugieren que los metabolitos conocidos en conjunto Kyns, podrían estar controlando la replicación del *T. cruzi* en la placenta.

Por último, en PEC a término se observó disminución de la expresión de IDO, AhR e IFN- $\gamma$  mostrando que la vía de la Kyn se modifica en las placentas chagásicas y sugiriendo que podría participar en la infección del tejido placentario por *T. cruzi*. La disminución de IDO podría tener un efecto semejante al observado en nuestros explantos placentarios tratados con inhibidor de IDO (L-1MT) lo que podría favorecer la infección con *T. cruzi* en el tejido placentario.

Por lo que los resultados obtenidos en esta tesis tanto *in vitro* como *in vivo* nos podrían ayudar a comprender mejor cómo la placenta estaría controlando la infección por *T. cruzi* a través de la vía catabolita del L-Trp por la generación de metabolitos y de esta manera, colaborar en la prevención de la transmisión congénita de Chagas.



**Palabras claves:** *Trypanosoma cruzi*, placenta humana, Triptófano, Indoleamina 2,3-dioxigenasa, quinureninas, 3-HK, 3-HAA



## ABSTRACT

Degradation of the essential amino acid L-tryptophan (Trp) starts with the activity of the indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) enzyme and continues with the kynurenine pathway (KP). IDO is highly expressed in the human placenta. Local depletion of L-Trp and/or the presence of metabolites of KP, participates in immunoregulation and exerts antimicrobial functions against intracellular pathogens. The participation of KP in *T. cruzi* replication control has been described in literature, however, it has not been studied in human placental tissue infected by *T. cruzi*. In this thesis, we proposed to analyze the participation of the catabolic pathway of L-Trp in *T. cruzi* infection of human placenta.

We used an experimental model of infection of human placenta *in vitro* explants and analysis of KP proteins *in vivo* in placentas coming from pregnant women with Chagas' disease (PEC). Chorionic villi explants were cultured with  $10^5$  *T. cruzi* trypomastigotes or without parasites at different times of culture. For each assay, we employed no less than 3 different placentas. In total,  $n = 20$  placentas were used for *in vitro* tests. Different compounds were used in order to inhibit or stimulate the activity of IDO, such as L-1-Methyl-tryptophan (L-1MT) and Interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) respectively, and exogenous Trp as substrate. We also employed metabolites of KP: 3-hydroxyquinurenine (3-HK) and 3-hydroxy anthranilic acid (3-HAA). Trp levels were measured by HPLC. Kyn production and specific IDO activity were measured by colorimetric assay in culture supernatants and homogenates of explants. Parasitic load was quantified by real time PCR. Immunohistochemistry (IHC) was used to determine the expression of IDO, AhR and IFN- $\gamma$  proteins. Statistical analysis was performed using GraphPad Prism 7.0. ANOVA or Student's t-test were used to compare treated explants with controls. A generalized linear model was used to assess the effects of the parasites on infected versus non-infected explants. Significance was set at p-value  $<0.05$ .

It was demonstrated that infection with *T. cruzi* did not modify neither the activity, nor the expression of IDO in relation to uninfected explants at 4, 24 and 96 h of culture. No change was observed in Kyn levels in infected placental explants compared to control ones. However, Kyn concentrations in infected explants increased after 24 h of culture. An increase in Kyn levels was observed in non-infected explants





treated with IFN- $\gamma$ . It was also shown that AhR relative expression did not change in infected explants compared to non-infected ones.

In order to determine the participation of IDO activity in *T. cruzi* infection control, placental explants were treated with L-1MT (main specific inhibitor of IDO activity). In this thesis we demonstrated that inhibition of IDO activity increased the parasitic load in placental explants at 72 h of culture, which was associated with a lower concentration of Kyn in the culture supernatant. Treatment with IFN- $\gamma$  induced IDO activity and increased Kyn concentrations in both infected and non-infected explants. However, this treatment did not modify the parasitic load in infected explants. These data suggest that basal IDO concentrations found in placental explants are enough to limit *in vitro* infection with *T. cruzi*.

It was demonstrated that the incorporation of exogenous L-Trp increased IDO activity and Kyn levels, collaborating in parasite replication control. It was also shown that metabolites of KP (3-HK and 3-HAA) significantly decreased the parasitic load in the placental explants. However, only 3-HK decreased the number of mobile trypomastigotes. These data suggest that metabolites known together as Kyns could limit *T. cruzi* replication in the placenta.

Finally, a decrease in IDO, AhR and IFN- $\gamma$  expression was observed in term PEC. This finding showed that KP was modified in chagasic placentas and suggested that it could participate in the control of *T. cruzi* placental infection. Decreased IDO expression could have a similar effect to that observed in our placental explants treated with the inhibitor of IDO (L-1MT), which could facilitate *T. cruzi* infection in placental tissue.

Therefore, the results obtained both *in vitro* and *in vivo* could help us to better understand how the placenta would limit *T. cruzi* infection through the generation of L-Trp catabolites, collaborating in the prevention of congenital Chagas transmission.

Keywords: *Trypanosoma cruzi*, human placenta, Tryptophan, Indoleamine 2,3-dioxygenase, kynurenines, 3-HK, 3-HAA



## ABREVIATURAS

|               |  |
|---------------|--|
| aa            | aminoácido   |
| ADN           | Ácido desoxirribonucleico  |
| AhR           | Receptor de hidrocarburos de aromáticos (Aryl hydrocarbon Receptor)  |
| ATB           | Antibiótico  |
| ANOVA         | Analysis of variance   |
| AL            | América Latina   |
| BSA           | Albúmina sérica bovina (acrónimo del inglés, Bovine serum albumin)   |
| CAT           | Catalasa   |
| EC            | Enfermedad de Chagas   |
| ECC           | Enfermedad Congénita de Chagas   |
| EEM           | Error estándar de la Media   |
| cm            | centímetro   |
| CTB           | Citotrofoblasto  |
| DAB           | 3,3'-diaminobenzidina  |
| DCs           | Células dendríticas (Dendritic cells)  |
| DMSO          | Dimetilsulfóxido   |
| dNTPs         | Desoxirribonucleotídeos trifosfato   |
| d.p.i         | días postinfección   |
| Fig.          | Figura   |
| G             | Medida constante de Gravitación universal  |
| g             | gramos   |
| H/E           | Hematoxilina/Eosina  |
| HEPES         | Ácido 2-[4-(2-hidroxietil)-1-piperacil-(1)] etanosulfónico (del inglés, 4-(2-Hydroxyethyl) piperazine-1-ethanesulfonic acid) |
| h             | horas  |
| HAA           | Ácido 3-hidroxiantranílico   |
| HK            | 3-hidroxiquinurenina   |
| IDO           | Indolamina 2,3-dioxigenasa   |
| IDO2          | Indolamina 2,3-dioxigenasa-2   |
| IHQ           | Inmunohistoquímica   |
| IgG           | Inmunoglobulina G  |
| IFN- $\gamma$ | Interferón- $\gamma$ (Interferon gamma)  |
| kDa           | kilo dalton  |
| Kyn           | quinurenina (Kynurenine)   |
| Kyns          | plural de quinureninas   |
| KP            | Vía de la quinurenina (acrónimo Kynurenine Pathway)  |
| kpb           | Kilo pares de base   |
| km            | Constante de Michaelis-Menten  |
| LPS           | Lipopolisacáridos (Lipopolysaccharide)   |
| L-Trp         | Levógiro-Triptófano  |
| L-1MT         | Levógiro-1 metiltriptófano   |
| min           | minutos  |
| mg            | miligramos   |
| mL            | mililitros   |
| mM            | miliMolar  |
| MTT           | Bromuro 3-4(4,5-dimetiltiazol-2,5-difeniltetrazolio)   |



|                 |   |
|-----------------|---|
| n               | muestra   |
| NAD             | Nicotinamida adenina dinucleótido                               |
| ng              | nanogramos  |
| nmol            | nanomol   |
| ns              | no significativo  |
| NO              | Óxido nítrico (Nitric oxide)                                    |
| NOS2            | Óxido nítrico sintasa 2 (Nitric oxide synthase)                 |
| pb              | Pares de bases  |
| PBS             | Buffer fosfato salino (Phosphate buffer saline)                 |
| PCR             | Reacción en cadena de la polimerasa (Polymerase Chain Reaction) |
| PC              | Placenta Control  |
| PEC             | Placentas provenientes de mujeres con enfermedad de Chagas      |
| p/v             | peso/volumen  |
| TCA             | Ácido tricloroacético (Trichloroacetic acid)                    |
| TBS             | Buffer Tris salino (tris-buffered saline)                       |
| <i>T. cruzi</i> | <i>Trypanosoma cruzi</i>  |
| TDO             | Triptófano 2,3-dioxigenasa                                      |
| TE              | Tris-EDTA   |
| Trp             | Triptófano  |
| Tps             | tripomastigotes   |
| Tul             | Tulahuen  |
| WHO             | Organización Mundial de la Salud (World Health Organization)    |
| qPCR            | PCR cuantitativa (del inglés, quantitative PCR)                 |
| r.p.m.          | Revoluciones por minuto   |
| RPMI 1640       | Medio de cultivo comercial (Roswell Park Memorial Institute)    |
| s               | segundo   |
| SFB             | Suero fetal bovino  |
| STB             | Sincitiotrofoblasto   |
| µg              | microgramo  |
| µL              | microLitro  |
| µM              | microMolar  |
| U               | Unidad internacional  |
| v/v             | volumen/volumen   |



## INTRODUCCIÓN

### ENFERMEDAD DE CHAGAS: Generalidades

La enfermedad de Chagas, también conocida como tripanosomiasis americana, es una zoonosis potencialmente mortal producida por el parásito protozooario *Trypanosoma cruzi*. Se estima que 10 millones de personas se encuentran infectadas en todo el mundo principalmente en América Latina (Fig. 1), donde la enfermedad es considerada un problema de salud pública. Más de 25 millones de personas están en riesgo de adquirir la enfermedad y en 2008 más de 10 mil personas murieron a causa de esta enfermedad (Castillo *et al.*, 2012).

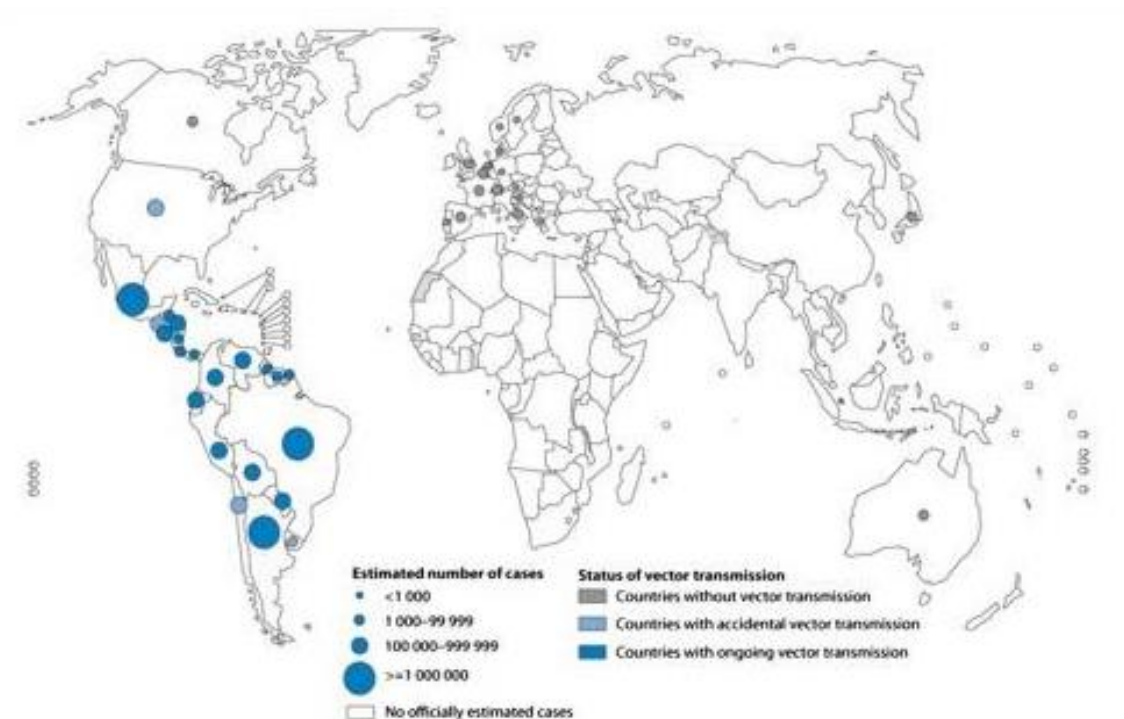


Fig. 1. Distribución global de casos de Chagas (Telleria and Tibayrenc, 2017)

Debido a que se ha podido controlar al insecto, el cual actúa como vector, el número de nuevos casos anuales ha disminuido significativamente. No obstante, en los últimos años la transmisión congénita por *T. cruzi* se ha vuelto cada vez más importante y en parte responsable de la globalización de la enfermedad. Por muchas décadas la enfermedad de Chagas ha sido estrictamente rural. Sin embargo, los cambios socioeconómicos, el éxodo rural, la deforestación y el urbanismo han transformado el perfil epidemiológico de la enfermedad, convirtiéndola en un fenómeno más bien



urbano y/o periurbano. Particularmente la presencia de la enfermedad fuera de América Latina se debe principalmente a la migración (WHO, 2007, 2015).

## Agente causal

*T. cruzi* es un parásito intracelular obligado perteneciente al orden Kinetoplastida y a la clase Mastigophora. Es un parásito unicelular que alterna su vida entre dos hospedadores multicelulares, uno invertebrado y otro vertebrado, presentando un ciclo de vida digenético. En función de la forma general de las células (esférica, piriforme o alargada), la posición relativa entre núcleo y kinetoplasto (anterior, lateral o posterior), la forma en que surge el flagelo (central o lateral), se definen 4 estadios para los *T. cruzi* (Fig. 2): una forma flagelada infectiva circulante en la sangre del huésped vertebrado (trypomastigote, 20 x 25  $\mu\text{m}$ ), una forma aflagelada que es el estadio reproductivo en el vertebrado (amastigote, 2 - 4  $\mu\text{m}$ ), una tercera forma de transición y reproductiva que se encuentra en el insecto vector (epimastigote, 20 - 40 x 2  $\mu\text{m}$ ), y una cuarta forma no replicativa que se encuentra en las heces del vector (trypomastigote metacíclico) (de Souza, de Carvalho and Barrias, 2010).

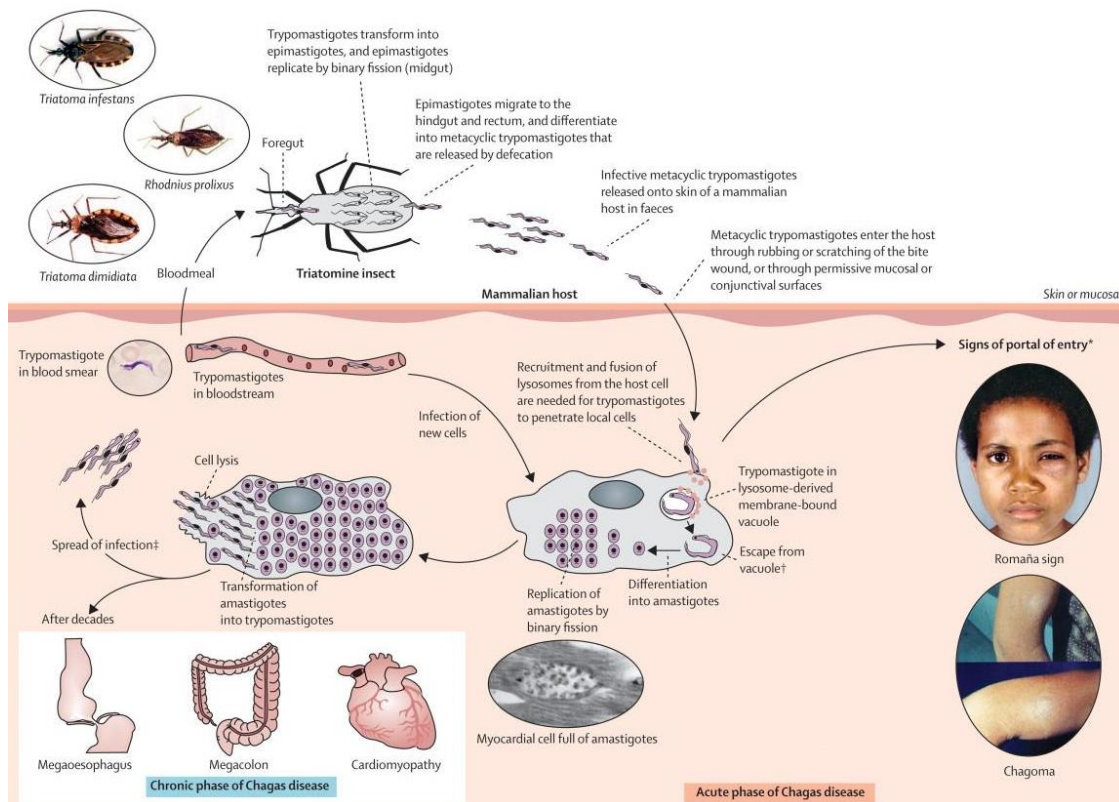


Fig. 2. Ciclo biológico de *Trypanosoma cruzi* (Rassi Jr, Rassi and Marin-Neto, 2010)



En *T. cruzi* la secuencia satélite de ADN (SaTDNA) nuclear tiene un gran número de repeticiones (10.000 copias por genoma), se caracteriza por ser una secuencia conservada, organizada, la cual le permite ser un blanco de amplificación para el diagnóstico por PCR (Moser, Kirchoff and Donelson, 1989; Sturm *et al.*, 1989; Britto *et al.*, 1995; Vago *et al.*, 1996).

### **Transmisión**

La principal vía de transmisión del agente causal de Chagas es a través de las heces de insectos vectores de la subfamilia Triatominae (*Triatoma*, *Rhodnius*, *Panstrongylus*). En Argentina el principal vector es *Triatoma infestans*, comúnmente denominado "vinchuca". La infección causada por *T. cruzi* se detectó entre animales salvajes y luego se diseminó hacia animales domésticos y humanos (Gürtler, 2009). Sin embargo, existen otras formas de transmisión como es la transfusión sanguínea, el trasplante de órganos, accidentes laborales, ingesta de alimentos, transmisión sexual y congénita (WHO, 2007).

### **Transmisión congénita**

La infección congénita causada por *T. cruzi* se debe a la transmisión del parásito vivo a través de la interfase materno-fetal y su permanencia en el neonato luego del nacimiento (Carlier *et al.*, 2012). La transmisión puede ocurrir antes del nacimiento (prenatal), al momento del parto (perinatal) o posterior al nacimiento (posnatal) (Carlier *et al.*, 2012). Para considerar un caso como congénito debe cumplirse que tanto la madre como el recién nacido presenten una serología positiva para *T. cruzi* (Díaz-Luján *et al.*, 2012). El diagnóstico se realiza mediante la detección del parásito al momento de nacer, en la sangre del recién nacido y por la detección de anticuerpos contra *T. cruzi* a los 6 meses del nacimiento. De esta forma se logra descartar una transmisión vectorial o transfusional del parásito (Díaz-Luján *et al.*, 2012). La infección congénita puede ser la causa de un bajo peso al nacer, hepatomegalia, esplenomegalia, síntomas respiratorios agudos, anemia, manifestaciones digestivas y un sistema nervioso central comprometido. Sin embargo, la mayoría de los recién nacidos congénitos no presentan sintomatología (Carlier *et al.*, 2015).

Según datos de la organización mundial de la salud (OMS), en países de AL donde la enfermedad de Chagas es endémica, 1.125.000 mujeres en edad fértil se



encuentran infectadas por *T. cruzi*. En países declarados libres de transmisión por el vector *Triatoma infestans* (tales como Brasil, Chile, Uruguay), la transmisión congénita sería la responsable del 90 a 100% de nuevos casos anuales de infección (Telleria and Tibayrenc, 2017). La prevalencia de enfermedad de Chagas en embarazadas en Latinoamérica es aproximadamente del 5 al 40 % dependiendo de el área geográfica y el rango de transmisión congénita se estima entre 4 % a 10 % (Moscatelli *et al.*, 2015).

La transmisión materno-fetal por *T. cruzi* se produce principalmente por la vía transplacentaria hematológica (Carlier *et al.*, 2012) en la cual los Tps que se encuentran en el espacio intervelloso invaden el trofoblasto. Una vez que el parásito alcanza el estroma veloso puede invadir las distintas células del trofoblasto veloso y del estroma como las células de Hofbauer, dentro de las células el parásito se diferencia hacia amastigotes los cuales se multiplican causando en última instancia la lisis celular. Como consecuencia se liberan los amastigotes que se transforman luego en Tps pudiendo diseminarse hacia otras células y/o atravesar el endotelio fetal alcanzando así la circulación fetal (Bittencourt, 1992).

## **PLACENTA HUMANA**

La placenta (*del griego Plakous = torta plana*) es un órgano transitorio, el cual separa y conecta simultáneamente a la madre y el feto (Díaz-Luján *et al.*, 2012; Valentich *et al.*, 2016). Durante todo el embarazo, la placenta realiza distintas funciones que involucran tanto la madre como al feto, entre ellas están la transferencia de gases, nutrientes y desechos, balance de agua, funciones endocrinas e inmunológicas (Benirschke, Kaufmann and Baergen, 2011).

### **Características estructurales**

La placenta humana a término tiene una forma discoidal de unos 20 cm de diámetro, 2,5 cm de grosor y pesa alrededor de 500 gramos (Valentich *et al.*, 2016), con un sistema de ramificaciones conocidas como árbol veloso placentario y una estructura hemocorial como barrera materno-fetal (Benirschke, Kaufmann and Baergen, 2011). En la placenta a término se distinguen tres regiones principales, con estructuras y funciones diferenciadas y específicas.



- ✚ **Cara fetal**, también conocida como placa coriónica, orientada hacia la cavidad amniótica, y se pueden observar la presencia de vasos sanguíneos fetales visibles macroscópicamente (Fig. 3a).
- ✚ **Cara materna**, también denominada cara uterina o placa basal, está en contacto con el endometrio, la cual se desprende durante el alumbramiento (proceso que ocurre entre 10 a 30 minutos posterior al nacimiento). Se encuentra constituida por el estroma endometrial, por trofoblasto y decidua en una matriz extracelular fibrinoide. Esta cara presenta estructuras sobreelevadas delimitadas por tabiques del endometrio que separan de forma incompleta el espacio intervelloso denominados cotiledones (Fig. 3b).
- ✚ **Árbol veloso** segmento situado entre las caras materna y fetal, zona donde se realiza el intercambio materno-fetal y la mayoría de las funciones placentarias antes descritas. Se caracteriza por que la sangre materna llena el espacio intervelloso donde se encuentran sumergidas las vellosidades coriónicas (Valentich *et al.*, 2016).

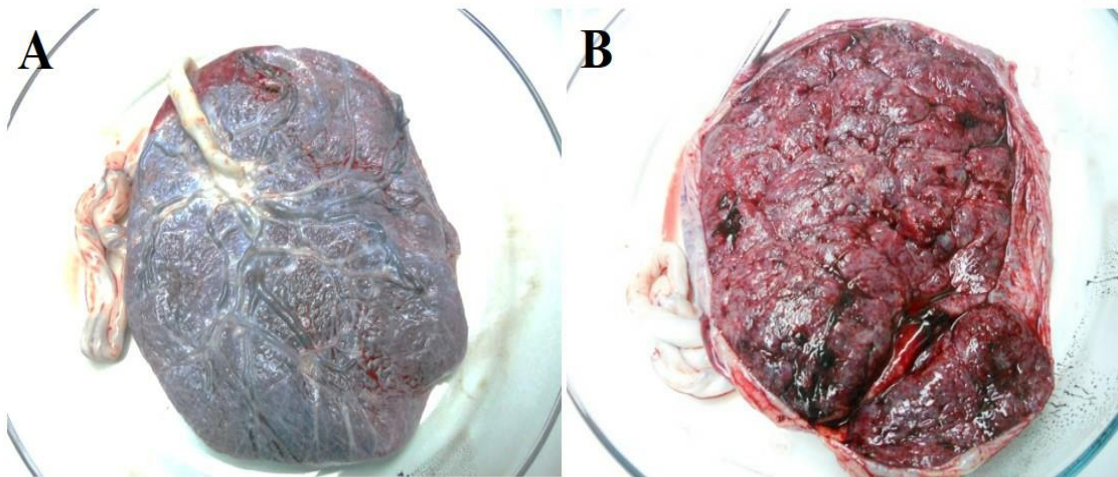


Fig. 3. Aspectos macroscópicos de las placentas humanas: A) Cara fetal, B) Cara materna

### **Vellosidades coriónicas**

En las placentas maduras podemos identificar 3 tipos de vellosidades coriónicas, las cuales que tienen características estructurales y funcionales propias (Fig. 4):





- ✚ **Vellosidades placentarias troncales:** proporcionan soporte estructural al árbol vellositario y le otorgan un armazón de distribución. Caracterizadas por un estroma fibroso denso y la presencia de arterias y venas. Algunas de las vellosidades se conectan con la placa basal por columnas celulares (vellosidades de anclaje) y permiten estabilizar la posición del árbol velloso en el espacio intervelloso.
- ✚ **Vellosidades placentarias intermedias:** este tipo de vellosidades son la continuación de las vellosidades troncales y están interpuestas entre éstas y las vellosidades terminales. Son ramificaciones largas, delgadas que se caracterizan por la presencia de vasos sin una media y adventicia distinguible con el microscopio de luz.
- ✚ **Vellosidades placentarias terminales:** se caracterizan por ser ramificaciones finales, en forma de racimo. Se caracterizan por su abundante capilarización, y por la presencia de capilares altamente dilatados, representan el principal sitio de intercambio materno-fetal. (Valentich *et al.*, 2016) (Fig.4).

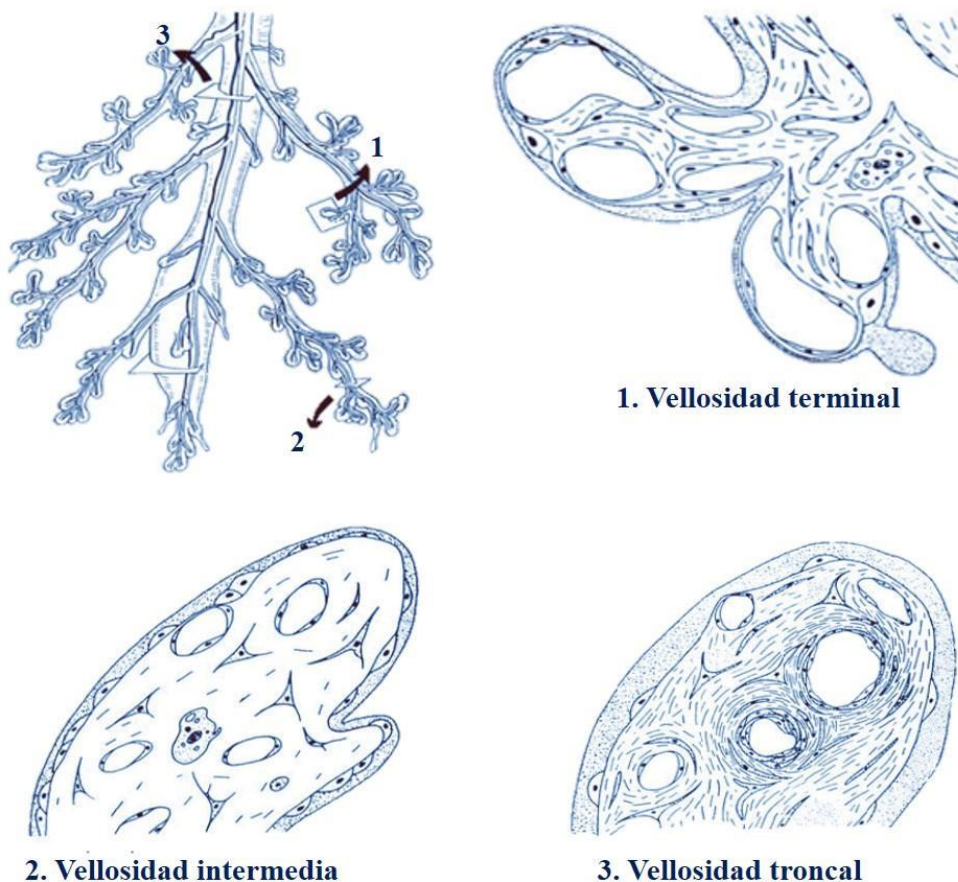


Fig. 4. Esquema del tipo de vellosidades en la placenta humana: 1) Vellosidad terminal, 2) Vellosidad intermedia y 3) Vellosidad troncal (Benirschke, Kaufmann and Baergen, 2011)



## Barrera placentaria

El término barrera materno-fetal o barrera placentaria define capas de tejidos en las vellosidades coriónicas que separan las circulaciones materna y fetal en la placenta (Benirschke, Kaufmann and Baergen, 2011) (Fig. 5). Está formada por:

- ✚ **Trofoblasto:** está compuesto por el sincitiotrofoblasto (STB), el cual es una capa continua multinucleada, con microvellosidades en su membrana apical. Mediante procesos de apoptosis se forman nudos sinciciales que se liberan a través de la circulación materna. También está formado por el citotrofoblasto veloso (CTB) constituido por células individuales que se dividen, diferencian y fusionan para la formación del STB. Durante el primer trimestre de gestación el CTB se puede observar como una capa continua entre el sincitio y la membrana basal, sin embargo, a partir del segundo trimestre su estructura pasa a ser discontinua, y al final de la gestación se localizan células aisladas entre el sincitio y la membrana basal.
- ✚ **Estroma** posee una matriz extracelular de fibras colágenas y sustancia amorfa, en la cual se localizan células mesenquimáticas, fibroblastos, y células de Hofbauer (macrófagos residentes) de origen fetal.
- ✚ **Vasos sanguíneos fetales** donde se localizan células endoteliales con membrana basal (Valentich *et al.*, 2016).

El trofoblasto constituye una barrera potencial para evitar la penetración de *T. cruzi* (Bittencourt, 1976; Carlier and Truyens, 2010). El estudio histopatológico de casos congénitos mostró parásitos tanto en el trofoblasto como en el estroma veloso (Bittencourt, 1976; Bittencourt *et al.*, 1988). Alteraciones del trofoblasto y procesos inflamatorios han sido observado tanto en placentas provenientes de madres infectadas con *T. cruzi* con y sin transmisión congénita (Díaz-Luján *et al.*, 2012; Fretes and Kemmerling, 2012). Se ha demostrado que la presencia de la barrera placentaria es importante ya que la remoción del sincitiotrofoblasto (STB) de la vellosidad placentaria facilita significativamente la infección por *T. cruzi* (Díaz-Luján y col. 2016).

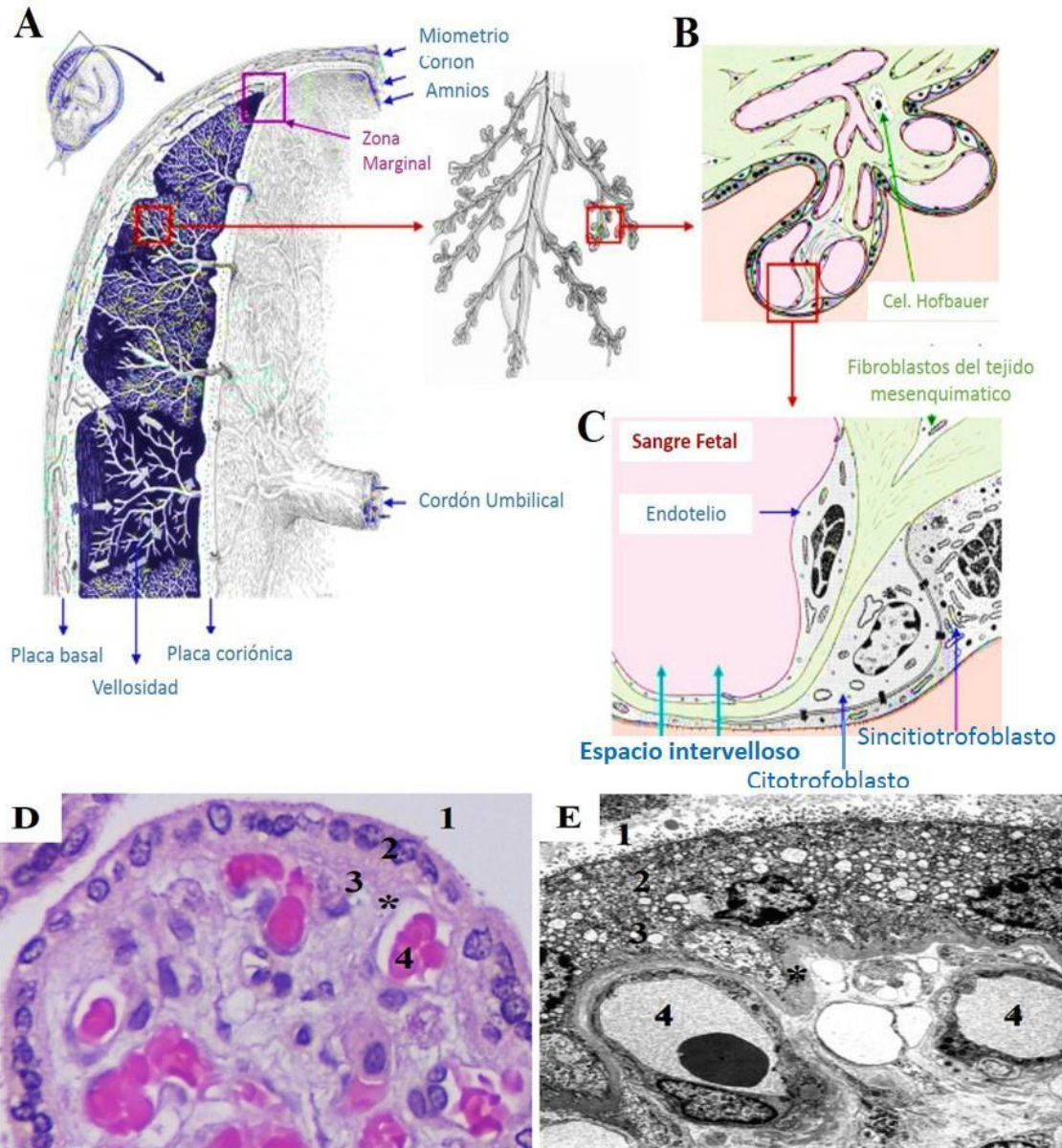


Fig. 5. Esquema de la placenta humana a término (A), Vellosidades terminales (B). Barrera placentaria: esquema(C) (Carlier et al., 2012), microfotografía óptica (H/E) (D) y micrografía electrónica (E). En la imagen D y E se observa: el espacio intervilloso (1), trofoblasto formado por el sincitiotrofoblasto (2) y citotrofoblasto (3), lámina basal (asterisco), y vasos fetales (4) (Fretes et al., 2012).

### Cultivo de explantos placentarios

El estudio de la placenta *in vitro* se hace a través de cultivos con muestras de vellosidades coriónicas (explantos placentarios) que poseen las estructuras de la barrera placentaria con preservación de sus funciones (Miller et al., 2005). Placentas provenientes de embarazadas sin complicaciones pueden ser usadas en condiciones experimentales para análisis de sobrevivencia y funciones de este tejido. El modelo de explantos placentarios incubados con 100.000 o 1.000.000 Tps de *T. cruzi*, reproduce *in*



*vitro* una infección baja y alta, respectivamente, de parásitos en las placentas de mujeres con enfermedad de Chagas (Fretes and Kemmerling, 2012).

Hay evidencias que demuestran que la competencia inmunológica de la placenta y de las diferentes cepas de *T. cruzi* juegan un rol importante en la infección placentaria y en la frecuencia de la transmisión congénita (Delgado and Santos-Buch, 1978; Andrade, 1982; Bittencourt, 1992; Fretes and Fabro, 1995; Frank *et al.*, 2000; Triquell *et al.*, 2009). La infección por *T. cruzi* induce una respuesta inmune compleja que involucra tanto mecanismos efectores como regulatorios. Un evento crítico durante el periodo de infección es la respuesta inmune innata, en la cual los macrófagos ejercen un rol crucial (Basso, 2013). Esta respuesta es iniciada por los receptores de reconocimiento de patrones de patógenos (PRR), como por ejemplo los receptores de tipo Toll (TLR), que reconocen y se unen a secuencias altamente conservadas que se conocen como patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP). El trofoblasto expresa los 10 TLR funcionales que se conocen al momento. Particularmente *T. cruzi* es reconocido por los TLR-2, TLR-4, TLR-7 y TLR-9 de superficie y luego los TLR intracelulares inician la cascada de señalización que culmina con la activación de vías que regulan la expresión de citoquinas, quimiocinas e interferones (IFN) (Castillo *et al.*, 2017). Para controlar la infección por *T. cruzi* se requiere un balance entre la respuesta inmune mediada por Th1 y Th2. Las células Th1 son las responsables de la producción de citoquinas inflamatorias (IL-1, IL-2, IL-12, IL-15, IL-18, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ ), mientras que las células Th2 tienen una función anti-inflamatoria (IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-13, TGF- $\beta$ , GM-CSF) y están involucradas en la respuesta mediada por anticuerpo (Basso, 2013). Se ha demostrado que el trofoblasto y células de las vellosidades coriónicas producen varios agentes inmunológicos, hormonas, citoquinas (IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , entre otras), óxido nítrico (NO), nitrógeno, y productos derivados del oxígeno (Benirschke, Kaufmann and Baergen, 2011), algunos de ellos son liberados al espacio intervelloso y participan en la limitación de la infección del tejido placentario por *T. cruzi* (Triquell *et al.*, 2009). Recientemente nuestro laboratorio ha demostrado el rol crucial de la enzima óxido nítrico sintasa (NOS) y el estrés oxidativo-nitrosativo en la infección del tejido placentario (Triquell *et al.* 2018).



## VÍA CATABÓLICA DEL L-TRIPTÓFANO

El Triptófano (Trp) es uno de los ocho aminoácidos (aa) esenciales es decir que no puede ser sintetizado en el cuerpo humano y por lo tanto debe ser suplementado a través de la dieta. Para todos los aminoácidos incluyendo el Trp, solo el isómero "L" es usado en la síntesis de proteínas y es capaz de pasar a través de barreras (por ejemplo: barrera placentaria, barrera hemato-encefálica, entre otras (Pardridge and Oldendorf, 1975).

En el humano el Trp tiene bajo almacenamiento en los tejidos, siendo uno de los aa con más baja concentración en el cuerpo humano (FAO/WHO, 2007). Puede ser incorporado mediante el consumo de alimentos como avena, bananas, ciruelas secas, leche, queso, pescado, pan, pollo, pavo, maní y chocolate. Las necesidades de este aminoácido varían según la etapa de desarrollo; en lactantes de 3 a 4 meses de edad es de 17 mg/kg/día, niños de 2 años requieren 12,5 mg/kg/día, en niños de 10 a 12 años es de 3,3 mg/kg/día, y en adultos se estimó en 3,5 mg/kg/día (Mahan, Escott-Stump and Raymond, 2013). La disponibilidad del Trp durante el embarazo es particularmente importante, debido al requerimiento de la madre y el feto para cumplir con la demanda de la síntesis proteica que es fundamental para el crecimiento y desarrollo. A través de la circulación materna-fetal, el Trp total circula en forma libre y también unido a albúmina (Kudo, 2013; Badawy, 2014).

El Trp participa en la síntesis de proteínas, en la síntesis de neurotransmisores (como serotonina), hormonas (como la melatonina en la glándula pineal) y en la vía de la quinurenina (KP, Kynurenine pathway) la cual conduce a la síntesis de nicotinamida adenina dinucleótido (NAD) (Pardridge and Oldendorf, 1975; Sainio, Pulkki and Young, 1996). El primer paso del metabolismo oxidativo del L-Trp en la vía de la quinurenina es catalizado independientemente por tres enzimas: indoleamina 2,3-dioxigenasa-1 (IDO), indoleamina 2,3-dioxigenasa-2 (IDO-2) y triptófano 2,3-dioxigenasa (TDO) (Tabla 1). Las tres enzimas son capaces de producir N-formilquinurenina, a partir de la degradación de L-Trp, que posteriormente será convertida por la enzima N-formilkynureninasa en quinurenina (Kyn, Kynurenine) (Fig. 6) (Takikawa, 2005). La Kyn resultante, por un lado, continúa formando los siguientes metabolitos: 3-hidroxiquinurenina (3-HK), ácido 3-hidroxi-antranílico (3-HAA), ácido picolinico y ácido quinolínico, conocidos en conjunto como "quinureninas" (Kyns) (Löb



*et al.*, 2009). La KP en mamíferos se inicia después de la apertura del anillo oxidativo y la posterior degradación del aminoácido esencial Trp, denominada así por un metabolito clave “Kyn”, el cual produce dos generadores de radicales libres, 3-hidroxiquinurenina (3-HK) y ácido 3-hidroxi-antránilico (3-HAA). Además, genera dos compuestos neuroactivos que actúan en los receptores de glutamato ionotrópico ácido quinolinico y el ácido kinurénico (KYNA) (Schwarcz, 2004; Mittal, 2015). Tanto juntos como separados estos metabolitos de la KP tienen un rol importante en procesos fisiológicos y patológicos (Schwarcz, 2004).

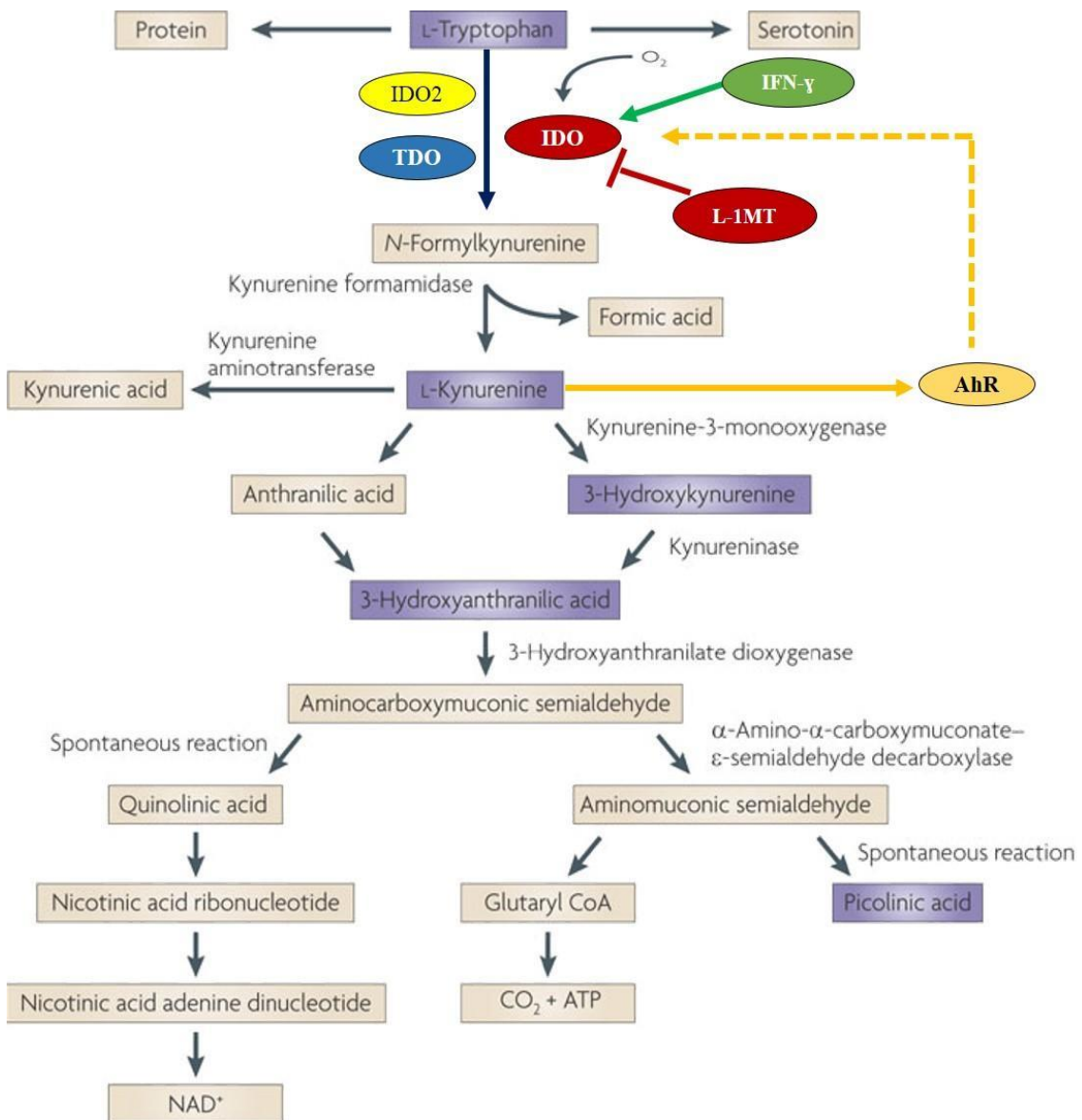


Fig. 6. Esquema que representa la formación de KP a partir de L-Trp, modificado de: (Löb *et al.*, 2009)



El receptor de hidrocarburos aromáticos (AhR) es un factor de transcripción activado por ligandos que media muchos procesos biológicos, incluyendo el desarrollo fetal (Jiang *et al.*, 2010). AhR ha sido ampliamente estudiado como un receptor de tóxicos ambientales que media el metabolismo de una amplia variedad de xenobióticos. Se ha observado que la capacidad de unión a ligandos de alta afinidad del AhR y los resultados posteriores a su activación conduce a la degradación metabólica y eliminación de muchos productos químicos (Juricek *et al.*, 2015). AhR es un receptor citosólico localizado en un complejo multiproteico compuesto de chaperonas y quinasas que lo protegen y mantienen en una conformación que le permite unirse a sus ligandos. Tras la unión al ligando, se reubica en el núcleo, donde heterodimeriza con el traslocador nuclear (ARNT), y se une a elementos de respuesta específicos sensibles a xenobióticos (XRE) en los promotores de sus genes diana activando la transcripción de los mismos. Entre los genes diana del AhR están los genes que codifican para enzimas del metabolismo de xenobióticos (XME) de fase I como la monooxigenasa dependiente de citocromo 450 y de fase II como hemoxigenasa-1 (HO1), NAD(P)H, superóxido dismutasa 1 y 2, y glutatión S-transferasa (GST) (Kawajiri and Fujii-Kuriyama, 2007). Seguido de la activación, la vía de señalización de AhR es fuertemente regulada por varios circuitos de retroalimentación negativa. AhR es constitutivamente exportado al citosol y degradado por la vía proteosomal del 26S (Song, 2002). Este receptor no solo está involucrado en procesos de desintoxicación, sino también en otras funciones principales, por ejemplo, en la regulación de la respuesta inmune, la diferenciación celular, el ciclo celular y en la oncogénesis (Hao and Whitelaw, 2013; Julliard, Fechner and Mezrich, 2014; Cella and Colonna, 2015). Entre los ligandos de este receptor están los dietarios (por ejemplo, indoles, flavonoides, carotenoides, resveratrol), ligandos provenientes de la microflora y ligandos endógenos derivados del L-Trp (Stejskalova *et al.*, 2011; Guyot *et al.*, 2013).

En ratones knockout para este receptor se ha detectado alteraciones en la fertilidad y disminución del tamaño e incremento de la muerte neonatal de sus crías, lo cual sugiere que AhR tiene un rol crítico durante el embarazo (Baba *et al.*, 2005). Se ha mostrado que AhR se expresa altamente en la placenta humana, especialmente en el sincitiotrofoblasto, tanto durante el primer como en el tercer trimestre (Jiang *et al.*, 2010; Hao *et al.*, 2012). La activación intrínseca en placenta humana a término es debido a la presencia de algunos ligandos endógenos producidos por el metabolismo placentario.



La interferencia con esta función fisiológica de AhR puede explicar las complicaciones del embarazo observadas, por ejemplo, después de la exposición a contaminantes que activan la vía de AhR (Wakx *et al.*, 2018). Su patrón de expresión del primer al tercer trimestre es muy similar al de la IDO, la cual desempeña un papel importante en la tolerancia materno-fetal a través de la regulación de la diferenciación de las células Treg (Hönig *et al.*, 2004; Sedlmayr, 2007).

La localización de las principales enzimas que participan en la vía catabólica del Trp se presenta en la Tabla 1. IDO se encuentra a nivel extrahepático, principalmente en placenta; IDO2 principalmente en estómago, colon y páncreas, en tanto que TDO es principalmente hepática, por lo que en esta tesis nos centraremos en el estudio de la vía de degradación de Trp metabolizada por IDO. La localización de TDO en placenta es controvertida, con autores que comprueban su expresión en placenta (Manuelpillai *et al.*, 2005) y otros autores que no la observan. En estudios realizados en nuestro laboratorio no hemos encontrado expresión de TDO en placentas provenientes de mujeres sanas o con enfermedad de Chagas (Fig. 7).

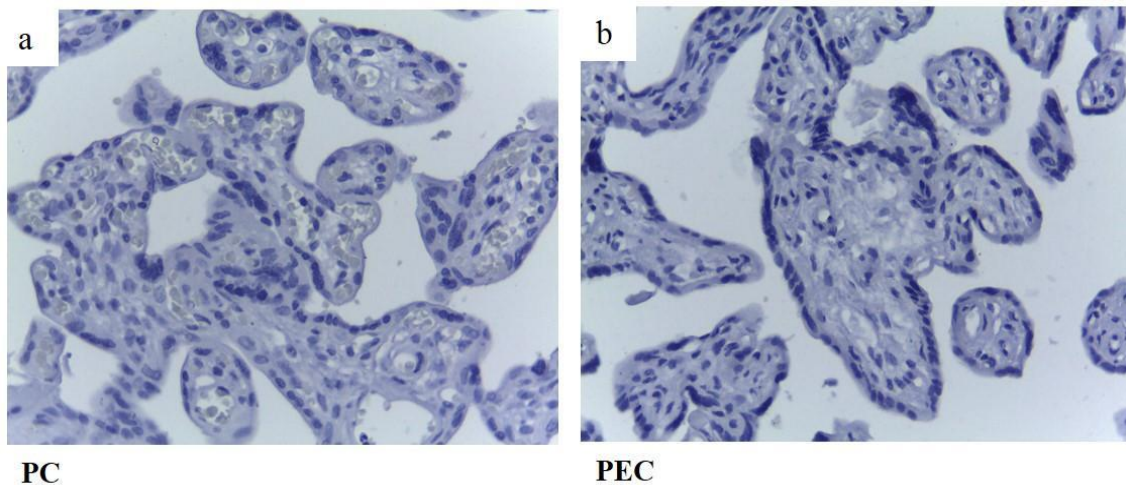


Fig. 7. Vellosidades coriónicas de placentas humanas a término, marcadas mediante IHQ con anticuerpo específico para TDO, a) Placenta control (PC), b) Placenta de mujeres con enfermedad de Chagas (PEC). (Magnificación 400X).

Tabla 1. Principales diferencias entre triptófano 2,3-dioxigenasa (TDO), indoleamina 2,3-dioxigenasa e indoleamina 2,3-dioxigenasa2 (IDO2)

| Características                  | TDO        | IDO        | IDO2       |
|----------------------------------|------------|------------|------------|
| Número de la Comisión de Enzimas | 1.13.11.11 | 1.13.11.17 | 1.13.11.52 |





|  |                |   |  |
|--|----------------|---|--|
| <b>Mayor expresión</b>                 | Hígado         | <b>Placenta</b> , pulmón, intestino   | Estómago, Colón, células tumorales de páncreas |
| <b>Actividad enzimática vs TDO</b>     | 100 %          | 5 – 15 %  | 3 – 5 % (de la actividad de IDO)               |
| <b>Masa molecular (kD)</b>             | 167            | 45  | 47   |
| <b>Subunidades</b>                     | 4              | 1   | 1  |
| <b>Especificidad de Substrato</b>      | L-Triptófano   | Amplio espectro: L-Triptófano, D-Triptófano, 5-hidroxi-L-triptófano, triptamina | Baja afinidad para L-Triptófano                |
| <b>Cofactor</b>                        | Hemo           | Hemo  | Hemo, Hierro, Unida al metal                   |
| <b>G átomos de hemo/mole</b>           | 2              | 1   |  |
| <b>Otros requerimientos</b>            | O <sub>2</sub> | O <sub>2</sub>  | O <sub>2</sub>                                 |
| <b>Inducción por Glucocorticoides</b>  | Si             | No  | No   |
| <b>Activación por Trp</b>              | +++            | +   | +  |
| <b>Activación por heme</b>             | ++             | -   | +  |
| <b>Inducción por citoquinas</b>        | No             | Si  | Si   |
| <b>Inhibición por 1-metilriptófano</b> | No             | L-1-metilriptófano (L-1MT)  | D-1-metilriptófano MTH-trp                     |

Modificado de: (Metz *et al.*, 2007; Mittal, 2015)

### Indoleamina 2,3-dioxigenasa

IDO fue descubierta por el grupo de Osamu Hayaishi's en el intestino de conejo como una dioxigenasa que contiene un grupo hemo como hierro férrico, el cual es esencial para su actividad. Este grupo cataliza el clivaje oxidativo del anillo indol del Trp hacia la inserción de dos átomos de oxígeno molecular (Taylor and Feng, 1991) (Fig. 8).

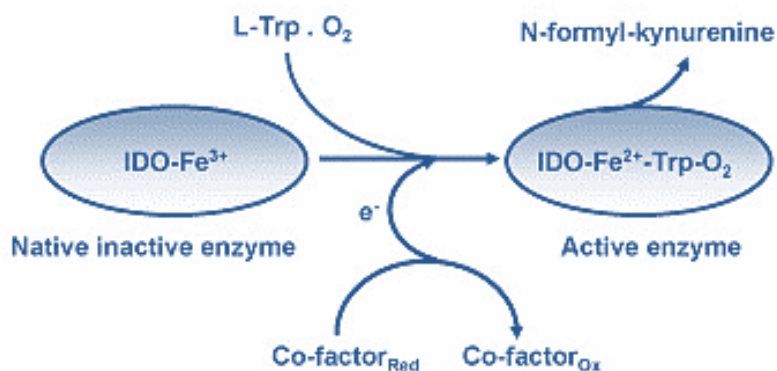


Fig. 8. Activación de IDO (King and Thomas, 2007)



Es una enzima que se expresa a nivel intracelular de una manera tanto constitutiva como inducible. Es altamente expresada en una variedad de mamíferos tales como conejo, ratas, ratones, y humanos, en órganos tales como placenta, pulmón, intestino delgado y grueso, colon, bazo, hígado, riñones, estómago y cerebro. La modulación de la expresión de la IDO depende del tipo de células y del entorno de citoquinas en el microambiente (Metz *et al.*, 2007). Uno de los tejidos que particularmente tiene alta actividad de IDO es la placenta humana (Kudo and Boyd, 2000; Mellor *et al.*, 2002; Kudo, 2013). La localización de IDO en la placenta humana varía según el trimestre de embarazo. En el primer trimestre de embarazo se localiza en las células del trofoblasto (Wang *et al.*, 2011), y en la placenta a término se localiza en el endotelio de las vellosidades coriónicas, mientras que en los vasos del cordón umbilical no se observa expresión proteica de IDO (Hönig *et al.*, 2004; Ligam *et al.*, 2005; Blaschitz *et al.*, 2011). A nivel del estroma placentario, IDO se expresa en macrófagos (células de Hofbauer) (Ligam *et al.*, 2005; Wang *et al.*, 2011).

La activación de IDO en la barrera placentaria crea un microambiente desprovisto de Trp, por lo que los linfocitos se vuelven anérgicos, protegiendo las células T maternas contra el sistema inmunitario (Munn *et al.*, 1998). En cambio, TDO puede ser suprimida durante la activación del sistema inmune, esto hace que IDO se convierta en la enzima más importante de la vía catabólica del Trp (Takikawa, 2005). La expresión de IDO es inducida por lipopolisacáridos (LPS) (Robinson, Hale and Carlin, 2005; Fujigaki *et al.*, 2006; O'Connor *et al.*, 2009), y citoquinas pro-inflamatorias (Yadav *et al.*, 2007; Belladonna *et al.*, 2009; Castillo *et al.*, 2017). Así prostaglandina E2 e IFN- $\gamma$  pueden inducir su expresión (Fujigaki *et al.*, 2006), y los glucocorticoides pueden promover la superinducción de IDO (Ozaki, Edelstein and Duch, 1987; Türck *et al.*, 2005). El IFN- $\gamma$ , principal inductor de la actividad de IDO en células presentadoras de antígeno (CPA) como por macrófagos y células dendríticas, células T, fibroblastos, y células endoteliales (King and Thomas, 2007). El sitio promotor en el gen de IDO contiene múltiples elementos de secuencias que confieren capacidad de respuesta a IFN- $\gamma$ . Otros estímulos inflamatorios también son capaces de inducir IDO (Thomas and Stocker, 1999; Mellor and Munn, 2004; Takikawa, 2005), incluyendo el IFN- $\alpha$ , IFN- $\beta$  y lipopolisacáridos (LPS), aunque marcadamente menos que IFN- $\gamma$ . Otras moléculas, tales como IL-4, IL-6, IL-10, TGF- $\beta$ , PGE<sub>2</sub> o la señalización de CD40 inhiben su actividad (King and Thomas, 2007). Es importante



destacar que el IFN- $\gamma$  también induce el óxido nítrico sintetasa 2 (NOS2, del inglés, Nitric Oxide Synthase) en células que son capaces de expresar IDO. NOS2 sintetiza óxido nítrico el cual tiene funciones tanto antimicrobianas como inmunoreguladoras (Karupiah *et al.*, 2000).

Una vez que se activa la IDO se induce el metabolismo de la vía de la Kyn hacia la formación de NAD y ciclo de Krebs a través de ácido quinolinico (Heyes *et al.*, 1996) (Li *et al.*, 2017). Para estudiar la función de IDO en la KP, se han empleado tanto inhibidores competitivos como no competitivos. Los primeros compiten con el sustrato por el sitio de unión. Por otro lado, los inhibidores no competitivos se unen directamente al grupo hemo. Se ha demostrado que para inhibir la actividad enzimática de IDO es más eficiente el estereotipo L-1MT (Cady and Sono, 1991; Austin *et al.*, 2010; Yuasa *et al.*, 2010; Qian *et al.*, 2012) y que la adición de L-1MT elimina el efecto antimicrobiano mediado por IDO y permite el crecimiento de microorganismos autotróficos para Trp como *Staphylococcus aureus* y *Toxoplasma gondii* (Murakami *et al.*, 2012; Schmidt *et al.*, 2012).

La combinación del agotamiento del Trp y las propiedades citotóxicas de algunas Kyns inducen la apoptosis de células T y la expansión de células natural Killer (Frumento *et al.*, 2002). El hecho de que Kyns influyen en el sistema inmunitario y que algunos elementos del sistema inmunitario induzcan o inhiban las enzimas involucradas en la vía de la Kyn sugiere una estrecha relación para mantener un balance recíproco entre ambos. Se ha mostrado que las Kyns están involucradas en el estrés oxidativo, en particular, el ácido quinurénico producen especies reactivas de oxígeno (ROS) inductor de la enzima IDO (Rodríguez-Martínez *et al.*, 2000; Santamaría *et al.*, 2001), y causa la peroxidación lipídica (Rios and Santamaria, 1991), mientras que 3-HAA y 3-HK generan radicales libres (Okuda *et al.*, 2002). Esta vía tiene un importante papel en la patogénesis de diferentes patologías, tanto a nivel de trastornos neurológicos, enfermedades autoinmunes, tumores malignos y en enfermedades infecciosas, como en el control de la infección con *T. cruzi* en el cual se observó reducción en la parasitemia e incremento en la supervivencia de los ratones (Knubel *et al.*, 2010). La inducción de la vía de la Kyn parece ser un sello distintivo para una respuesta dominada por IFN- $\gamma$  durante las principales enfermedades infecciosas en seres humanos. Se ha descrito, la consecuencia funcional del agotamiento de Trp y la producción de Kyns en la



replicación y supervivencia de microorganismos, aunque aún falta dilucidar su participación en la infección del tejido placentario por *T. cruzi*. En esta tesis, se evaluó el papel de la disponibilidad de Trp en la interfase materno-fetal, el efecto de la modulación de IDO mediante la inhibición o estimulación de su actividad enzimática, la producción y liberación de las Kyns y el efecto de estas sobre la infección por *T. cruzi* en un modelo de infección de explantos placentarios *in vitro*. Además, se evaluó la expresión de componentes de la vía de la Kyn en PEC y en placentas provenientes de embarazo normales.



## **HIPÓTESIS**

Teniendo en cuenta estos antecedentes, en esta tesis se plantea la siguiente hipótesis: “La vía catabólica del L-Trp participa en el control de la transmisión congénita de la enfermedad de Chagas, modulando el crecimiento intracelular del *T. cruzi* en la placenta”. Para evaluar esta hipótesis se han realizado estudios en un modelo *in vitro* de explantos de placentas y en cortes histológicos de placentas provenientes de embarazadas serológicamente positivas para Chagas.



## OBJETIVOS

### Objetivo General:

Analizar la participación de la vía catabólica del aminoácido esencial L-Trp en el control de la infección de la placenta humana por *T. cruzi*.

### Objetivos Específicos:

1. Analizar el efecto de la infección por *T. cruzi* en la activación del catabolismo de L-Trp en explantos placentarios.
2. Evaluar la participación de la actividad de IDO, enzima limitante de la vía del L-Trp, en el control de la infección de explantos placentarios con *T. cruzi*.
3. Determinar la participación de metabolitos de la KP como antimicrobianos en la infección con *T. cruzi*.
  - A. Determinar el efecto de la adición exógena de L-Trp en explantos placentarios infectados o no con *T. cruzi*.
  - B. Valorar el efecto de 3-HK y 3-HAA sobre tripomastigotes de *T. cruzi*.
  - C. Evaluar el efecto de 3-HK y 3-HAA sobre la infección de los explantos placentarios.
4. Analizar la expresión proteica de la IDO, AhR e IFN- $\gamma$  en placentas provenientes de mujeres con enfermedad de Chagas (PEC).



## MATERIALES Y MÉTODOS

### Placenta

Los cultivos se realizaron a partir de placentas humanas a término (38 - 40 semanas de gestación) obtenidas en el Hospital Universitario de Maternidad y Neonatología (HUMN) y el Hospital Privado de la ciudad de Córdoba, con la aprobación del Comité de Ética de dicho centro y el Comité de Ética del Hospital Nacional de Clínicas Registro N°: 176/13 (Ver Anexo 1) y el consentimiento informado de las embarazadas. Las placentas provinieron de embarazadas sin patologías asociadas al embarazo, tales como preeclampsia, diabetes gestacional, hipotiroidismo, y con serologías negativas para enfermedades infectocontagiosas. Se utilizaron placentas (n = 20) obtenidas de cesáreas, para reducir posibles contaminaciones y estrés asociado al pasaje por el canal de parto. La placenta fue transportada en refrigeración y en condiciones estériles hacia el Instituto de Biología Celular/INICSA, de la Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Córdoba, donde se procesaron bajo normas de asepsia, dentro de la hora posterior al alumbramiento.

Para el estudio de la vía catabólica del Trp *ex vivo*, se emplearon placentas de mujeres con enfermedad de Chagas (PEC, n = 15) y como control se emplearon placentas sin ninguna patología asociadas al embarazo y con serologías negativas para enfermedades infectocontagiosas (PC, n = 10). Muestras de placentas, ya fijadas e incluidas en parafina, procedieron del área de anatomía patología del HUMN y del Hospital Materno Provincial de Córdoba.

### Parásitos

Se emplearon tripomastigotes (Tps) de la cepa Tulahuen de *T. cruzi* (TcVI), propagados en una monocapa de células Vero (ATCC 76, obtenidas del Laboratorio del InViV-UNC) a 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> en pH 7.4 en medio RPMI 1640 (Sigma Aldrich, R8755) con rojo fenol y 10 % de Suero fetal bovino (SFB, NATOCOR), suplementado con: 25 mM de HEPES (Anedra, AN00678706), 10.000 U/mL de Penicilina (Sigma Aldrich, P3032), 10 mg/mL de Estreptomina (Sigma Aldrich, S9137) y 0,3 g/L de L-Glutamina (Sigma Aldrich, G5763), para los experimentos. Los Tps de células Vero fueron recogidos del sobrenadante, se centrifugaron y se resuspendieron en RPMI 1640 sin rojo fenol. Para la infección de los explantos placentarios se empleó una relación de 100.000



Tps por mL de medio de cultivo (Fretes and Kemmerling, 2012) en 200 mg de tejido aproximadamente.

Los parásitos utilizados para la curva estándar después de la centrifugación fueron fijados en 4 % de paraformaldehído (durante 10 min), y contados en una cámara de Neubauer (Houston-Ludlam, Belew and El-Sayed, 2016).

### **Explantos placentarios de vellosidades coriónicas: obtención y diseño experimental básico de cultivo**

Una vez en el laboratorio, se removió la placa coriónica y la decidua. Luego, se colocaron los cotiledones en una placa de Petri, y se cortaron las vellosidades coriónicas en trozos pequeños de aproximadamente 0,5 cm x 0,5 cm. Los explantos fueron lavados con solución salina estéril cinco veces consecutivas. Después de los lavados, cuatro explantos (40 a 50 mg cada uno) fueron colocados por pocillo, en una placa de 24 pocillos estéril con 1,5 mL de medio RPMI 1640 sin rojo fenol y 10 % de Suero fetal bovino (SFB), suplementado con: 25 mM de HEPES, 10.000 U/mL de Penicilina, 10 mg/mL de Estreptomicina y 0,3 g/L de L-Glutamina. Todos los explantos fueron incubados a 37 °C bajo condiciones experimentales predeterminadas (Miller *et al.*, 2005). Tanto los explantos para la cuantificación de ADN de *T. cruzi*, los homogenatos para determinación de proteínas y Kyn, y sobrenadantes fueron almacenado a - 80 °C hasta su uso.

### **Diseño de la infección de los explantos placentarios por *T. cruzi***

Los explantos (4 por pocillo) fueron cultivados con 150.000 Tps (equivalente a 750 parásitos/mg de tejido) en 1,5 ml de medio de cultivo durante 4, 24 (modelo de invasión) y 96 h (modelo de invasión, replicación y liberación). En este último modelo, los explantos estuvieron expuestos durante 24 h con el parásito y luego se realizó cambio de medio, se lavó con PBS para retirar los parásitos adheridos y se renovó el medio de cultivo sin parásitos hasta las 96 h. Otro grupo de explantos sin *T. cruzi* fueron utilizados como control en las mismas condiciones experimentales.

### **Tratamiento de explantos placentarios con L-Trp**

Se utilizaron dos grupos experimentales con un pre-tratamiento por 4 h: un grupo de explantos con 200 µM de L-Trp (Sigma Aldrich, T8941) y como control se empleó





un grupo sin tratamiento (S/Trat). Posterior al pretratamiento los explantos se cultivaron con 150.000 Tps de *T. cruzi* en 1,5 mL de medio de cultivo y se incubaron durante toda la noche. A las 24 h se realizaron los cambios de medio según se explicó en el diseño de infección de explantos. Estos nuevos medios tenían la adición de los tratamientos correspondientes cada 24 h, hasta las 96 h. de cultivo. Los controles experimentales se realizaron en las mismas condiciones de tratamiento, pero sin *T. cruzi*.

### **Ensayo de inhibición y estimulación de IDO**

Se diseñaron tres grupos experimentales que fueron pre-tratados por 6 h: un primer grupo con 300  $\mu$ M de L-1MT (Sigma Aldrich, 447439), otro con 20 ng/mL de IFN- $\gamma$  (Human IFN- $\gamma$ -1 $\beta$ , Miltenyi Biotec 130-096-484), y el tercer grupo sin tratamiento (grupo control). Posterior al pretratamiento los explantos se cultivaron con 150.000 Tps de *T. cruzi* en 1,5 mL de medio de cultivo y se incubaron durante toda la noche. Seguido de la incubación, se realizó cambio de medio, para lo cual se lavó con PBS para retirar los parásitos adheridos y se renovó el medio de cultivo sin agregado de parásito, con la adición de los tratamientos correspondientes, hasta las 72 h de cultivo. Los controles experimentales se realizaron en las mismas condiciones de tratamientos, pero sin *T. cruzi*.

### **Tratamiento con 3-HK y 3-HAA y cuantificación de la movilidad de Tps de *T. cruzi***

Se diseñó un modelo experimental *in vitro* con 150.000 Tps de *T. cruzi* cepa Tulahuen incubados con medio RPMI 1640 con 10% de SFB a 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>. Los Tps fueron tratados con 3-HK (20  $\mu$ M) o 3-HAA (20  $\mu$ M) durante 2 h. Mediante cámara de Neubauer se realizó el conteo de número de Tps móviles, observados al microscopio óptico. Los resultados se expresaron como número de Tps móviles.

### **Tratamiento con metabolitos de la vía de la Kyn de los explantos infectados o no con *T. cruzi***

Los explantos placentarios fueron cultivados con 150.000 Tps de *T. cruzi* (Explantos + *Tc*) durante toda la noche. Posteriormente se realizó el cambio de medio, lavando con PBS para retirar los parásitos adheridos y se renovó el medio de cultivo sin agregado de parásito y con la adición de los siguientes tratamientos cada 24 h hasta las 96 h de cultivo. Un grupo fue tratado con 100  $\mu$ M de 3-HK (Sigma Aldrich, H1771),



otro con 100  $\mu$ M de 3-HAA (Sigma Aldrich, 148776) y el tercer grupo se utilizó como control (sin tratamiento).

### **Viabilidad de los explantos placentario por el ensayo de MTT**

La viabilidad de los explantos placentarios en función del tiempo de cultivo. Se midió mediante el ensayo de MTT (1-(4,5-dimethylthiazol-2-yl) -3,5-diphenilformazan (MTT, Sigma Aldrich M5655). Los explantos fueron tratados con 100  $\mu$ L de MTT a una concentración de 0,5 mg/mL, e incubados durante dos horas a 37 °C. Durante este tiempo el MTT de color amarillo penetra en las células donde el anillo del tetrazolio es clivado por deshidrogenasas de las mitocondrias produciendo formazan, un compuesto de color púrpura el cual es insoluble en agua. Al cabo de las 2 h de incubación, los explantos fueron colocados en un tubo de 1,5 mL, donde se agregó 150  $\mu$ L de etanol para la extracción de los cristales de formazan. Posteriormente se tomó 100  $\mu$ L del volumen del sobrenadante para pasarlo a una placa de 96 pocillos. La reacción fue leída a una absorbancia de 590 nm. Los resultados se calcularon como la relación entre absorbancia/mg de tejido, y se expresaron en relación de los explantos sin tratamiento ni infección.

### **Cuantificación de proteínas totales**

La concentración de proteínas en homogenatos de explantos placentarios fue determinada por el método de Lowry (Lowry *et al.*, 1951), usando Albúmina Sérica Bovina como estándar 2 mg/mL (Sigma Aldrich, A4503).

### **Extracción de ADN de tejido placentario infectado con *T. cruzi***

Para la cuantificación de la carga parasitaria en los explantos placentarios, se extrajo el ADN tanto de los explantos placentarios cultivados con Tps de *T. cruzi* y de los explantos sin cultivo con Tps (Explantos controles) como control negativo del procedimiento. Todas las extracciones se realizaron empleando el protocolo del Kit de High Pure PCR template Preparation (Roche Diagnostic Corp., Indianapolis, IN). Para ello, en un tubo de microcentrífuga de 1,5 mL se agregaron: la muestra, 200  $\mu$ L de Buffer lisis de tejido y 40  $\mu$ L de proteinasa K reconstituida; se mezcló e inmediatamente fue incubado por 1 h a 55 °C o hasta que el tejido fue completamente lisado. Posteriormente, se adicionó 200  $\mu$ L de buffer astringente, se mezcló e incubó por 10 min a 70 °C. Luego se adicionó 100  $\mu$ L de isopropanol y se mezcló. Seguidamente, se



ensambló un tubo filtro en un tubo de colección al cual se agregó la muestra líquida y se centrifugó 1 min a 8.000 x rpm. Después de la centrifugación, se removió el tubo filtro del tubo de colección, y se ensambló el tubo filtro en un nuevo tubo de colección, al cual se le adicionó 500 µL de buffer de eliminación de inhibidores y se centrifugó 1 min a 8.000 x rpm. Nuevamente, se removió el tubo filtro del tubo de colección y se ensambló un nuevo tubo de colección y se adicionó 500 µL de buffer de lavado el cual fue centrifugado 1 min a 8.000 x rpm. Después se descartó el líquido y nuevamente se centrifugó el ensamblado por 10 s a la máxima velocidad. Para la elución del ADN, se insertó el tubo filtro en un tubo de microcentrífuga de 1.5 mL estéril, y se adicionó 200 µL de buffer de elución precalentado a 70 °C según protocolo. El ensamblado fue centrifugado por 1 min a 8.000 x rpm. El ADN eluido fue cuantificado (µg) empleando un espectrofotómetro NanoDrop Thermo Scientific™ modelo 2000, posteriormente la muestra fue almacenada a - 80 °C hasta su análisis posterior.

### PCR en tiempo real

La carga parasitaria se determinó a través de un ensayo de PCR real time cuantitativa (qPCR) con sondas Taqman para ADN satélite de *T. cruzi*, en un volumen final de 20 µL (Piron *et al.*, 2007). Se emplearon 5 µL de muestra de ADN y la mezcla de reacción comercial FastStart PCR Master Mix de Roche en una concentración final 1X (Roche Diagnostics GmbH Corp., Mannheim, Germany). Las condiciones óptimas del ciclado fueron: 10 min a 95 °C, seguido de 40 ciclos at 95 °C por 15 s y 58 °C por 1 min. La amplificación fue realizada usando un equipo ABI 7500 (Applied Biosystems, Foster City, CA) (Schijman *et al.*, 2011; Qvarnstrom *et al.*, 2012; Duffly *et al.*, 2013).

Tabla. 2. Secuencias de cebadores empleados para la determinación de *T. cruzi*.

| Secuencia blanco         | Cebadores      | Secuencia (5' - 3')           | Concentración Final (µM) |
|--------------------------|----------------|-------------------------------|--------------------------|
| <i>T. cruzi</i> satélite | cruzi1         | ASTCGGCTGATCGTTTTTCGA         | 0,75                     |
|                          | cruzi2         | AATTCCTCCAAGCAGCGGATA         | 0,75                     |
|                          | cruzi3 (sonda) | FAM-CACACACTGGACACCAA-NFQ-MGB | 0,05                     |

La curva estándar se construyó determinando el Ct en muestras testigos preparadas a partir de diluciones 1/10 de una muestra de 200 mg de explantos a la que se le agregó 1.000.000 Tps de *T. cruzi* y de la cual se purificó ADN retomándolo en un



volumen total de 200  $\mu\text{L}$ . Las reacciones de qPCR se realizaron por triplicado usando 5  $\mu\text{L}$  de cada dilución equivalentes a 250.000; 25.000; 2.500; 250; 25 y 2,5 parásitos en cada punto de la curva estándar. En la Fig 9 se muestra la curva obtenida.

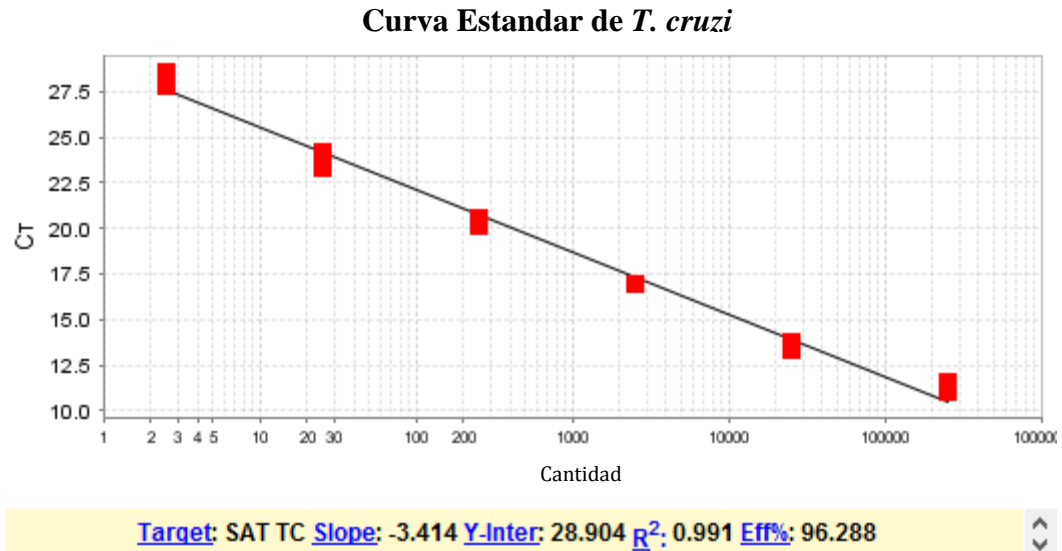


Fig. 9. Curva estándar de ADN de explantos placentarios con *Trypanosoma cruzi*.

Para cada condición experimental se purificó ADN en un volumen final de 200  $\mu\text{L}$ , se cuantificó la concentración de ADN y se emplearon 5  $\mu\text{L}$  de cada muestra en la reacción de qPCR. A partir del Ct (ciclo crítico) obtenido se calculó la cantidad de parásitos en los explantos por interpolación en la curva estándar. La cantidad de parásitos en toda la muestra se calculó de la siguiente manera:

$$n_1 = \frac{n^\circ \text{ de parásitos calculados según Ct x 200 (volumen total de ADN extraído)}}{5 \text{ (volumen empleado en la reacción qPCR)}}$$

Los resultados se expresaron teniendo en cuenta la masa de ADN total recuperada de manera de corregir la variabilidad en la masa de explantos presente en cada condición y asumiendo que la masa de ADN cuantificada es fundamentalmente ADN humano del tejido placentar.

$$\text{Parásitos por } \mu\text{g de ADN} = \frac{n_1}{\mu\text{g totales de ADN}}$$



## Análisis de L-Trp mediante HPLC

El sobrenadante de medios de cultivos fue almacenado a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  hasta su medición.  $80\text{ }\mu\text{L}$  de sobrenadantes de cultivos de explantos placentarios fueron mezclados con  $80\text{ }\mu\text{L}$  de 3-nitro-L-tirosina  $100\text{ }\mu\text{M}$  (estándar interno; Sigma-Aldrich de Argentina, pureza  $> 95\%$ ), y desproteinización mediante el agregado de  $40\text{ }\mu\text{L}$  de ácido tricloroacético (TCA,  $2\text{ M}$ ). Los tubos fueron centrifugados por  $10\text{ min}$  a  $13.000\text{ g}$ , recuperándose los sobrenadantes para su análisis cromatográfico.

Los niveles de L-Trp se cuantificaron en un HPLC Hewlett Packard 1100 equipado con un detector de fluorescencia (Holmes, 1988). Para la detección se utilizaron longitudes de onda de  $286$  y  $366\text{ nm}$  para la excitación y emisión de fluorescencia, respectivamente. Las muestras fueron separadas en una columna analítica de fase reversa (C18;  $150\text{ mm} \times 4,6\text{ mm}$  de diámetro interno, tamaño de partícula de  $5\text{ }\mu\text{m}$ ), conectada a una precolumna C18 ( $20\text{ mm}$  por  $4,6\text{ mm}$ ; tamaño de partícula de  $5\text{ }\mu\text{m}$ ). La fase móvil fue buffer acetato ( $15\text{ mM}$ ,  $\text{pH } 4$ ): acetonitrilo en una proporción de  $9:1$  (v/v), y se utilizó un flujo de  $0,9\text{ mL/min}$ . Las concentraciones de L-Trp en los sobrenadantes de placentas fueron calculadas matemáticamente mediante las ecuaciones de regresión de curvas de calibración ( $0 - 100\text{ }\mu\text{M}$ ) preparadas diariamente con un estándar analítico de L-Trp (Sigma-Aldrich de Argentina, pureza  $> 95\%$ ). En todos los casos las recuperaciones fueron mayores al  $99\%$ , de acuerdo con el análisis del estándar interno (Fig. 10).

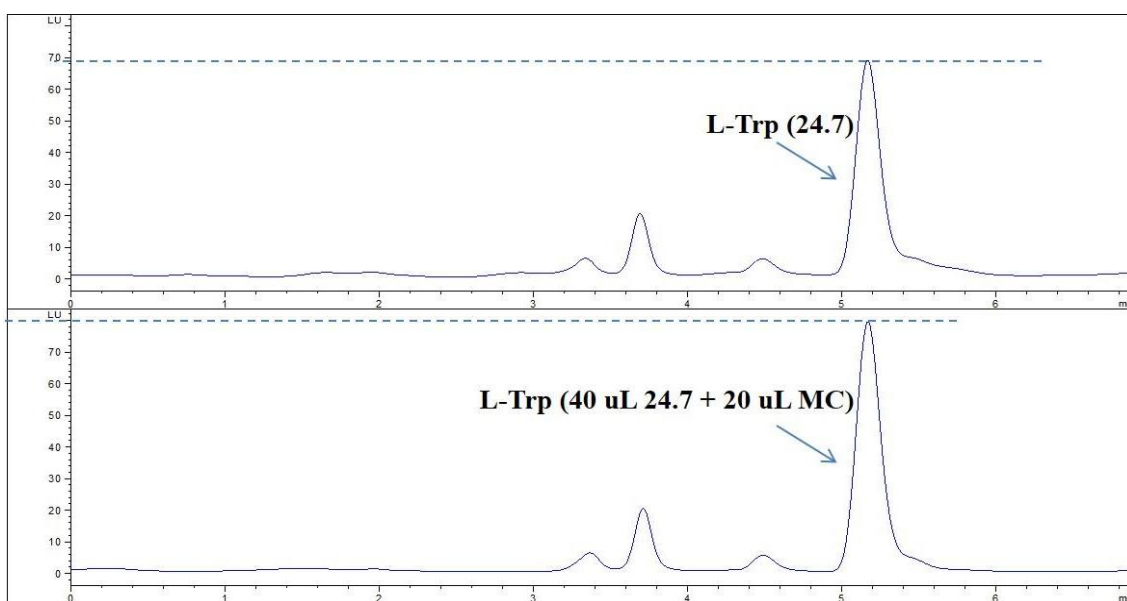


Fig. 10. Representación esquemática de una cromatografía de sobrenadante para el amino ácido L-Trp. La flecha señala el pico correspondiente a L-Trp.



## **Ensayo de Actividad enzimática de IDO**

La actividad de IDO fue determinada colorimétricamente por una modificación del método de Takikawa y col. (1998) en los homogenatos de los explantos placentarios (con y sin *T. cruzi*, con y sin tratamientos) (Takikawa *et al.*, 1988). La reacción fue iniciada por la adición de 100  $\mu$ L de homogenato a 100  $\mu$ L de medio de incubación compuesto por 100 mM buffer de fosfato de potasio, pH 6,5; 20 mM ascorbato; 20  $\mu$ M azul de metileno; 200  $\mu$ g/mL de catalasa; 800  $\mu$ M L-Trp. Tanto el homogenato como el medio de incubación fueron pre-incubados independientemente a 37 °C por 5 min antes de la mezcla. La mezcla fue incubada a 37 °C por 30 min. La reacción fue terminada por la adición de 40  $\mu$ L de ácido tricloroacético 30 % (p/v), y se incubó por otros 30 min a 50 °C para hidrolizar N-formil-quinurenina para producir Kyn. La mezcla de la reacción fue después centrifugada por 20 min a 3000 g para remover el sedimento. Se colocaron 100  $\mu$ L del sobrenadante en una placa de 96 pocillos, y se agregó 100  $\mu$ L de p-dimetilaminobenzaldehído al 1 % (p/v) en ácido acético. La absorbancia fue determinada a 490 nm para el color amarillo derivado de la presencia del anillo indol presente en Kyn (Wang y col., 2011).

Para calcular la concentración de L-Kyn producida por la actividad de IDO en los homogenatos de explantos placentarios, se empleó una curva de calibración en triplicado con diluciones seriadas (1/2) a partir de 100.000 a 1.562,5 nM de L-Kyn, diluida en PBS. Como blanco se usó medio sin el estándar. La concentración se obtuvo a través de la curva de la recta obtenida mediante regresión lineal. Los resultados fueron expresados como la concentración de L-Kyn de los explantos tratados relativo al grupo de explantos S/Tc y S/Trat, tomando como 1 el valor de los explantos no tratados.

## **Determinación de quinurenina en homogenato de explantos placentarios**

Los explantos placentarios fueron almacenados a - 80 °C hasta la homogeneización de tejido. Los explantos placentarios de cultivos fueron homogenizados en 200  $\mu$ L de PBS con inhibidor de proteasas y 1  $\mu$ L de cóctel inhibidor de proteasas (Sigma Aldrich, P1860), con un homogeneizador de tejido, tipo Potter-Elvehjem en hielo. El homogenato fue centrifugado a 8.000 g por 10 min a 4 °C para remover los fragmentos de tejido.



La concentración de quinurenina fue medida inmediatamente después del cultivo en el homogenato de explantos placentarios, mediante ensayo colorimétrico. Se tomó 70  $\mu\text{L}$  de sobrenadante de homogenato y 35  $\mu\text{L}$  de ácido tricloroacético 30 % (p/v). La mezcla de la reacción fue mezclada por vortex, y después se centrifugó por 15 min a 3.000 x g para remover el sedimento. Se colocó 50  $\mu\text{L}$  del sobrenadante en una placa de 96 pozos, y se agregó 50  $\mu\text{L}$  de p-dimetilaminobenzaldehído al 0.4 % (p/v) en ácido acético. Después de 10 min, la absorbancia fue determinada a 490 nm para el color amarillo derivado de la presencia del anillo indol presente en Kyn.

Para calcular la concentración de L-Kyn en los homogenatos de explantos placentarios, se empleó una curva de calibración en triplicado, con diluciones seriadas a partir de 100.000 a 1.562,5 nM de L-Kyn, diluida en PBS. Como blanco se usó medio sin el estándar. Los resultados fueron expresados como la concentración de L-Kyn de los explantos tratados relativo al grupo de explantos S/Tc y S/Trat.

#### **Determinación de quinurenina en sobrenadantes de medios de cultivos**

La concentración de Kyn fue medida inmediatamente después de los cultivos en los medios sobrenadantes de cultivos de explantos placentarios, mediante ensayo colorimétrico. Se tomaron 140  $\mu\text{L}$  de sobrenadante y 70  $\mu\text{L}$  de ácido tricloroacético 30 % (p/v). La mezcla de la reacción fue mezclada por vortex, y después se centrifugó por 15 min a 3000 x g para remover el sedimento. Se colocaron 50  $\mu\text{L}$  del sobrenadante en una placa de 96 pozos, y se agregaron 50  $\mu\text{L}$  de p-dimetilaminobenzaldehído al 0.4 % (p/v) en ácido acético. Después de 10 min, la absorbancia fue determinada a 490 nm para el color amarillo derivado de la presencia del anillo indol presente en Kyn.

Para calcular la concentración de L-Kyn en los sobrenadantes de explantos placentarios, se empleó una curva de calibración en triplicado, con diluciones seriadas a partir de 100.000 a 1.562,5 nM de L-Kyn, diluida en medio RPMI 1640 sin rojo fenol y suplementado con 10 % SFB. Como blanco se usó medio sin el estándar. Los resultados fueron expresados como la concentración de L-Kyn de los explantos tratados relativo al grupo de explantos S/Tc y S/Trat.



## **Análisis inmunohistoquímico:**

### **Procesamiento de las muestras biológicas**

Las vellosidades placentarias y los tejidos testigos empleados como control positivo de marcación se fijaron en formol tamponado al 4 % durante 24 h. para su posterior procesamiento de rutina de deshidratación en una serie de alcoholes de gradación creciente, aclaramiento e inclusión en parafina. Se obtuvieron cortes de 4 micrómetros de espesor, seriados y montados en vidrios positivados (Biotraza). Para la observación de nidos de amastigotes los cortes se tiñeron con hematoxilina y eosina. Para la detección de los antígenos por IHQ se realizó recuperación antigénica con calor (citrato de sodio pH: 6) y aplicación de los anticuerpos primarios específicos: IDO Clon 1F8.2 (Millipore, MAB10009) dilución de 1/250; AhR (Santa Cruz Biotechnology, H-211) dilución de 1/350 y IFN- $\gamma$  (eBioscience, 14-7317) dilución de 1/350, incubados durante toda la noche a 4 °C. El sistema de detección empleado fue Novolink Polymer Detection Novocastra y se empleó DAB (Vector cromogénico de color marrón) para su revelado, y empleando hematoxilina (Biopur) para su contratincción nuclear. Por último, se realizó deshidratación, aclaramiento y montaje con DPX (Sigma).

### **Adquisición imágenes**

De cada una de las muestras histológicas se obtuvieron diez imágenes en formato TIF. Las imágenes fueron adquiridas en un microscopio Óptico DM500 Leica en posición vertical, interconectada a una computadora. La configuración de la luz y la cámara se controlaron con el software Leica.

### **Análisis de las imágenes**

Mediante el software FIJI/Image J ([https://imagej.net/Colour\\_Deconvolution](https://imagej.net/Colour_Deconvolution)), se realizó el análisis y cuantificación de la expresión de IDO, AhR e IFN- $\gamma$  en las vellosidades placentarias, marcados con el vector cromogénico H-DAB, que colorea el tejido en color marrón. Primeramente, se seleccionó la imagen (compuesta por tres canales: rojo, verde y azul, RGB) a analizar, mediante el plugin “*Colour decovulation*”, el programa separa la imagen en tres matrices de color monocromo (RGB). Luego, se seleccionó la imagen de color marrón (correspondiente al revelado con DAB) y se le dio 8 bits de resolución. Posteriormente, mediante el comando “*Threshold*” se generó una nueva imagen en blanco y negro. El color blanco representa un valor 0 (ausencia de





marcación) y el color negro, representa el valor máximo equivalente en el umbral a 255. Una vez seleccionado el rango de área positiva para cada uno de los anticuerpos, el valor se obtiene seleccionando el comando “*measure*”.

Los resultados fueron expresados como:

$$\% \text{ de área de marcación} = \frac{\text{Área de marcación positiva } \mu\text{m}^2}{\text{Área total de tejido } \mu\text{m}^2} \times 100$$

### **Análisis estadístico**

Para evaluar el efecto del parásito sobre la KP, se ajustó un modelo lineal generalizado para cada una de las variables respuesta (MTT, expresión relativa de IDO, actividad de IDO, niveles de Kyn y expresión relativa de AhR), con presencia/ausencia del parásito y tiempos (4, 24 y 96 h) en el predictor lineal distribución gamma para el componente aleatorio y función de enlace de identidad (P.McCullagh and J.A.Nelder, no date).

Para determinar el efecto de cada grupo con respecto al otro se hicieron comparaciones utilizando ANOVA de una y dos vías con un post-test de comparación múltiple Tukey's. Para la comparación de dos variables se utilizó una prueba “t” de Student. Los resultados se presentan como promedio  $\pm$  Error Estándar de la Media (EEM), según se muestra en el gráfico realizado con datos de 3 experimentos independientes. Todos los análisis estadísticos se realizaron usando el programa Graph Pad Prism 7.0. Se consideró diferencia significativa para  $p < 0,05$ . En las gráficas se indicarn las diferencias significativas entre cada condición.



## RESULTADOS

Objetivo 1. Analizar el efecto de la infección por *T. cruzi* en la activación del catabolismo de L-Trp en explantos placentarios.

### Efecto del tiempo de cultivo sobre la viabilidad de los explantos placentarios

Nuestro primer grupo de experimentos fue diseñado a fin de establecer las mejores condiciones de trabajo para evaluar la cascada metabólica del Trp en la infección por *T. cruzi* en el tejido placentario. Se diseñó un modelo *in vitro* en el cual explantos placentarios ( $n = 4$ ) fueron cultivados con Tps de *T. cruzi* por distintos tiempos (4, 24 y 96 h), cultivos sin parásitos fueron empleados como control. La viabilidad del tejido placentario en el tiempo de cultivo en explantos infectados (Explantos + *Tc*) con respecto a los explantos no infectados (Explantos S/*Tc*) fue medida mediante el ensayo con MTT, si el tejido es viable el MTT se convierte en un compuesto de color violeta (formazán) que se cuantificó mediante su absorbancia. Como se puede observó diferencia significativa en explantos infectados respecto a los no infectados a las 96 h de cultivo (Fig. 11).

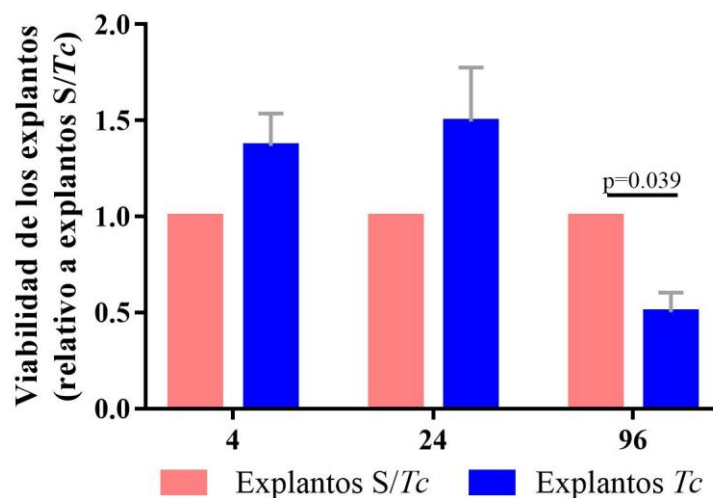


Fig. 11. Efecto de la infección por *T. cruzi* sobre la viabilidad de explantos placentarios

Explantos placentarios fueron cultivados durante 4, 24 y 96 h con *T. cruzi* (Explantos *Tc*) o no (Explantos S/*Tc*). Mediante el ensayo de MTT se evaluó la viabilidad de los explantos placentarios. Los resultados se expresan como viabilidad relativa de los explantos para cada tiempo de cultivo. La viabilidad de los explantos en cada condición se calculó como se indica en Materiales y métodos. La gráfica representa el valor de la media  $\pm$  EEM de 3 experimentos independientes. El análisis estadístico se ajustó a un modelo lineal generalizado. Se consideró estadísticamente significativo un valor  $p < 0,05$ . Se indica la diferencia significativa entre condición.



## Efecto de la infección por *T. cruzi* sobre la actividad de IDO en explantos placentarios

En este grupo de experimentos se analizó el efecto de la infección de explantos placentarios *in vitro* a 4, 24 y 96 h de cultivo sobre la actividad de IDO a fin de determinar si el *T. cruzi* induce su activación. En la Fig. 12 se observó que a ningún tiempo de cultivo hay cambios significativos en la actividad de IDO en el explanto infectado respecto al no infectado.

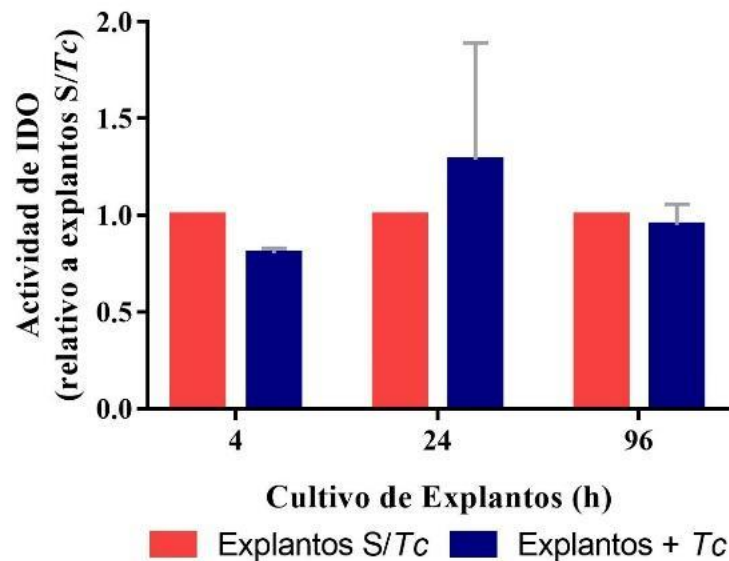


Fig. 12. Efecto de la infección por *T. cruzi* sobre la actividad de IDO.

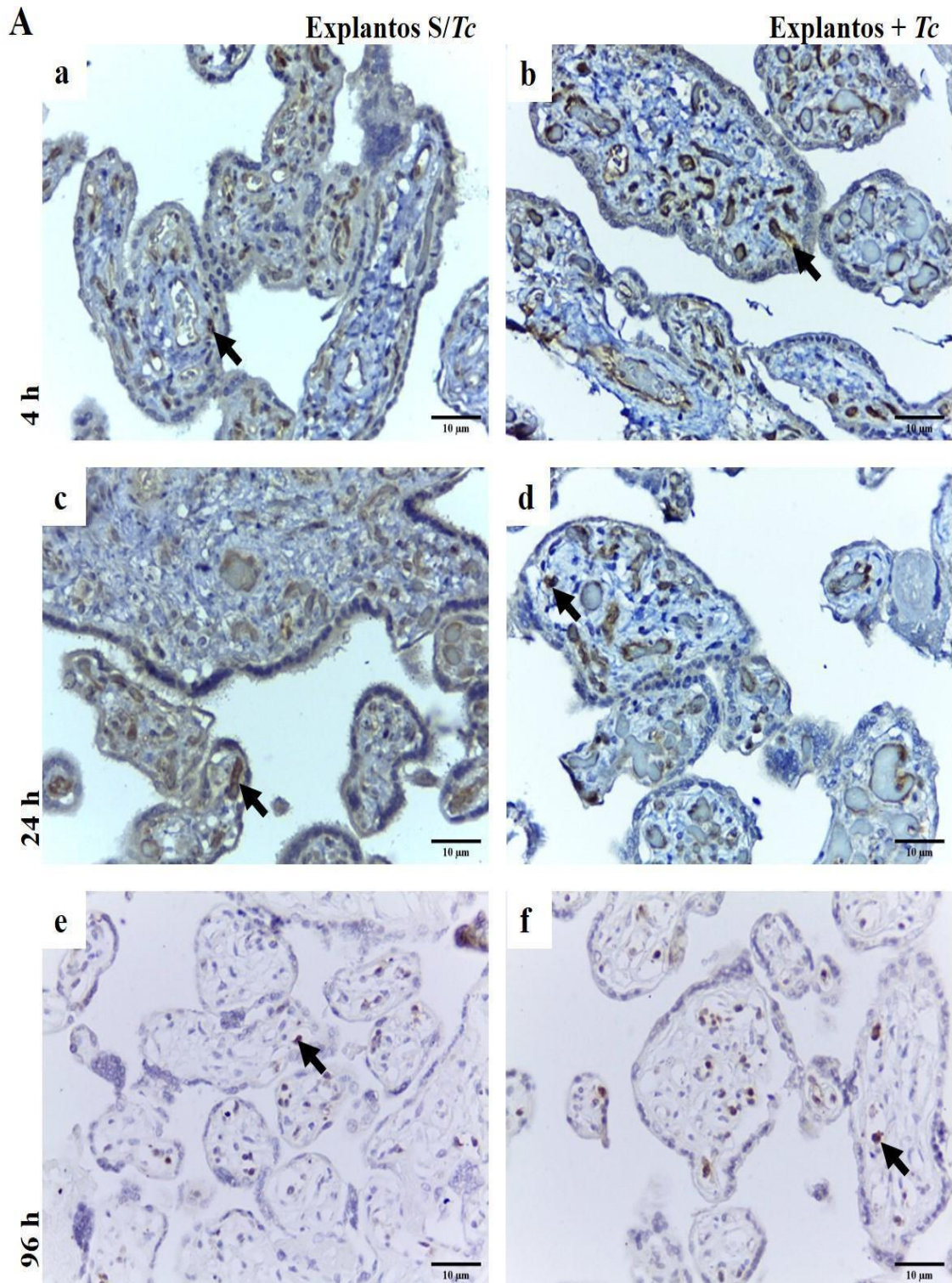
Explantos placentarios fueron infectados con *T. cruzi* (Explantos + *Tc*) o no (Explantos S/*Tc*). Los resultados se expresan como la actividad de IDO relativa para cada tiempo de cultivo. La actividad de IDO en cada condición se calculó como se indica en Materiales y métodos. La gráfica representa el valor de la media  $\pm$  EEM de 3 experimentos independientes. El análisis estadístico se ajustó a un modelo lineal generalizado. Se consideró estadísticamente significativo un valor  $p < 0,05$ .

## Efecto de la infección por *T. cruzi* sobre la localización y expresión proteica de la enzima IDO

Se analizó el efecto de la infección por *T. cruzi* en la localización y expresión de IDO a través de su detección y cuantificación por IHQ en explantos infectados o no infectados. En lo que a localización se refiere, tanto en los explantos con *Tc* como en los explantos S/*Tc*, IDO se expresa en el endotelio vascular y en células del estroma, independientemente de las horas de cultivo (Fig. 13, A). En cada tiempo de cultivo, no se observaron diferencias significativas en la expresión relativa de IDO en explantos



infectados respecto al no infectado (Explantos sin parásitos, S/Tc) como se puede observar en la Fig. 13 B.



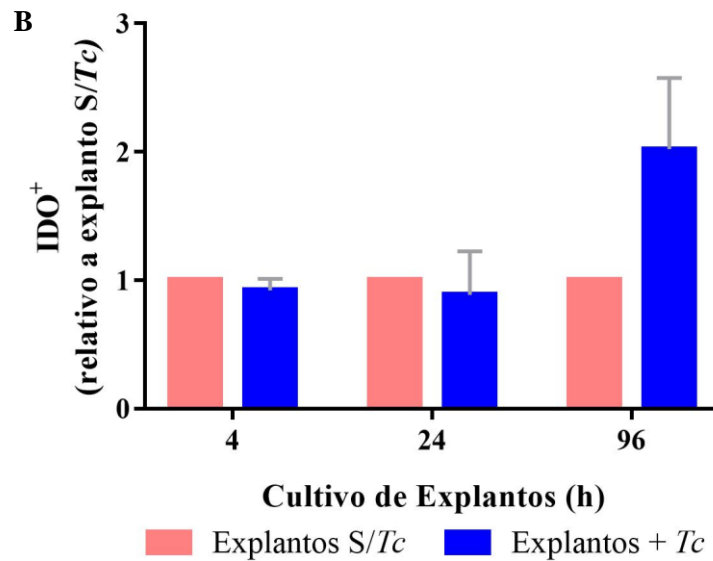


Fig. 13. Efecto de la infección por *T. cruzi* en explantos placentarios sobre la localización y expresión de IDO.

**A)** Imágenes representativas de IHQ para IDO (color marrón) de explantos infectados con *T. cruzi* (Explantos + *Tc*; **b, d y f**) o no (Explantos S/*Tc*; **a, c y e**), incubados durante 4 h (**a y b**), 24 h (**c y d**), o 96 h (**e y f**). Se observa marcación positiva para IDO en el citoplasma del endotelio vascular (flechas) y células de estroma. La tinción fue contrastada con Hematoxilina (núcleos azules). Magnificación 400 X, escala 10  $\mu$ m.

**B)** Cuantificación del área positiva de IHQ para IDO. Los resultados se expresan como expresión relativa de IDO para cada tiempo. La expresión de IDO en cada condición se calculó como se indica en Materiales y métodos. La gráfica representa el valor de la media  $\pm$  EEM de 3 experimentos independientes. El análisis estadístico se ajustó a un modelo lineal generalizado. Se consideró estadísticamente significativo un valor  $p < 0,05$ .

### Efecto de la infección por *T. cruzi* en explantos placentarios sobre la producción de Kyn

Se valoró la producción de Kyn liberada al sobrenadante tanto de explantos infectados o no a las 4, 24 y 96 h de cultivo. No se observaron diferencias significativas en la concentración de Kyn liberada al medio en explantos infectados (Explantos *Tc*) respecto al no infectado (S/*Tc*). Se observó un incremento significativo en la concentración de Kyn en explantos infectados a partir de las 24 h respecto a las 4 h de cultivo (Fig. 14 A). En explantos no infectados se observó que el tratamiento con IFN- $\gamma$  incrementó los niveles de Kyn a las 96 h de cultivo (Fig. 14 B).

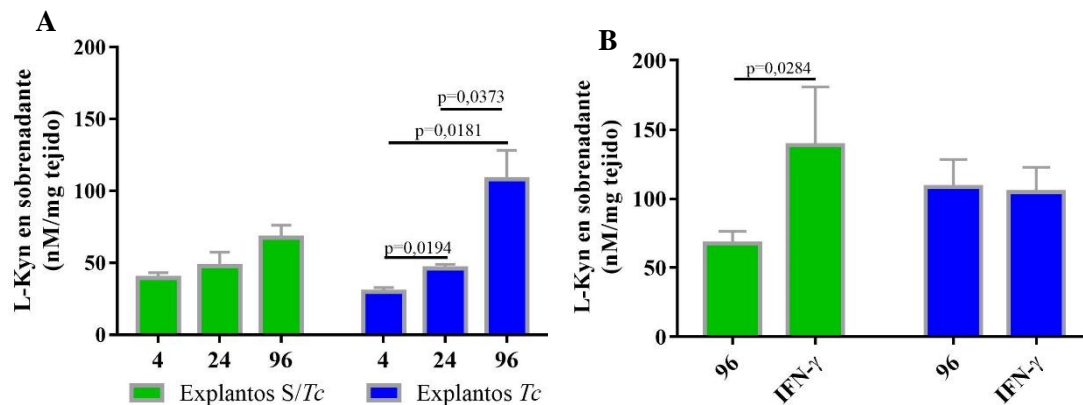


Fig. 14. Efecto de la infección por *T. cruzi* sobre la producción de Kyn en explantos placentarios incubados durante 4, 24 y 96 h.

La concentración de Kyn fue determinada mediante un ensayo colorimétrico en sobrenadante de 4, 24 y 96 h de explantos infectados con *T. cruzi* (Explantos Tc) o no (Explantos S/Tc).

A) Los resultados representan la concentración de L-Kyn (nM/mg de tejido) en sobrenadantes de cultivo de 4, 24 y 96 h. La concentración de Kyn se calculó como se describió en Materiales y Métodos. La gráfica representa el valor de la media  $\pm$  EEM de 3 experimentos independientes. El análisis estadístico se ajustó a un modelo lineal generalizado. Se consideró estadísticamente significativo un valor  $p < 0,05$ . Se indican diferencias significativas entre condición.

B) Los resultados representan la concentración de Kyn de sobrenadantes de 96 h de cultivo de explantos expuesto o no con IFN- $\gamma$  (10 ng/mL) y/o infectados o no con *T. cruzi*. La gráfica representa el valor de la media  $\pm$  EEM de 3 experimentos independientes. El análisis estadístico se realizó un análisis de varianza de una vía. Se consideró estadísticamente significativo un valor  $p < 0,05$ . Se indican diferencias significativas entre condición.

### Efecto de la infección por *T. cruzi* sobre la localización y expresión de AhR

Se determinó mediante IHQ, el efecto de la infección de explantos placentarios sobre la localización y expresión de AhR. En la Fig. 15A, se muestra que la marca positiva para el AhR (color marrón) se observó a nivel del trofoblasto, así también en células del estroma y en menor expresión en el endotelio vascular en explantos infectados y no infectados. En cada tiempo de cultivo, no se encontró diferencia significativa en la expresión relativa de AhR entre los explantos infectados o no con *T. cruzi* (Explanto S/Tc) Fig. 15 B.

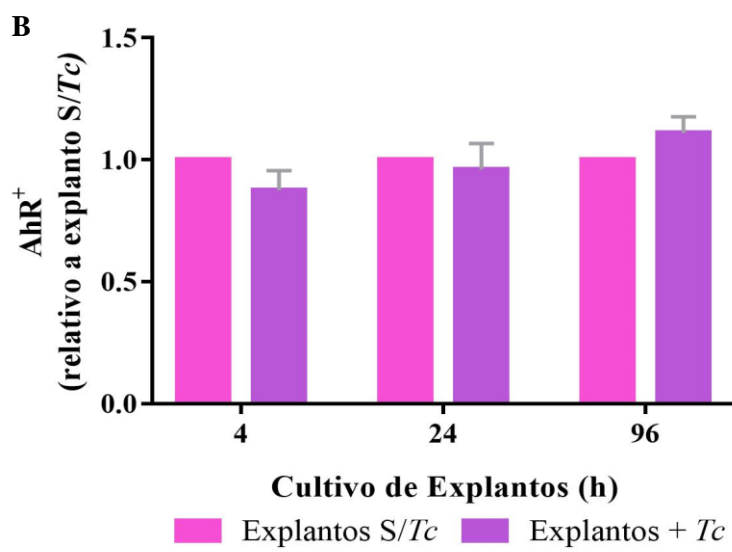
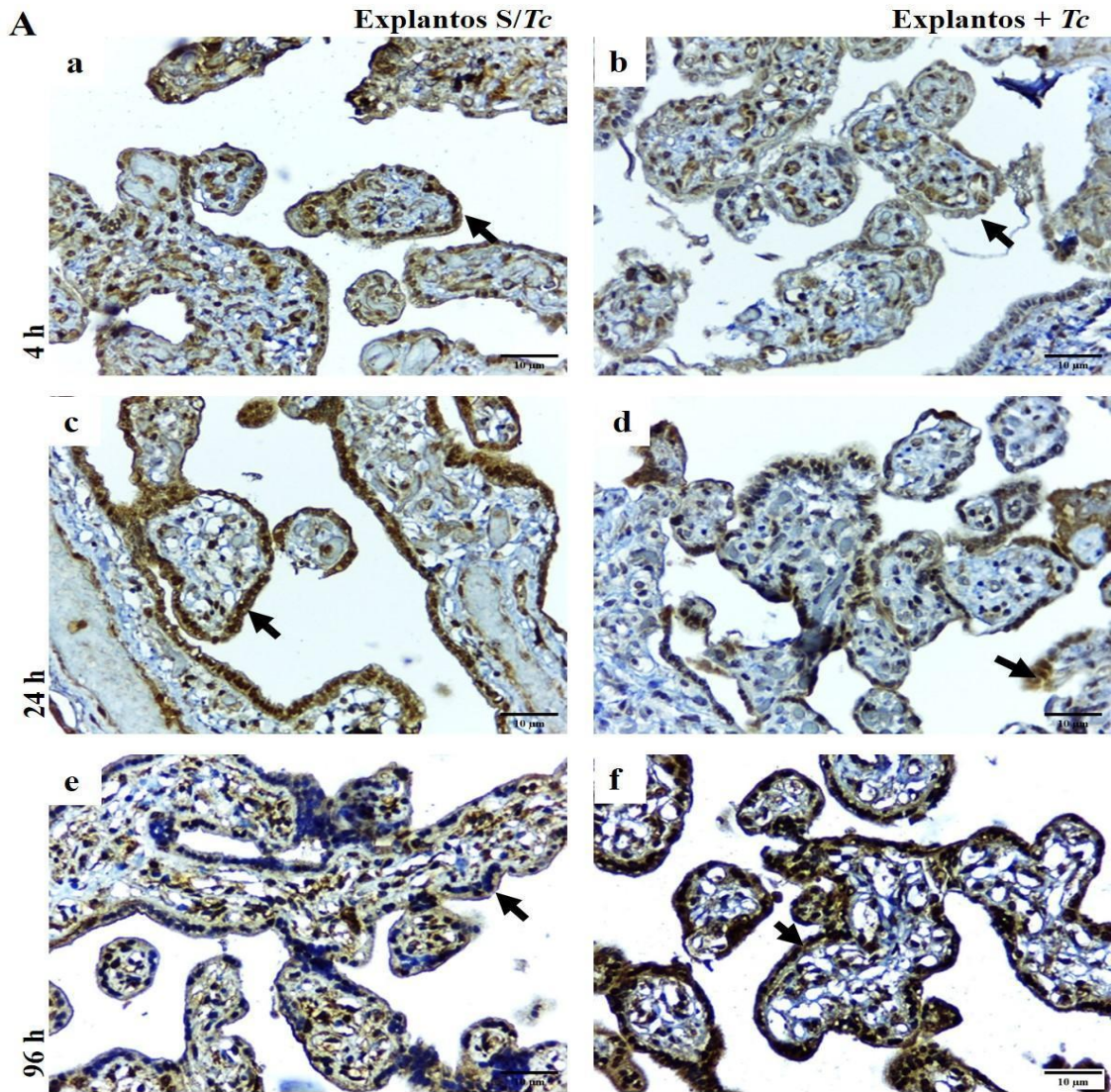


Fig. 15. Efecto de la infección por *T. cruzi* sobre la localización y expresión de AhR.



**A)** Imágenes representativas de IHQ para AhR (color marrón) de explantos que fueron infectados con *T. cruzi* (Explantos + *Tc*; **b, d** y **f**) y otro sin parásitos (Explantos S/*Tc*; **a, c** y **e**). Se incubaron durante 4 h (**a** y **b**), 24 h (**c** y **d**), y 96 h (**e** y **f**). Se observó marcación positiva para AhR en el trofoblasto (flechas), citoplasma del endotelio vascular, y células de estroma. La tinción fue contrastada con Hematoxilina (núcleos azules). Magnificación 400 X, escala 10  $\mu$ m.

**B)** Cuantificación del área positiva de IHQ para AhR. Los resultados se expresan como expresión relativa de AhR para cada tiempo. La expresión de AhR en cada condición se calculó como se indica en Materiales y métodos. La gráfica representa el valor de la media  $\pm$  EEM de 3 experimentos independientes. El análisis estadístico se ajustó a un modelo lineal generalizado. Se consideró estadísticamente significativo un valor  $p < 0,05$ .

### Conclusión parcial

- ✚ En un modelo *in vitro* de explantos infectados con *T. cruzi*, no se observaron cambios en la actividad y la expresión relativa de IDO con respecto a explantos sin parásitos, en ningún tiempo de cultivo.
- ✚ No se observaron diferencias significativas en la concentración de Kyn entre explantos infectados o no.
- ✚ A partir de las 24 h de cultivo, los niveles de Kyn aumentaron en forma significativa en los explantos infectados.
- ✚ En ningún tiempo de cultivo se modificó la expresión relativa de AhR entre explantos infectados y no infectados con *T. cruzi*.
- ✚ A las 96 h se observó que la presencia del parásito modifica la viabilidad del explanto placentario.

Estos datos sugieren que el parásito no modifica la vía catabólica del L-Trp en explantos placentarios infectados respecto a los no infectados.





## Objetivo 2. Evaluar la participación de la actividad de IDO, enzima limitante de la vía de L-Trp, en el control de la infección de explantos placentarios con *T. cruzi*.

### Ensayo de inhibición y estimulación de IDO

Para comprender la acción de la enzima IDO en la placenta humana como mecanismo de defensa antimicrobiana, los explantos cultivados con o sin *T. cruzi*, fueron tratados con L-1MT o IFN- $\gamma$ . Se observaron altos niveles de Trp en el sobrenadante de 72 h de cultivo en explantos tratados con L-1MT, tanto en explantos con *T. cruzi*, como sin *T. cruzi* comparado con explantos sin tratamiento (S/Trat). Sin embargo, cuando los explantos fueron tratados con IFN- $\gamma$ , los niveles de Trp fueron similares al control. No se encontraron diferencias entre los explantos infectados respecto a los no infectados (Fig. 16).

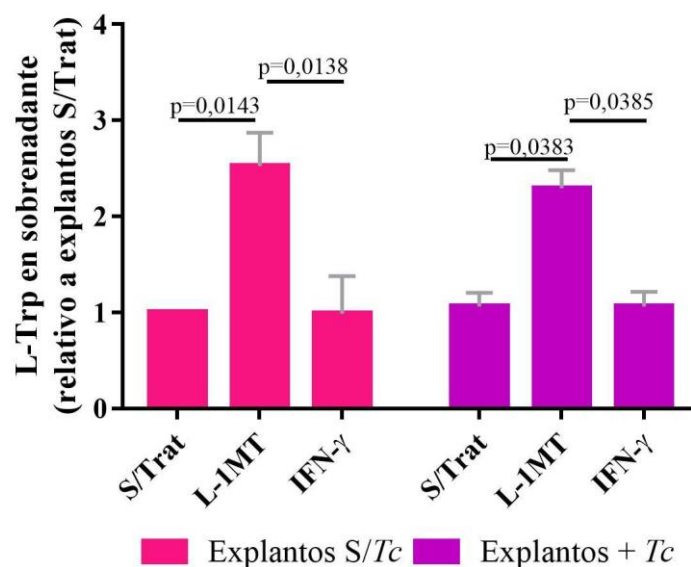


Fig. 16. Efecto de la inhibición y estimulación de la actividad de IDO sobre la degradación del L-Trp.

En un modelo *in vitro* de explantos placentarios infectados con *T. cruzi* (Explantos + *Tc*) o no (Explantos S/*Tc*). Los explantos placentarios fueron tratados 6 h previas a la infección y después de 24 h de exposición del parásito, con L-1MT (400  $\mu$ M), IFN- $\gamma$  (20 ng/mL) o sin tratamiento (S/Trat). La concentración de L-Trp fue determinada en sobrenadante de 72 h de cultivo. Los resultados expresan la concentración relativa de L-Trp. La concentración de L-Trp en cada condición se calculó como se indica en Materiales y Métodos. La gráfica representa el valor de la media  $\pm$  EEM de 3 experimentos independientes. El análisis estadístico se realizó mediante un ANOVA de dos vías, con un análisis post test de comparación múltiple Tukey's. Se consideró estadísticamente significativo un valor  $p < 0,05$ . Se indican diferencias significativas entre condición.



## Producción de L-Kyn en explantos placentarios tratados con L-1MT o IFN- $\gamma$

Los resultados de la Fig. 16 (L-Trp HPLC), relacionados a niveles del L-Trp, nos llevaron a estudiar, si cuando los explantos se tratan con L-1MT o IFN- $\gamma$  modifican las concentraciones de L-Kyn en el sobrenadante. Para ello, se analizaron los sobrenadantes de explantos placentarios cultivados durante 72 h. Los explantos que fueron tratados con L-1MT presentaron menor concentración de L-Kyn. La concentración de L-Kyn aumentó el doble cuando fueron tratadas con IFN- $\gamma$ , tanto en explantos infectados con *T. cruzi* (Explantos + *Tc*) como en los explantos controles (Explantos S/*Tc*) comparado con los explantos S/Trat. No se encontró diferencias entre los explantos infectados respecto a los no infectados, tanto para los que fueron tratados con L-1MT o IFN- $\gamma$  (Fig. 17).

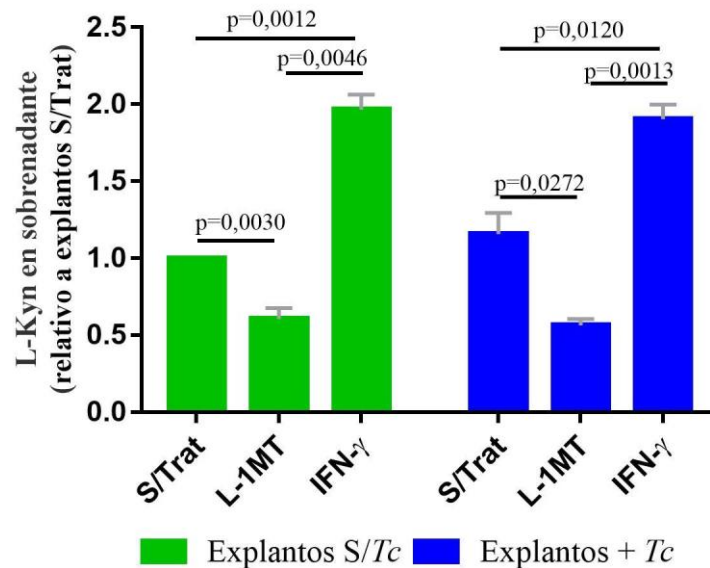


Fig. 17. Efecto de la inhibición y estimulación de la actividad de IDO sobre Kyn en el sobrenadante de explantos infectados de *T. cruzi* (Explantos + *Tc*) y explantos sin parásitos (Explantos).

Explantos placentarios fueron tratados 6 h previas a la infección y después de 24 h de exposición con *T. cruzi*, con L-1MT (400  $\mu$ M), IFN- $\gamma$  (20 ng/mL) o en ausencia de tratamiento (S/Trat). La concentración de L-Kyn fue determinada en sobrenadantes de 72 h de cultivo de explantos. Los resultados expresan la concentración relativa de L-Kyn. La concentración de L-Kyn en cada condición se calculó como se indica en Materiales y Métodos. La gráfica representa el valor de la media  $\pm$  EEM de 3 experimentos independientes. El análisis estadístico se realizó mediante un ANOVA de dos vías, con un análisis post test de comparación múltiple Tukey's. Se consideró estadísticamente significativo un valor  $p < 0,05$ . Se indican diferencias significativas entre condición.



## Efecto de la inhibición y estimulación de la actividad de IDO sobre la infección de explantos placentarios a 24 h y 72 h de infección

Dados los resultados previos referidos a las concentraciones de L-Trp y L-Kyn en presencia de L-1MT e IFN- $\gamma$ , se estudió la acción de la actividad de IDO sobre infección del tejido placentario *in vitro*.

Inicialmente se evaluó el efecto de la inhibición y estimulación de IDO sobre la carga parasitaria mediante PCR en tiempo real en los explantos placentarios expuestos a Tps durante 24 h. Se observó que el tratamiento de los explantos placentarios con L-1MT o IFN- $\gamma$  no modificó la carga parasitaria respecto a los explantos sin tratamiento (S/Trat) ( $p < 0,074$ ,  $p = 0,0876$ ; respectivamente). No se observó diferencia entre la carga parasitaria de explantos tratados con L-1MT vs IFN- $\gamma$  ( $p = 0,1885$ ). Los resultados indican que en explantos infectados la inhibición o estimulación de la actividad de IDO no modificó la carga parasitaria a las 24 h (Fig. 18).

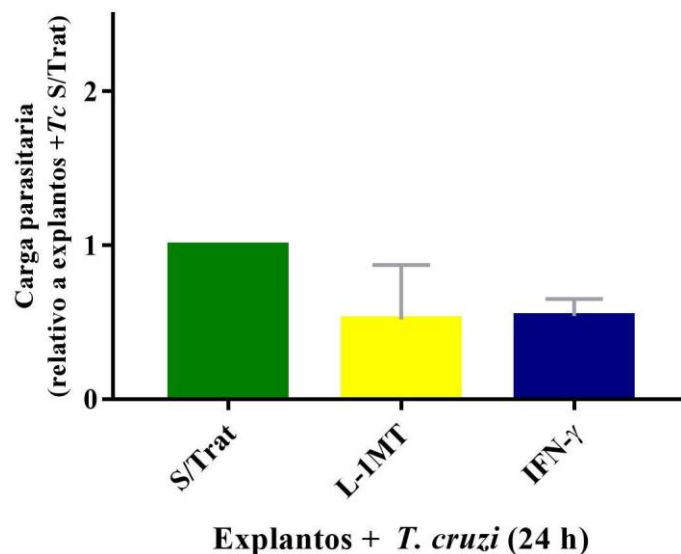


Fig. 18. Efecto de la inhibición y estimulación de IDO sobre la carga parasitaria en explantos placentarios infectados con *T. cruzi* durante 24 h de infección.

Explantos infectados con *T. cruzi* fueron tratados 6 h previas a la infección con L-1MT (400  $\mu$ M) o IFN- $\gamma$  (20 ng/mL). Mediante PCR cuantitativa en tiempo real se calculó la carga parasitaria. Los resultados expresan la carga parasitaria relativa a los explantos infectados no tratados, calculada como se indica en Materiales y Métodos. La gráfica representa el valor de la media  $\pm$  EEM de 3 experimentos independientes. El análisis estadístico se realizó mediante un ANOVA de una vía. Se consideró estadísticamente significativo un valor  $p < 0,05$ . Se indican diferencias significativas entre condición.



Posteriormente, se evaluó a las 72 h de cultivo el efecto biológico de la actividad de IDO en un modelo de tratamiento de inhibición (L-1MT) y estimulación (IFN- $\gamma$ ) de la enzima en explantos infectados con *T. cruzi*. Para ello, se determinó la carga parasitaria mediante una PCR en tiempo real con sondas Taqman. Se observó que la carga parasitaria incrementa significativamente en explantos infectados tratados con el inhibidor de IDO (L-1MT;  $2,086 \pm 0,642$ ) comparada con los explantos que no fueron tratados (S/Trat)  $p < 0,0023$ . No se encontró diferencia significativa entre los explantos infectados tratados con IFN- $\gamma$  ( $1,859 \pm 0,0663$ ) respecto a los explantos infectados sin tratamiento (S/Trat,  $p = 0,0705$ ). Se observó disminución de la carga parasitaria en explantos infectados tratados con IFN- $\gamma$  vs L-1MT ( $p = 0,040$ ). Los resultados muestran que en explantos infectados la inhibición de la actividad de IDO incrementa la carga parasitaria a las 72 h, sugiriendo que la actividad de IDO en el tejido placentario es crítica para el control de la replicación del parásito (Fig. 19).

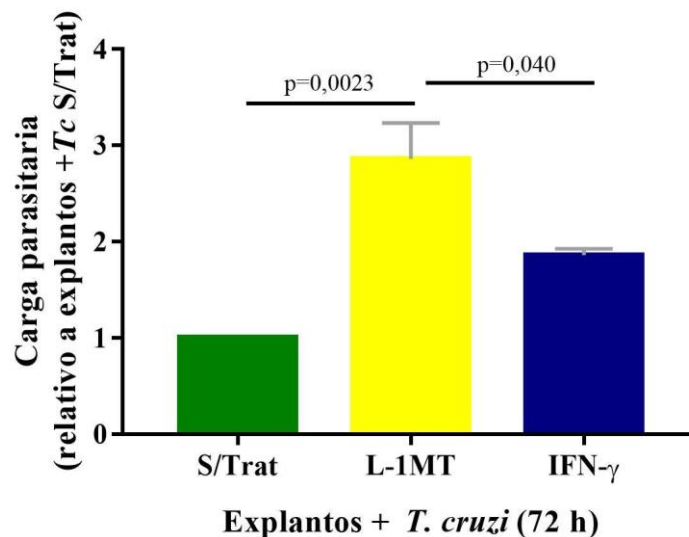


Fig. 19. Efecto de la inhibición y estimulación de IDO sobre la carga parasitaria en explantos placentarios infectados con *T. cruzi*.

Explantos infectados con *T. cruzi* fueron tratados 6 h previas a la infección y postinfección con L-1MT (400  $\mu$ M) o IFN- $\gamma$  (20 ng/mL) hasta alcanzar las 72 h de cultivo. Mediante PCR cuantitativa en tiempo real se calculó la carga parasitaria. Los resultados expresan la carga parasitaria relativa a los explantos infectados no tratados, calculada como se indica en Materiales y Métodos. La gráfica representa el valor de la media  $\pm$  EEM de 3 experimentos independientes. El análisis estadístico se realizó mediante un ANOVA de una vía. Se consideró estadísticamente significativo un valor  $p < 0,05$ . Se indican diferencias significativas entre condición.

Mediante cortes teñidos con H/E se corroboró la infección a las 72 h de cultivo de explantos infectado con *T. cruzi* y tratados con L-1MT e IFN- $\gamma$ . Se observaron nidos



de amastigotes tanto en explantos sin tratamientos, como en los explantos que fueron tratados con L-1MT y IFN- $\gamma$  (Fig. 20).

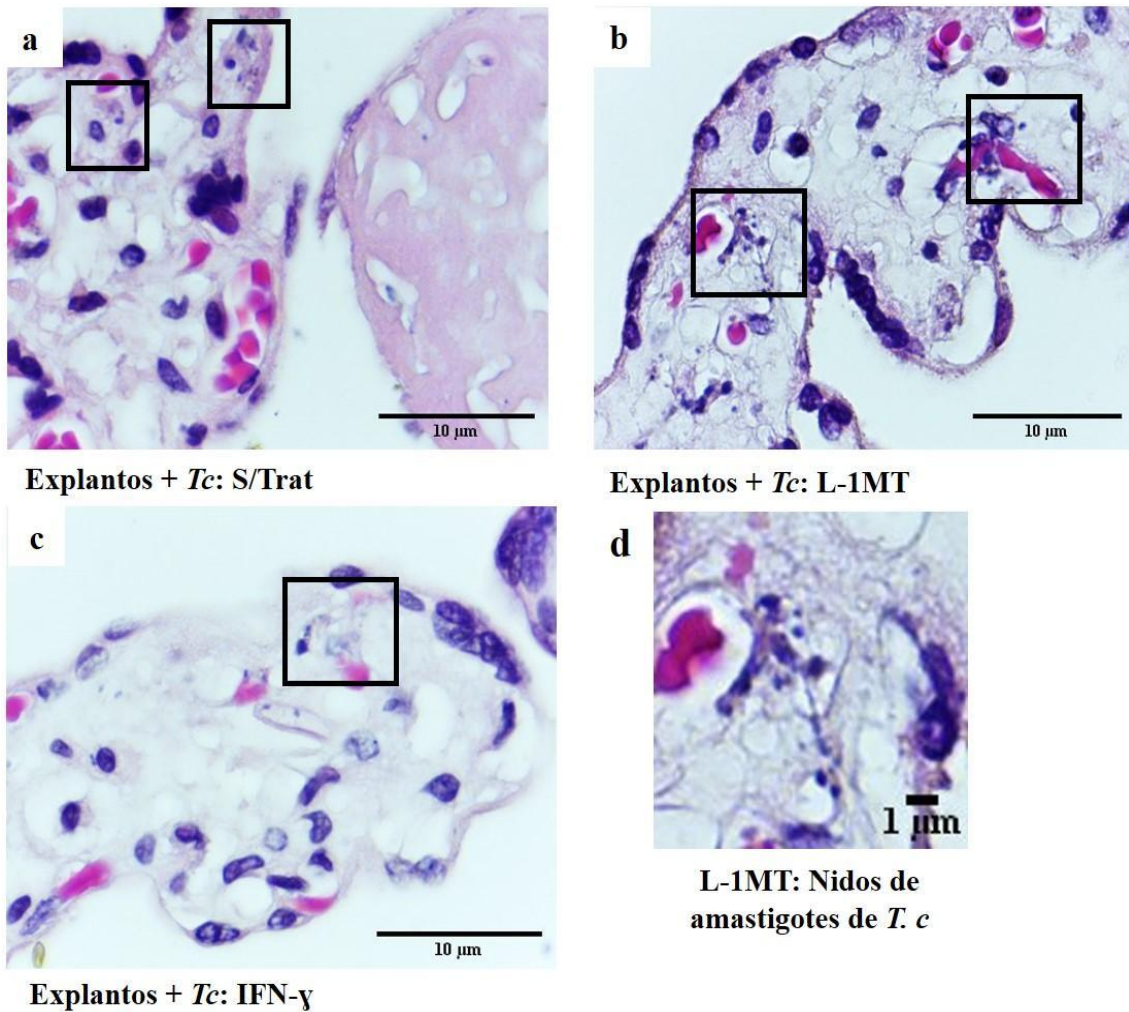


Fig. 20. Nidos de amastigotes de explantos infectados con *T. cruzi* que fueron tratados durante 48 h.p.i con L-1MT o IFN- $\gamma$ .

Imágenes representativas de cortes de cultivo de explantos infectados con *T. cruzi* (150.000 Tps) durante toda la noche, y tratados postinfección con L-1MT (400  $\mu$ M) o IFN- $\gamma$  (20 ng/mL) hasta alcanzar las 72 h, teñidos con H/E. En los recuadros se pueden observar los nidos de amastigotes en explantos placentarios: **a**) sin tratamiento (S/Trat), escala 10  $\mu$ m; **b**) tratados con L-1MT, escala 10  $\mu$ m; **c**) tratados con IFN- $\gamma$ , escala 10  $\mu$ m. Magnificación 1000 X **d**) Imagen de explantos placentarios con inhibidor de IDO L-1MT con aumento de resolución de pixeles, donde se pueden observar los amastigotes. Escala 1  $\mu$ m.

La exposición con L-1MT o IFN- $\gamma$  no modificó la viabilidad de los explantos placentarios a 72 h de cultivo en presencia o ausencia de parásitos (Fig. 21).

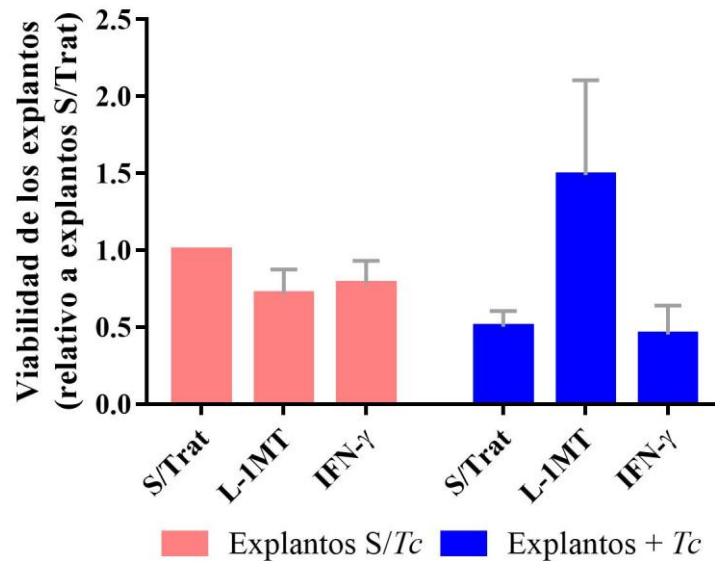


Fig. 21. Efecto de la inhibición y estimulación de la actividad de IDO sobre la viabilidad de explantos placentarios.

Explantos placentarios fueron tratados 6 h previas a la infección y después de 24 h de exposición con *T. cruzi*, con L-1MT (400  $\mu$ M), IFN- $\gamma$  (20 ng/mL) o sin tratamiento (S/Trat), hasta alcanzar las 72 h de cultivo. Mediante el ensayo de MTT se evaluó la viabilidad de los explantos placentarios. Los resultados se expresan como viabilidad relativa de los explantos para cada tiempo de cultivo. La viabilidad de los explantos en cada condición se calculó como se indica en Materiales y métodos. La gráfica representa el valor de la media  $\pm$  EEM de 3 experimentos independientes. El análisis estadístico se realizó mediante un ANOVA de dos vías, con un análisis post test de comparación múltiple Tukey's. Se consideró estadísticamente significativo un valor  $p < 0,05$ .

### Conclusiones parciales

- ✚ En el presente objetivo se demostró que el tratamiento con L-1MT disminuyó significativamente la concentración de L-Kyn en el sobrenadante e incrementó la carga parasitaria en explantos infectados.
- ✚ En explantos tratados con IFN- $\gamma$  se demostró un incremento significativo de la concentración de L-Kyn en sobrenadante tanto en explantos infectados como no infectados.
- ✚ La inducción de IDO mediante el agregado de IFN- $\gamma$  no modificó la carga parasitaria más allá de lo observado en cultivos no tratados con esta citoquina sugiriendo que la actividad de IDO constitutiva de la placenta es suficiente para controlar al parásito.



✚ Los tratamientos con L-1MT o IFN- $\gamma$  no alteraron la viabilidad de explantos placentarios.

Estos datos nos indican que la actividad de IDO en la placenta es importante para controlar la replicación del parásito, ya que su inhibición incrementó la carga parasitaria.



### **Objetivo 3. Determinar la participación de metabolitos de la KP como antimicrobianos en la infección con *T. cruzi***

En el objetivo anterior se demostró que el control de la carga parasitaria *in vitro* se correlacionó con la acción de la enzima IDO, ya que al bloquear la actividad de esta enzima se incrementó la carga parasitaria. Una hipótesis para explicar este fenómeno supone que, por un lado, la adición exógena de L-Trp podría aumentar la replicación parasitaria por consumo del aminoácido por el parásito o, por otra parte, podría ser que a través de la mayor cantidad de sustrato, se produzcan más catabolitos deletéreos para el *T. cruzi* a través de la KP.

Para evaluar esta hipótesis, se adicionó exógenamente L-Trp en explantos placentarios infectados o no con *T. cruzi*. Se determinó la actividad de IDO, la concentración de Kyn en el homogenato y en el sobrenadante, y se cuantificó la carga parasitaria.

#### **Efecto de la adición exógena de L-Trp sobre IDO en explantos placentarios infectados o no con *T. cruzi***

Se observó un incremento significativo de la actividad de IDO con el agregado exógeno de L-Trp en el medio de cultivo tanto en explantos infectados como no infectados. Los resultados no mostraron diferencias significativas entre grupos de explantos infectados con respecto a los no infectados en relación con cada tratamiento (Fig. 22). Estos datos sugieren que el agregado de L-Trp exógeno modifica la actividad de IDO en el tejido placentario *in vitro*.



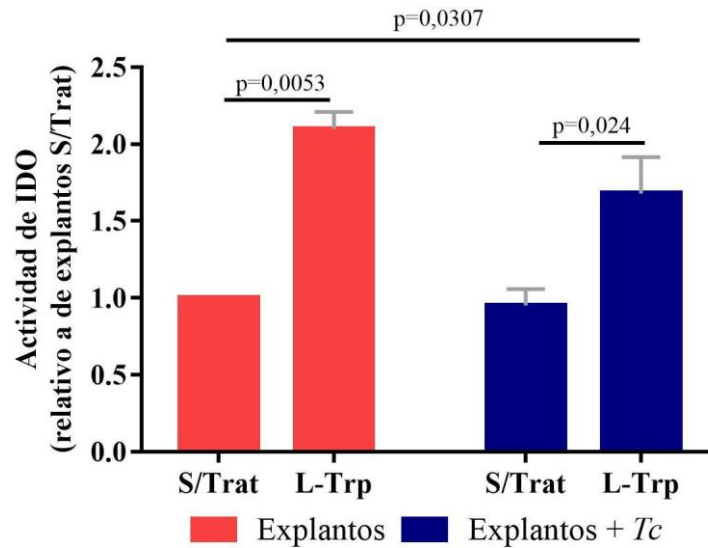


Fig. 22. Efecto de la adición exógena de L-Trp sobre la actividad de IDO en homogenato de explantos placentarios infectados con *T. cruzi* y controles.

Explantos placentarios fueron tratados con L-Trp (200  $\mu$ M) o sin tratamiento (S/Trat), 4 h previas a la infección con *T. cruzi* y durante todo el cultivo cada 24 h. La actividad de IDO se determinó en homogenatos de explantos placentarios a las 96 h de cultivo. Los resultados se expresan como la actividad relativa de IDO respecto a explantos sin infección y sin L-Trp. La actividad de IDO se calculó como se indica en Materiales y Métodos. La gráfica representa el valor de la media  $\pm$  EEM de 3 experimentos independientes. El análisis estadístico se realizó mediante un ANOVA de dos vías, con un análisis post test de comparación múltiple Tukey's. Se consideró estadísticamente significativo un valor  $p < 0,05$ . Se indican diferencias significativas entre condición.

### Efecto de la adición exógena de L-Trp sobre la producción de Kyn en el tejido placentario y sobrenadante de cultivo de explantos placentarios infectados o no con *T. cruzi*.

Se observó que la adición de L-Trp exógena en explantos placentarios incrementó significativamente la concentración de L-Kyn en el homogenato placentario tanto en explantos infectados como no infectados (Fig. 23). Sin embargo, se observó menor concentración de Kyn en explantos infectados y tratados con L-Trp que en los explantos no infectados y tratados con L-Trp.

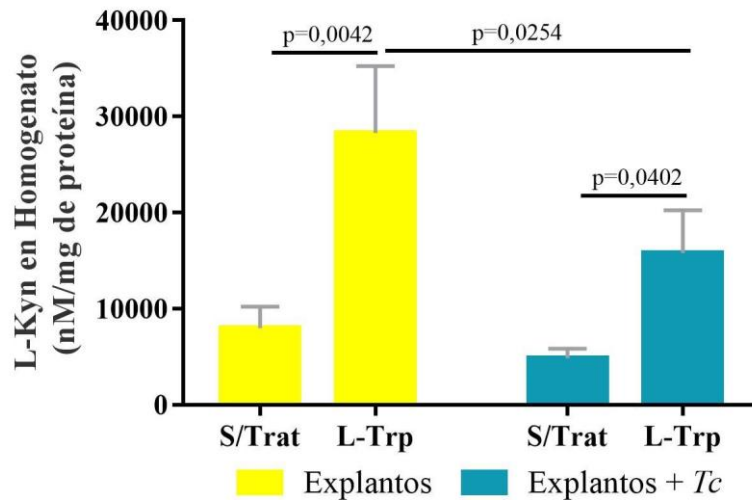


Fig. 23. Efecto de la adición exógena de L-Trp sobre la concentración de Kyn en el homogenato de explantos placentarios infectados o no con *T. cruzi*.

Explantos placentarios infectados o no con *T. cruzi* fueron tratados con L-Trp (200  $\mu$ M), 4 h previas a la infección y durante todo el cultivo, cada 24 h. La concentración de Kyn se determinó en homogenato de explantos placentarios a las 96 h de cultivo. Los resultados se expresan como la concentración de Kyn (nM/mg de tejido). La gráfica representa el valor de la media  $\pm$  EEM de 3 experimentos independientes. El análisis estadístico se realizó mediante un ANOVA de dos vías, con un análisis post test de comparación múltiple Tukey's. Se consideró estadísticamente significativo un valor  $p < 0,05$ . Se indican diferencias significativas entre condición.

En explantos tratados con L-Trp se observó un incremento significativo en la concentración de L-Kyn en sobrenadante tanto de explantos infectados como en los no infectados (Fig. 24). Los resultados no muestran diferencias entre los explantos + *Tc* con respecto a los explantos sin parásitos (explantos). Estos datos indican que el agregado de L-Trp exógeno aporta mayor concentración de L-Kyn en el tejido placentario superando los niveles basales de este metabolito independientemente de la presencia del parásito.

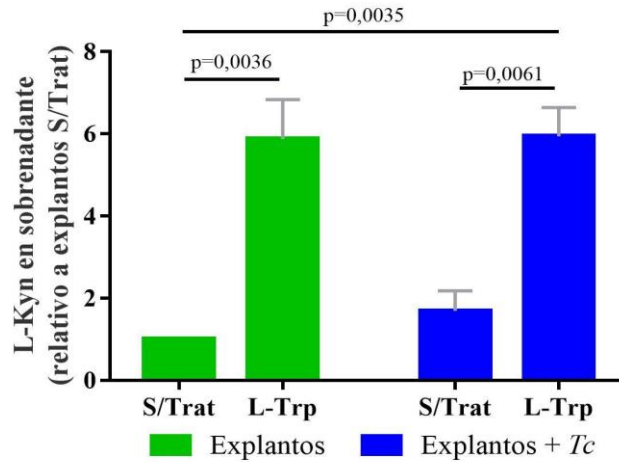


Fig. 24. Efecto de la adición exógena de L-Trp sobre la concentración de Kyn en sobrenadante de cultivo de explantos placentarios infectados o no con *T. cruzi*.

Explantos placentarios fueron tratados con L-Trp (200  $\mu$ M) 4 h previas a la infección y durante todo el cultivo, cada 24 h hasta alcanzar las 96 h. La concentración de Kyn se determinó en sobrenadante de explantos placentarios a las 96 h de cultivo. Los resultados se expresan como la concentración relativa de Kyn en sobrenadante. La concentración relativa de L-Kyn en cada condición se calculó como se indica en Materiales y métodos. La gráfica representa el valor de la media  $\pm$  EEM de 3 experimentos independientes. El análisis estadístico se realizó mediante un ANOVA de dos vías, con un análisis post test de comparación múltiple Tukey's. Se consideró estadísticamente significativo un valor  $p < 0,05$ . Se indican diferencias significativas entre condición.

### Efecto de L-Trp sobre replicación de *T. cruzi* en explantos placentarios

Para evaluar el efecto de la adición exógena de L-Trp sobre la replicación de *T. cruzi* en la carga parasitaria en cultivos tratados con L-Trp (200  $\mu$ M) mediante PCR en tiempo real. 4 h previas a la infección y hasta las 72 h.p.i. (96 h de cultivo). Se observó que los explantos tratados con L-Trp presentaron menor cantidad de ADN lo que marca una disminución significativa con respecto a los explantos no tratados. Estos datos sugieren que la adición de L-Trp exógena colaboró con el control de parásito en el tejido placentario (Fig. 25).

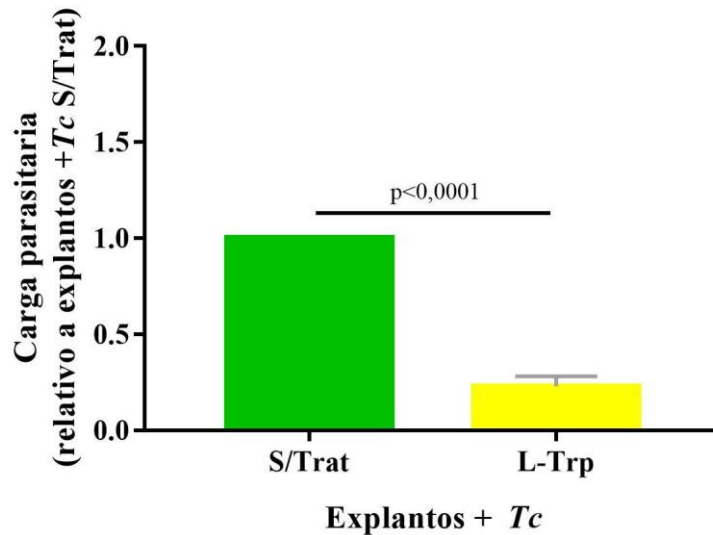


Fig. 25. Cuantificación de carga parasitaria en explantos placentarios tratados con L-Trp.

Explantos infectados con *T. cruzi* fueron tratados 4 h previas a la infección y durante todo el cultivo con L-Trp (200  $\mu$ M) hasta alcanzar 96 h. Mediante PCR cuantitativa en tiempo real se calculó la carga parasitaria. Los resultados expresan la carga parasitaria relativa a los explantos infectados sin L-Trp, calculada como se indica en Materiales y Métodos. La gráfica representa el valor de la media  $\pm$  EEM de 3 experimentos independientes. El análisis estadístico se realizó mediante un t-student. Se consideró estadísticamente significativo un valor  $p < 0,05$ . Se indican diferencias significativas entre condición.

Como se puede observar en la Fig. 26, la exposición a L-Trp no modificó la viabilidad de los explantos placentarios.

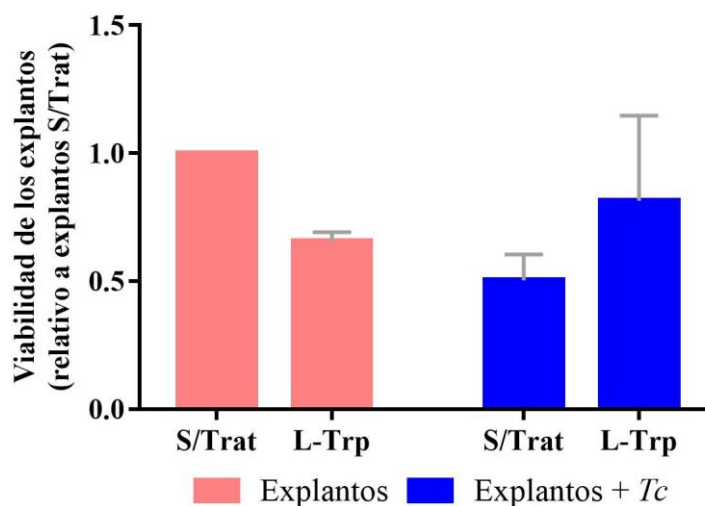


Fig. 26. Efecto de la adición exógena de L-Trp sobre la viabilidad de explantos placentarios.

Explantos placentarios fueron tratados o no con L-Trp (200  $\mu$ M) 4 h previas a la infección y después de la exposición con *T. cruzi*, cada 24 h, hasta alcanzar las 96 h de cultivo. Mediante el ensayo de MTT se evaluó la viabilidad de los explantos placentarios. Los resultados se expresan como viabilidad relativa de los explantos para cada tiempo de cultivo. La viabilidad de los explantos en cada condición se calculó como se indica en Materiales y métodos. La gráfica

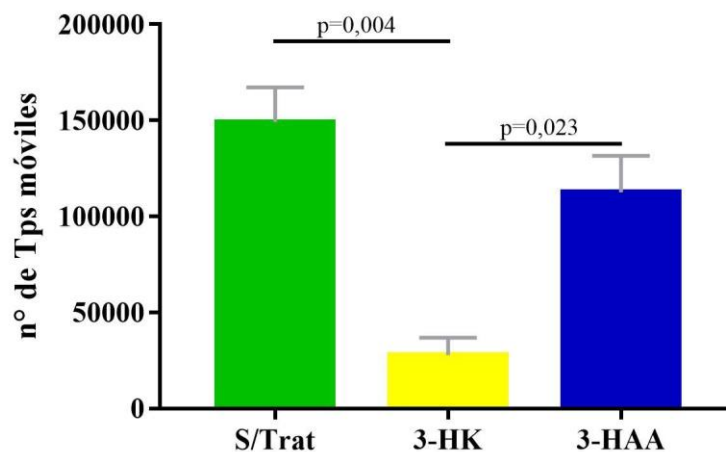


representa el valor de la media  $\pm$  EEM de 3 experimentos independientes. El análisis estadístico se realizó mediante un ANOVA de dos vías, con un análisis post test de comparación múltiple Tukey's. Se consideró estadísticamente significativo un valor  $p < 0,05$ . Se indican diferencias significativas entre condición.

### **Efecto de los metabolitos de la vía de la Kyns en la infección de los explantos placentarios**

Los experimentos previos demostraron que la adición exógena de L-Trp disminuye significativamente la carga parasitaria en explantos infectados con Tps de *T. cruzi*, sugiriendo que la adición exógena de Trp favorece la actividad de IDO y la producción de los metabolitos de Kyn tanto en el sobrenadante como en homogenato placentario. Estas observaciones podrían sugerir que los productos del metabolismo del Trp por IDO conocidos como Kyns podrían tener un efecto sobre la replicación del parásito en los explantos placentarios.

Se evaluó el efecto de 3-HK (20  $\mu$ M) y 3-HAA (20  $\mu$ M) sobre la movilidad de Tps de *T. cruzi*. Se observó que 3-HK ( $27.750 \pm 9.234$ ) disminuyó significativamente la movilidad de Tps comparado con los parásitos tratados con 3-HAA ( $112.500 \pm 19.094$ ),  $p = 0,0234$  y los parásitos sin tratamiento ( $149.000 \pm 18.330$ ) (Fig. 27). Estos datos indican que 3-HK modifica la movilidad del Tps de *T. cruzi*.



*Fig. 27. Efecto de las Kyns sobre la movilidad de Tps de T. cruzi.*

Tps de *T. cruzi* fueron tratados con 3-HK (20  $\mu$ M) o 3-HAA (20  $\mu$ M) durante 2 h. Mediante cámara de Neubauer se realizó el conteo de número de Tps móviles. La gráfica representa el valor de la media  $\pm$  EEM de 3 experimentos independientes. El análisis estadístico se realizó mediante un ANOVA de una vía, con un análisis post test de comparación múltiple Tukey's. Se



consideró estadísticamente significativo un valor  $p < 0,05$ . Se indican diferencias significativas entre condición.

### Efecto de metabolitos de la vía de la Kyns sobre la carga parasitaria en explantos placentarios infectados con *T. cruzi*

Se cuantificó la carga parasitaria por PCR en tiempo real con sondas Taqman a las 96 h de cultivo de explantos infectados con *T. cruzi*, que fueron tratados cada 24 h con 3-HK o 3-HAA. Se determinó que tanto 3-HK ( $642,7 \pm 253,2$  n° de parásitos/ $\mu\text{g}$  de ADN) y 3-HAA ( $826,8 \pm 262,1$  n° de parásitos/ $\mu\text{g}$  de ADN) disminuyó significativamente la carga parasitaria comparada con explantos placentarios infectados sin tratamiento (S/Trat) ( $1.554 \pm 686,2$  n° de parásitos/ $\mu\text{g}$  de ADN). No se observaron diferencias significativas entre los explantos tratados con 3-HK respecto a los explantos tratados con 3-HAA ( $p = 0,1127$ ). Los resultados sugieren que ambos metabolitos de la KP (3-HK y 3-HAA) fueron capaces de controlar la forma intracelular (amastigotes) del parásito en el tejido placentario infectado con *T. cruzi* (Fig. 28).

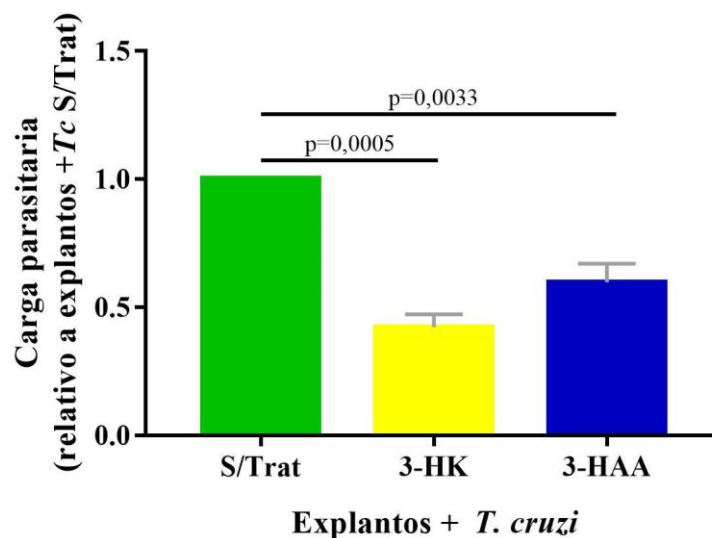
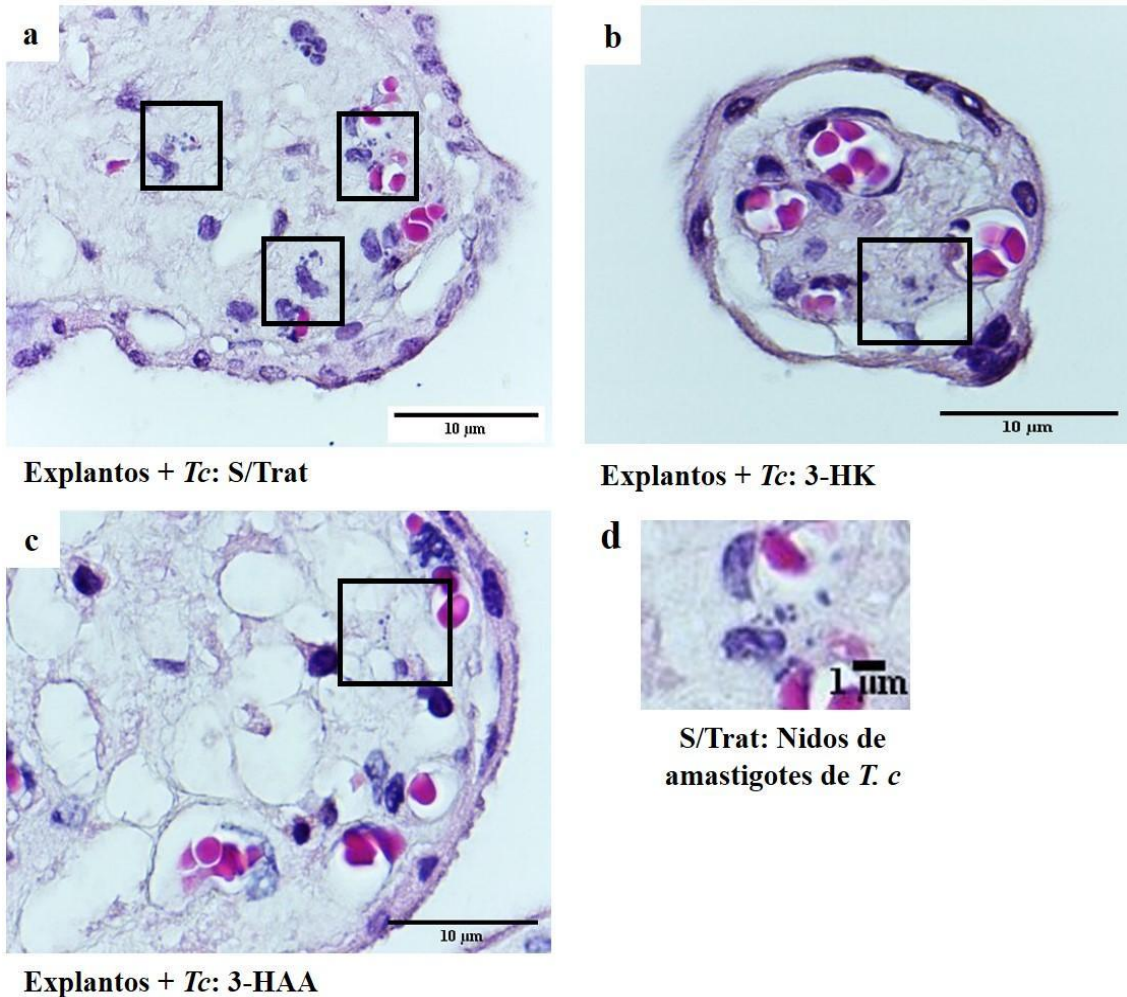


Fig. 28. Cuantificación de carga parasitaria en explantos placentarios tratados con 3-HK o 3-HAA.

Explantos placentarios fueron infectados con *T. cruzi* durante toda la noche. Después del tiempo de infección, a los explantos se les realizó cambio de medio, y se trataron con medio suplementado con 3-HK ( $100 \mu\text{M}$ ) o 3-HAA ( $100 \mu\text{M}$ ) cada 24 h, hasta alcanzar las 96 h. Mediante PCR cuantitativa en tiempo real se calculó la carga parasitaria. Los resultados expresan la carga parasitaria relativa a los explantos infectados no tratados, calculada como se indica en Materiales y Métodos. La gráfica representa el valor de la media  $\pm$  EEM de 3 experimentos independientes. El análisis estadístico se realizó mediante un ANOVA de una vía. Se consideró estadísticamente significativo un valor  $p < 0,05$ . Se indican diferencias significativas entre condición.



A través de cortes teñidos con H/E se corroboró la infección de explantos infectados y tratados con las diferentes Kyns (3-HK y 3-HAA). Se observaron nidos de amastigotes tanto en explantos sin tratamientos, como en los explantos tratados con 3-HK y 3-HAA (Fig. 29).



*Fig. 29. Nidos de amastigotes en explantos infectados con T. cruzi tratados o no con 3-HK o 3-HAA.*

Imágenes representativas de cortes de cultivos de explantos infectados con *T. cruzi* durante toda la noche, y tratados postinfección con 3-HK (100 µM) o 3-HAA (100 µM) hasta alcanzar las 96 h, teñidos con H/E. En los recuadros se pueden observar los nidos de amastigotes en explantos placentarios: **a**) sin tratamiento (S/Trat) (escala 10 µm); **b**) tratados 3-HK (escala 10 µm); **c**) tratados con 3-HAA (escala 10 µm). Magnificación 1000 X. **d**) Imagen de explantos placentarios sin tratamiento con aumento de resolución de píxeles, donde se pueden observar los amastigotes (escala 1 µm).

Se evaluó la viabilidad de los explantos placentarios infectados con *T. cruzi* y tratados cada 24 h.p.i con 3-HK o 3-HAA hasta alcanzar las 96 h de cultivo. La exposición a 3-HK o 3-HK no modificaron la viabilidad de explantos placentarios en



relación a explantos infectados sin tratamiento. Estos resultados demuestran que tanto 3-HK y 3-HAA no dañan la viabilidad del explantos placentarios (Fig. 30).

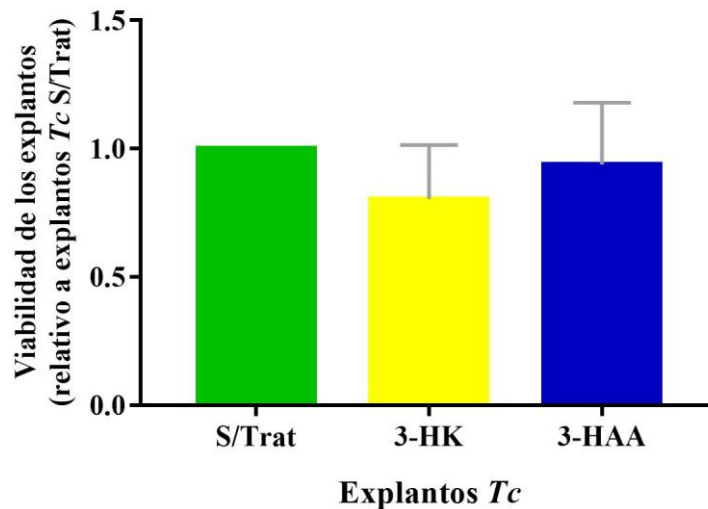


Fig. 30. Efecto de las Kyns sobre la viabilidad de explantos placentarios infectados con *T. cruzi*.

Explantos placentarios fueron infectados con *T. cruzi* cepa Tulahuen durante toda la noche. Después del tiempo de infección, a los explantos se les realizó cambio de medio, y se agregó medio suplementado con 3-HK (100  $\mu$ M) o 3-HAA (100  $\mu$ M) cada 24 h, hasta alcanzar las 96 h de cultivo. Mediante el ensayo de MTT se evaluó la viabilidad de los explantos placentarios. Los resultados se expresan como viabilidad relativa de los explantos para cada tiempo de cultivo. La viabilidad de los explantos en cada condición se calculó como se indica en Materiales y métodos. La gráfica representa el valor de la media  $\pm$  EEM en 3 experimentos independientes. El análisis estadístico se realizó mediante un ANOVA de dos vías, con un análisis post test de comparación múltiple Tukey's. Se consideró estadísticamente significativo un valor  $p < 0,05$ . Se indican diferencias significativas entre condición.

### Conclusiones parciales

- Los resultados obtenidos sugieren que la adición de L-Trp exógena incrementó la actividad de IDO, aumentó la concentración de Kyn tanto en el homogenato de explantos placentarios, así como en el sobrenadante de cultivo, y disminuyó la carga parasitaria en los explantos infectados con *T. cruzi*.
- Uno de los metabolitos de KP, 3-HK tiene efecto deletéreo sobre la forma infectiva, con disminución de la movilidad de Tps de *T. cruzi*.
- Los metabolitos de la KP (3-HK y 3-HAA) controlaron la carga parasitaria en los explantos infectados.





✚ Ni la adición de L-Trp exógena, ni los metabolitos de la KP modificaron la viabilidad de los explantos placentarios.

Estos resultados proporcionan información útil para comprender el papel de IDO y de los metabolitos conocidos como Kyns en el control de la infección con *T. cruzi* en la placenta humana.



#### Objetivo 4. Analizar la expresión proteica de la IDO, AhR e IFN- $\gamma$ en placentas provenientes de mujeres con enfermedad de Chagas

En los objetivos anteriores se estudió el rol del catabolismo del L-Trp en KP *in vitro*. Los datos previos sugieren la importancia de la acción de IDO-KP en el control de la infección por *T. cruzi*. Por ello, en este objetivo se analizó la expresión de IDO, AhR e IFN- $\gamma$  por IHQ en PEC y PC.

#### Expresión de IDO en placentas de mujeres con enfermedad de Chagas.

Se evaluó la localización y expresión de la enzima IDO mediante IHQ en 13 PEC y 8 PC. Tanto en placentas normales como en PEC se observó una marcación positiva para IDO (color marrón) en el endotelio vascular y células del estroma. Mediante un análisis cuantitativo se determinó el % de expresión de IDO entre el área positiva  $\mu\text{m}^2/\text{área total } \mu\text{m}^2$ , se observó una disminución significativa en PEC ( $3,36 \pm 0,52$ ) con respecto a las PC ( $12,51 \pm 2,47$ ),  $p = 0,0002$  (Fig. 31).

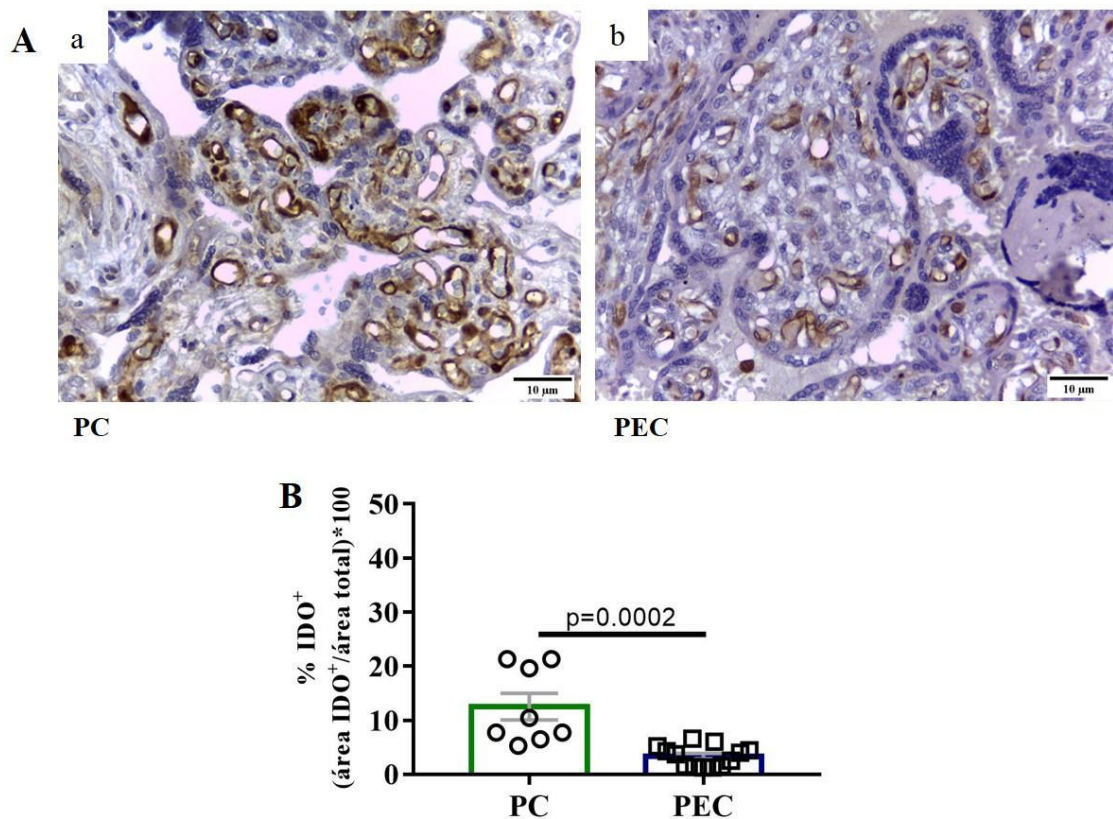


Fig. 31. Localización y expresión de IDO en PEC.



A) Imágenes representativas de IHQ para IDO (color marrón) principalmente en el citoplasma del endotelio vascular, y células de estroma, la tinción fue contrastada con Hematoxilina (núcleos azules): **a)** PC (n = 8), **b)** PEC (n = 13); Magnificación 400 X.

**B)** La gráfica representa el valor de la media  $\pm$  EEM de la cuantificación de la expresión de IDO, representada como el % de expresión de IDO, (área positiva de marcación para IDO  $\mu\text{m}^2$ /Área total de tejido  $\mu\text{m}^2$ ) \* 100. El análisis estadístico se realizó mediante un test t de student entre las PC versus PEC. Se consideró estadísticamente significativo un valor  $p < 0,05$ .

### Localización y expresión de AhR en placentas de mujeres con enfermedad de Chagas

Se evaluó la localización y expresión del factor de transcripción AhR, mediante IHQ, en 15 PEC y 9 PC. Tanto en PC como en PEC se observó una marcación positiva para AhR (color marrón) en el trofoblasto, el endotelio vascular y células del estroma. Se determinó mediante un análisis cuantitativo el % de expresión de AhR entre el área positiva  $\mu\text{m}^2$ /área total  $\mu\text{m}^2$ , donde se observó una disminución significativa en PEC ( $6,71 \pm 0,69$ ) con respecto a las PC ( $23,63 \pm 3,85$ ),  $p < 0,0001$  (Fig. 32).

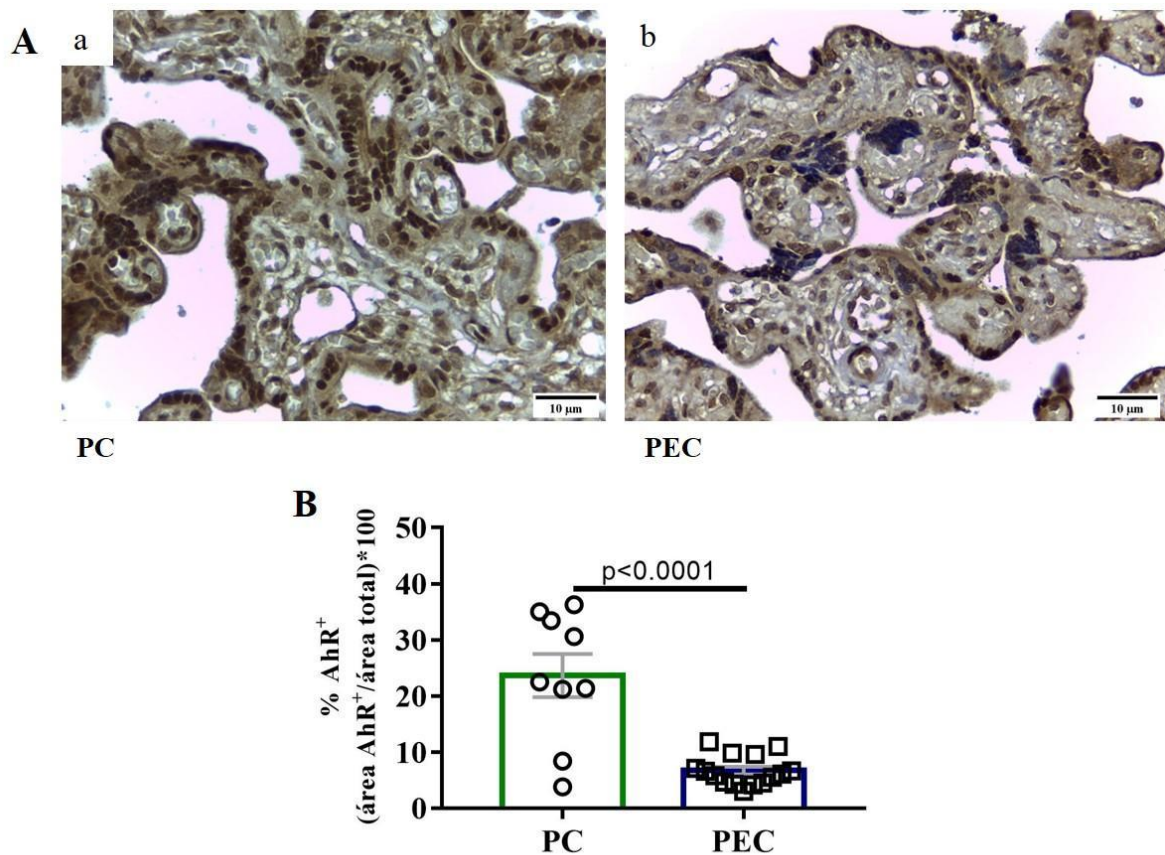


Fig. 32. Localización y expresión de AhR en PEC.



A) Imágenes representativas de IHQ para AhR (color marrón) en el citoplasma de trofoblasto y células de estroma, contrastadas con Hematoxilina (núcleos azules): a) PC (n = 9), b) PEC (n = 15); Magnificación 400 X.

B) La gráfica representa valor de la media  $\pm$  EEM de la cuantificación de la expresión de AhR, representada como % de expresión de AhR, (área positiva de marcación para AhR  $\mu\text{m}^2$ /Área total de tejido  $\mu\text{m}^2$ ) \* 100. El análisis estadístico se realizó mediante un test t de student entre las PC versus PEC. Se consideró estadísticamente significativo un valor  $p < 0,05$ . Se indican diferencias significativas entre condición.

### Localización y expresión de IFN- $\gamma$ en placentas de mujeres con enfermedad de Chagas

Se analizó la localización y expresión de IFN- $\gamma$ , mediante IHQ, en 12 PEC y 10 PC marcadas con IFN- $\gamma$ . Tanto en PC como en PEC se observó una marcación positiva para IFN- $\gamma$  (color marrón) en el trofoblasto. Se determinó mediante un análisis cuantitativo el % de expresión de IFN- $\gamma$  entre el área positiva  $\mu\text{m}^2$ /área total  $\mu\text{m}^2$ , donde se observó una disminución significativa en PEC ( $1,86 \pm 0,10$ ) con respecto a las PC ( $4,41 \pm 0,47$ ),  $p < 0,0001$  (Fig. 33).

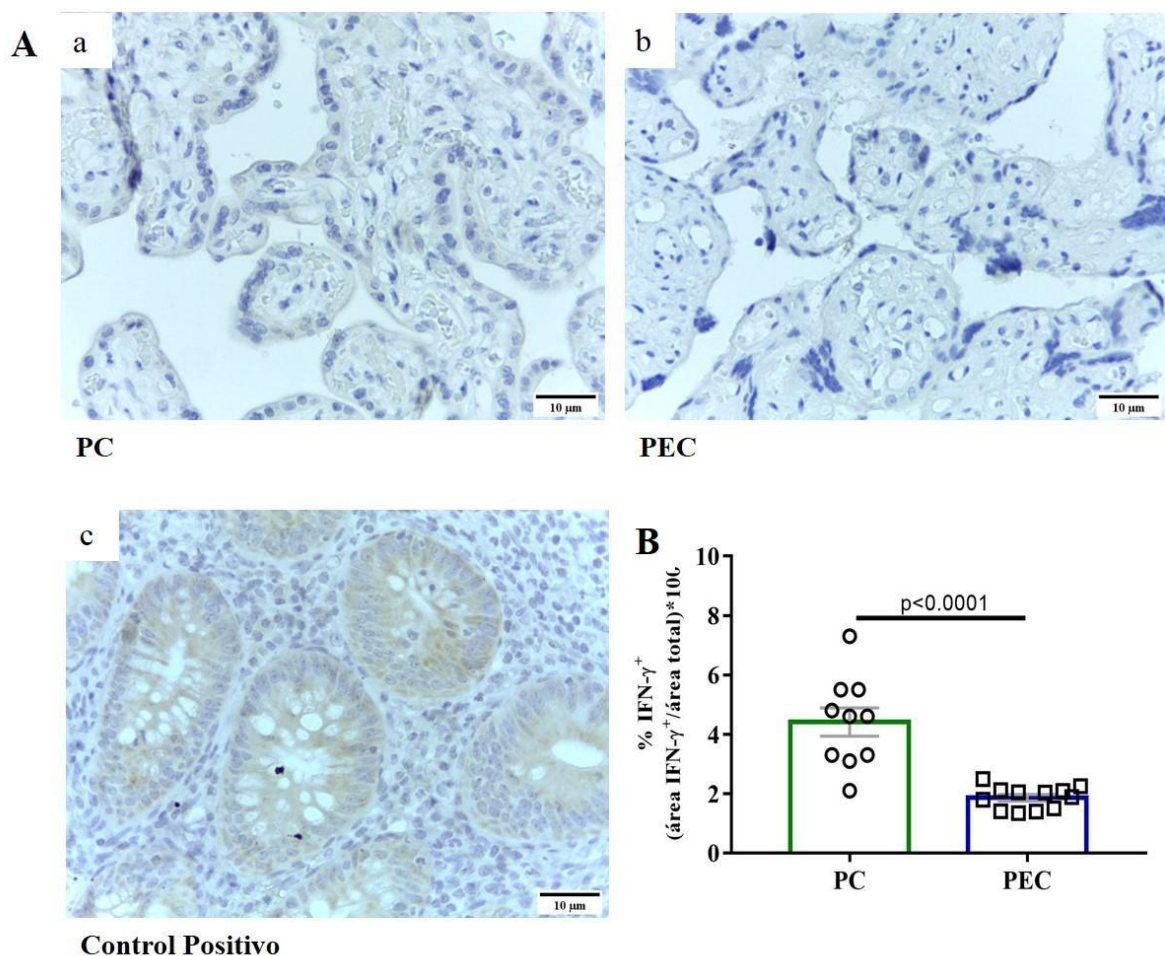


Fig. 33. Localización y expresión de IFN- $\gamma$  en PEC.



**A)** Imágenes representativas de IHQ para IFN- $\gamma$  (color marrón) en el citoplasma del trofoblasto y células del estroma, contrastadas con Hematoxilina (núcleos azules): **a)** PC (n = 10), **b)** PEC (n = 12); **c)** Yeyuno (control positivo de técnica). Magnificación 400 X.

**B)** La gráfica representa valor de la media  $\pm$  EEM de la cuantificación de la expresión de IFN- $\gamma$ , representada como el % de expresión de IFN- $\gamma$ , (área positiva de marcación para IFN- $\gamma$   $\mu\text{m}^2$ /Área total de tejido  $\mu\text{m}^2$ ) \* 100. El análisis estadístico se realizó mediante un test t de student entre las PC versus PEC. Se consideró estadísticamente significativo un valor  $p < 0,05$ . Se indican diferencias significativas entre condición.

### **Conclusiones parciales**

En placentas a término de mujeres con enfermedad de Chagas disminuyó la expresión de IDO, AhR e IFN- $\gamma$  comparado con las placentas controles. Estos resultados indican que la presencia del parásito *in vivo* modifica la expresión de proteínas importantes para la formación de metabolitos de la vía catabólica del Trp, los cuales podrían controlar la replicación del parásito como se pudo demostrar en esta tesis en un modelo de infección de explantos placentarios.



## DISCUSIÓN

La transmisión congénita de la enfermedad de Chagas representa un significativo problema de salud pública tanto en América latina como en el resto del mundo (Messenger and Miles, 2015; Telleria and Tibayrenc, 2017; Pérez-Molina and Molina, 2018) e incluso en lugares no endémicos y en ambientes urbanos de lugares endémicos (WHO, 2007). La transmisión congénita se produce cuando el parásito alcanza al feto a través de la barrera placentaria (Bittencourt, 1976; Carlier, 2005). Los antecedentes indican que la placenta actúa como una barrera para numerosos microorganismos incluido *T. cruzi* (Díaz-Luján *et al.*, 2004), que la incidencia de la transmisión congénita es baja (3,9 a 5,6 %) (Pérez-Molina and Molina, 2018) y que el hallazgo de parásitos en la placenta de madres con enfermedad de Chagas no implica la transmisión al hijo (Moretti *et al.*, 2005), por ello es necesario un análisis en mayor profundidad acerca de los mecanismos implicados en la invasión transplacentaria por este parásito, ya que los conocimientos sobre los mecanismos celulares y moleculares de la infección transplacentaria son aún insuficientes (Carlier and Truyens, 2015).

Ha sido descrito que en la interfase materno fetal los aminoácidos cumplen un importante papel debido a los requerimientos de la madre y el feto para cumplir la demanda de la síntesis proteica materna y fetal tanto para su crecimiento como para su desarrollo (Badawy, 2015). Uno de estos aminoácidos es el Trp que cumple un rol esencial en la tolerancia inmunológica para evitar el rechazo del feto (Munn *et al.*, 1998) así como para permitir el correcto desarrollo gestacional (Kudo, 2013; Badawy, 2014). Por otro lado, su vía catabólica participa en el control de la replicación de patógenos intracelulares como el *T. cruzi* y el *T. gondii* entre otros en otros modelos celulares como macrófagos y fibroblastos (Heseler *et al.*, 2008; Schmidt *et al.*, 2009; Knubel *et al.*, 2010, 2011; Schmidt *et al.*, 2012; Stahl *et al.*, 2014; Badawy and Bano, 2016).

No hay antecedentes referidos a la participación de la vía catabólica del L-Trp en la unidad feto placentaria en embarazadas con la enfermedad de Chagas, por lo que en esta tesis, se estudió la participación de la vía catabólica del L-Trp en el control de la replicación del parásito en un modelo de explantos placentarios cultivados con *T. cruzi*, así como en PEC y PC (*in vivo*). En nuestro modelo de infección *in vitro*, la relación entre el tejido y el parásito se asemeja a una infección mediana con baja circulación de parásitos en la madre con enfermedad de Chagas (Fretes and Kemmerling, 2012).



Diversos estudios han mostrado que este modelo permite reproducir una infección *in vivo* y estudiar cambios celulares e infectividad, convirtiéndolo en un modelo factible para poder estudiar la infección en el tejido placentario y los mecanismos antiparasitarios e inmunoreguladores locales (Fretes and Fabro, 1990; Mezzano *et al.*, 2012; Díaz-Luján *et al.*, 2016; Droguett *et al.*, 2017; Castillo *et al.*, 2018; Triquell *et al.*, 2018).

En esta tesis se demostró que la viabilidad de los explantos placentarios no se modificó en los distintos modelos empleados descartando pérdida de la misma generada por la presencia del parásito, el tiempo de cultivo y el tratamiento de los explantos con los metabolitos de la KP. El hecho que no se observa pérdida demuestra que la concentración de parásito empleada (100.000/ml) y las concentraciones de los metabolitos no fueron tóxicas para los explantos placentarios. Un punto de interés es que se ha demostrado que la presencia del *T. cruzi* en el tejido placentario induce una respuesta inmune innata que está mediada por la interacción del parásito con el tejido, la cual estimula la producción de citoquinas tanto de un perfil proinflamatorio como antiinflamatorio (Castillo *et al.*, 2017). Este mecanismo puede ser una consecuencia homeostática del sistema inmune materno para el control de la infección por este patógeno. En explantos placentarios la infección por este parásito se ha observado que produce alteraciones estructurales y morfológicas como desprendimiento y destrucción del trofoblasto (Duaso *et al.*, 2010), desorganización selectiva de la lámina basal, destrucción del colágeno tipo I y apoptosis (Duaso *et al.*, 2011). Como resultado de estas alteraciones el parásito invade las vellosidades coriónicas causando un exacerbado crecimiento del parásito (Díaz-Luján *et al.*, 2016). Trabajos recientes de nuestro laboratorio indican que estas alteraciones se deben a alta cantidad de parásitos que promueven un aumento del estrés oxidativo-nitrosativo, ya que con carga de parasitaria baja–mediana no se observó alteraciones estructurales ni funcionales significativas del explanto placentario (Triquell *et al.* 2018).

Los resultados presentados en esta tesis muestran que la infección con *T. cruzi* no modificó la actividad específica de IDO en homogenatos de explantos placentarios infectados en relación a los explantos no infectados respecto a cada tiempo de cultivo, indicando que este efecto podría ser una respuesta específica del tejido placentario no observada en los macrófagos y otras células del sistema inmunitario (Huttunen *et al.*,



2010; Knubel *et al.*, 2010; Poormasjedi-Meibod *et al.*, 2013). O podría ser efecto de la presencia de otras moléculas como ON y L-Arg producidas por macrófagos las cuales modulan la actividad de la enzima (Thomas and Stocker, 1999; Hucke *et al.*, 2004; Samelson-Jones and Yeh, 2006; Lancellotti, Novarese and Cristofaro, 2011; Badawy, 2017).

En nuestro modelo se observaron incrementos significativos en las concentraciones de Kyn en el sobrenadante de explantos infectados con *T. cruzi* a lo largo de las horas de cultivo, es decir que a las 96 h de cultivo se observaron altos niveles de Kyn. Se ha demostrado que la Kyn y 3-HK son capaces de activar el factor de transcripción AhR presente en el trofoblasto placentario (Jiang *et al.*, 2010; Mezrich *et al.*, 2010; Wakx *et al.*, 2018), esta activación conduce a la generación de células Treg, por otro lado la activación de CDs por ligandos de TLR4 o TLR9 inducidos por la interacción del parásito en el tejido placentario (Castillo *et al.*, 2017) estimulan la expresión del AhR, a la vez la presencia de este receptor es necesaria para la inducción de la producción de Kyn (Nguyen *et al.*, 2010). En nuestros experimentos se observó aumento de la expresión de AhR en explantos placentarios infectados a lo largo de las horas de cultivo (datos no mostrados) asociados a cambios en las concentraciones de Kyn, indicando que la expresión de AhR en el tejido placentario depende de las Kyns.

La participación deIDO en el curso de una infección por *T. cruzi* resulta difícil de predecir debido al rol de esta enzima en la inducción de tolerancia inmunológica y de su efecto antimicrobiano durante el embarazo y en placentas específicamente (Däubener *et al.*, 2009; Schmidt *et al.*, 2009; Badawy, 2015). En esta tesis se demostró que la inhibición de la actividad deIDO con L-1MT incrementó la carga parasitaria en explantos placentarios. Evidencias experimentales muestran que la inhibición de la actividad deIDO con 1-MT en la infección de macrófagos con *T. cruzi* exacerbaban el crecimiento del parásito (Knubel *et al.*, 2010), así como en ratones infectados con *Candida albicans* exacerbó en gran medida la infección y la patología inflamatoria asociada como resultado de respuestas inmunes innatas y adaptativas (Bozza *et al.*, 2005) y en *C. trachomatis* permitió la diferenciación secundaria del patógeno, aunque con una multiplicación limitada de la bacteria (Ibana *et al.*, 2011). Igualmente la adición de 1-L-MT anuló el efecto antimicrobiano mediado por la enzima y permitió el





crecimiento de los microorganismos triptófano-auxótrofos como son *Staphylococcus aureus* y *Toxoplasma gondii* en células HeLa (Schmidt *et al.*, 2012).

Por otro lado, demostramos que IFN- $\gamma$  induce la actividad de IDO e incrementó los niveles de Kyn, pero no controló la replicación del parásito. Sugiriendo que la actividad basal de la enzima en el tejido placentario es alta en el tercer trimestre y que pudiera ser suficiente para controlar la infección, ya que se observó una disminución significativa del crecimiento del parásito en los explantos infectados expuestos a IFN- $\gamma$  en relación a los tratados con el L-1MT. En datos obtenidos en las PEC con disminución de IDO podría tener un efecto semejante al observado en nuestros experimentos con tratamientos de inhibidor de IDO, que puede favorecer la infección del tejido placentario.

Por otro lado se demostró que la incorporación exógena de L-Trp incrementó la actividad de IDO y de concentraciones de Kyn, además colaboró con el control de la replicación del parásito en los explantos placentarios. Una de las posibles hipótesis alternativa es que los productos metabólicos generados por la inducción de IDO por el Trp estarían restringiendo el crecimiento del parásito en el tejido placentario ya que se observó incremento de los niveles Kyn tanto en el homogenato de los explantos placentarios como en el sobrenadante de cultivos. Evidencias experimentales han reportado que los catabolitos del Trp ejercen actividad antimicrobiana, por lo que estos datos sugieren que Kyns productos del catabolismo del Trp mediado por la actividad de esta enzima estarían participando en el control de la infección con *T. cruzi* en la placenta humana. Diferentes evidencias experimentales han reportado que microorganismos como *Chlamydia pneumoniae* y *T. gondii* (Silva *et al.*, 2002) fueron sensibles a las concentraciones de Kyn por la actividad de IDO (Gupta *et al.*, 1994; Adams *et al.*, 2004). Sin embargo, en otros modelos experimentales se ha mostrado que la adición exógena de Trp favoreció la replicación de *T. cruzi* (Knubel *et al.*, 2010).

En esta tesis se demostró que 3-HK y 3-HAA son los principales metabolitos de la KP que podrían estar controlando la replicación del *T. cruzi* en la placenta humana. Estos hallazgos coinciden con un estudio en ratones infectados con *T. cruzi* en el cual se observó una reducción de parasitemia y sobrevida de los animales tratados con 3-HK con efecto tanto en su estadio de amastigote como tripomastigote (Knubel *et al.*, 2010),



este efecto se debe a que 3-HK y 3-HAA tienen propiedades citotóxicas (Okuda *et al.*, 2002) favoreciendo el control del parásito. Por otro lado, observamos que 3-HK tiene un efecto directo sobre el *T. cruzi* con disminución del número de parásitos móviles en nuestros experimentos. De acuerdo a Knubel *et al.* (2010) este efecto puede deberse a cambios morfológicos en la célula parasitaria afectando la movilidad del *T. cruzi* (Knubel *et al.*, 2010). Por otro lado también se ha demostrado que 3-HK disminuyó significativamente el crecimiento de *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina, *Staphylococcus epidermidis*, *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa* resistente a múltiples drogas (Narui *et al.*, 2009), *Listeria monocytogenes* (Niño-Castro *et al.*, 2014), sin embargo, este efecto no se observó totalmente con *Streptococcus pyogenes* (Niño-Castro *et al.*, 2014). Se ha descrito que el tratamiento con 3-HK en ratones infectados con *T. cruzi* modula el desarrollo de la respuesta inmune, ya que suprimió la respuesta celular tipo Th1 y Th2 promoviendo el desarrollo de células secretoras de TGF- $\beta$  durante la fase aguda de la infección (Knubel *et al.*, 2011), así mismo se ha descrito que TGF- $\beta$  potencia la activación de células Th1 efectoras y promueve su propia regulación vía IL-10 (Knubel *et al.*, 2011). Se ha demostrado que TGF- $\beta$  contribuye con la replicación del *T. cruzi* (Silva, Twardzik and Reed, 1991; Cuna *et al.*, 2009), por otro lado, se ha demostrado una fuerte asociación entre los niveles de IFN- $\gamma$  y TGF- $\beta$ , por lo que en CD el TGF- $\beta$  activa la vía tolerogénica del catabolismo del Trp mediado por la actividad deIDO resultando en un incremento de Kyns (Belladonna *et al.*, 2009).

Los resultados presentados en los modelos *in vitro* se demostró la importancia de la actividad deIDO para restringir el crecimiento del parásito, sin embargo, en placentas de mujeres con enfermedad de Chagas se observó una inhibición en la expresión de la enzima. Durante la enfermedad de Chagas la placenta ejerce funciones de un órgano modulador del sistema inmune, el cual desempeña un papel fundamental para determinar el curso de la infección. Por un lado la interacción del parásito con el trofoblasto estaría limitando la infección al ser reconocido por los PRR como los TLR-2, TLR-4 y TLR-9 (Castillo *et al.*, 2017), el reconocimiento de los componentes derivados del *T. cruzi* por estos receptores involucra mecanismos de defensa de la respuesta inmune innata de iNOS en los macrófagos para el control de la replicación del parásito (Shoda *et al.*, 2001). Sin embargo, hay muchos patógenos que han evolucionado desarrollando mecanismos que les permite asegurar la sobrevivencia por largos periodos de tiempo lo que depende de una delicada asociación de placenta para la generación de



mecanismos complejos para que la infección pueda perpetuarse crónicamente. Una posible hipótesis sería que el parásito podría estar dando el estímulo para una reacción inflamatoria, sobretodo en la fase aguda de la infección (Tarleton, 2003) y provocando una reacción inmune innata en la embarazada que podría causar un efecto negativo al tratar de eliminar al parásito, provocando daños en la barrera placentaria. Esto podría favorecer la infección y/o causar alteraciones en el embarazo y desarrollo fetal. Esto podría favorecer la infección de las vellosidades por una brecha en la barrera placentaria, junto a otros factores que podrían estar participando. Son pocos los patógenos capaces de producir la infección transplacentaria y un creciente cuerpo de evidencias sugieren que la estructura única del STB (capa continua de trofoblasto multinucleado fusionado), en contacto con la sangre materna, facilita la función protectora de la placenta (Robbins and Bakardjiev, 2012).

En esta tesis se observó una disminución de IFN- $\gamma$ , así mismo otros estudios realizados en PEC, demostraron que la infección congénita por *T. cruzi* fue asociada con una baja producción de IFN- $\gamma$  (Mayer *et al.*, 2010; Volta *et al.*, 2016) mientras que otros autores ha reportado un incremento de esta citoquina que estaría favoreciendo el control del parásito en el tejido placentario (Cuna *et al.*, 2009). Por otro lado, la inmunidad materna puede ser un factor limitante para la transmisión y el desarrollo de la infección en el feto y el neonato. La expresión deIDO es inducida por varios mediadores inflamatorios, incluido el IFN- $\gamma$  (Mellor and Munn, 2001), lo que resulta en una disminución de las concentraciones sanguíneas de Trp y en un aumento de las concentraciones sanguíneas de los metabolitos de la vía de Kyn (Mellor and Munn, 2001). Si bien la activación de la respuesta inmune innata en la mujer embarazada puede contribuir a limitar la ocurrencia y la severidad de la infección congénita, se requiere la generación de una controlada respuesta inmune que reconozca y elimine el parásito para que conjuntamente limite el daño a la placenta. La ocurrencia de cambios en el balance Th1/Th2 en la interfase materno fetal favoreciendo un perfil de tipo Th1, que se pueden dar durante una infección y puede conducir a consecuencias adversas en el embarazo incluyendo abortos recurrentes (Niederhorn, 2006).

Los datos obtenidos en esta tesis indican que la barrera placentaria y la vía catabólica del Trp participan controlando la infección placentaria por generación de metabolitos de la KP, las cuales pueden actuar en forma directa sobre el *T. cruzi*, y en



concentraciones fisiológicas encontradas en la placenta humana. Los resultados obtenidos nos podrían ayudar a comprender mejor cómo la placenta estaría controlando la infección por *T. cruzi* y de esta manera, colaborar en la prevención de la transmisión congénita de Chagas. No obstante, no se puede descartar que otros factores tales como condiciones nutricionales, inmunológicas, económicas y culturales de las madres chagásicas también juegan un rol muy importante en la transmisión congénita de la enfermedad de Chagas.

Con los resultados presentados en esta tesis se puede concluir que:

- ✚ A ningún tiempo de cultivo la infección con *T. cruzi* modificó la actividad de IDO en explantos infectados respecto a no infectados.
- ✚ La inhibición de la actividad de IDO con L-1MT incrementó la carga parasitaria en explantos placentarios.
- ✚ La adición de L-Trp exógena no promueve la replicación del parásito, pero sí incrementó la actividad de IDO y colaboró con el control de la replicación del parásito.
- ✚ 3-HK y 3-HAA son los principales metabolitos del Trp que podrían estar controlando la replicación del *T. cruzi* en la placenta humana.
- ✚ La placenta humana tiene una gran expresión y actividad de IDO en el tercer trimestre, sin embargo, la expresión de esta enzima disminuye en un proceso infeccioso con *T. cruzi*.



## BIBLIOGRAFÍA

- Adams, O. *et al.* (2004) 'Role of Indoleamine-2, 3-Dioxygenase in Alpha / Beta and Gamma Interferon-Mediated Antiviral Effects against Herpes Simplex Virus Infections', *Society*, 78(5), pp. 2632–2636. doi: 10.1128/JVI.78.5.2632.
- Andrade, S. G. (1982) 'The influence of the strain of Trypanosomi cruzi in mice', *Royal Society of Tropical Medicine and Higenie*, Vol. 76(No. 1), pp. 123–128.
- Austin, C. J. D. *et al.* (2010) 'Biochemical characteristics and inhibitor selectivity of mouse indoleamine 2,3-dioxygenase-2', *Amino Acids*, 39(2), pp. 565–578. doi: 10.1007/s00726-010-0475-9.
- Baba, T. *et al.* (2005) 'Intrinsic Function of the Aryl Hydrocarbon (Dioxin) Receptor as a Key Factor in Female Reproduction', *Molecular and Cellular Biology*, 25(22), pp. 10040–10051. doi: 10.1128/MCB.25.22.10040-10051.2005.
- Badawy, A. a-B. (2014) 'The tryptophan utilization concept in pregnancy', *Obstetrics & Gynecology Science*, 57(4), p. 249. doi: 10.5468/ogs.2014.57.4.249.
- Badawy, A. A.-B. (2015) 'Tryptophan metabolism, disposition and utilization in pregnancy', *Bioscience Reports*, 35(5), pp. e00261–e00261. doi: 10.1042/BSR20150197.
- Badawy, A. A. B. and Bano, S. (2016) 'Tryptophan metabolism in rat liver after administration of tryptophan, kynurenine metabolites, and kynureninase inhibitors', *International Journal of Tryptophan Research*, 9(1), pp. 51–65. doi: 10.4137/IJTR.S38190.
- Basso, B. (2013) 'Modulation of immune response in experimental Chagas disease', *World J Exp Med*, 3(February 20), pp. 1–10. doi: 10.5493/wjem.v3.i1.World.
- Belladonna, M. L. *et al.* (2009) 'TGF- b and kynurenines as the key to infectious tolerance', (January), pp. 41–49. doi: 10.1016/j.molmed.2008.11.006.
- Benirschke, K., Kaufmann, P. and Baergen, R. (2011) *Pathology of the Human Placenta*. Fifth Edit. Edited by Springer. doi: 10.1360/zd-2013-43-6-1064.
- Bittencourt, A. L. *et al.* (1988) 'Bittencourt 1988 Leite Materno.Pdf', *Men. Inst. Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro*, 83(1), pp. 37–39.
- Bittencourt, A. L. (1992) 'Possible risk factors for vertical transmission of chagas' disease', *Rev Inst Med Trop. San Pablo*, 34(5), pp. 403–408.
- Bittencourt, A. L. A. (1976) 'Congenital Chagas Disease', *Am J Dis Child*, 130, pp. 97–130.
- Blaschitz, A. *et al.* (2011) 'Vascular Endothelial Expression of Indoleamine 2, 3-



- Dioxygenase 1 Forms a Positive Gradient towards the Feto-Maternal Interface', *PloS one*, 6(7), pp. 1–12. doi: 10.1371/journal.pone.0021774.
- Bozza, S. *et al.* (2005) 'A Crucial Role for Tryptophan Catabolism at the Host/*Candida albicans* Interface', *The Journal of Immunology*, 174(5), pp. 2910–2918. doi: 10.4049/jimmunol.174.5.2910.
- Britto, C. *et al.* (1995) 'Trypanosoma cruzi: Parasite Detection and Strain Discrimination in Chronic Chagasic Patients from Northeastern Brazil Using PCR Amplification of Kinetoplast DNA and Nonradioactive Hybridization', *Experimental parasitology*, 81, pp. 462–471.
- Cady, S. G. and Sono, M. (1991) '1-methyl-dl-tryptophan,  $\beta$ -(3-benzofuranyl)-dl-alanine (the oxygen analog of tryptophan), and  $\beta$ -[3-benzo(b)thienyl]-dl-alanine (the sulfur analog of tryptophan) are competitive inhibitors for indoleamine 2,3-dioxygenase', *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 291(2), pp. 326–333. doi: 10.1016/0003-9861(91)90142-6.
- Carlier, Y. (2005) 'Factores y mecanismos transmision congenita.pdf', *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, Vol: 38 Su(Suplemento II), pp. 105–107.
- Carlier, Y. *et al.* (2012) 'Congenital parasitic infections: A review', *Acta Tropica*, 121(2), pp. 55–70. doi: 10.1016/j.actatropica.2011.10.018.
- Carlier, Y. *et al.* (2015) 'Congenital Chagas disease: an update', *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, 110(3), pp. 1–6. doi: 10.1590/0074-02760140405.
- Carlier, Y. and Truyens, C. (2010) 'Maternal-Fetal Transmission of *Trypanosoma cruzi*', in *American Trypanosomiasis Chagas Disease*. Elsevier Inc., pp. 539–581. doi: 10.1016/B978-0-12-384876-5.00022-8.
- Carlier, Y. and Truyens, C. (2015) 'Congenital Chagas disease as an ecological model of interactions between *Trypanosoma cruzi* parasites, pregnant women, placenta and fetuses', *Acta Tropica*. Elsevier B.V., 151(1), pp. 103–115. doi: 10.1016/j.actatropica.2015.07.016.
- Castillo, C. *et al.* (2012) 'Role of matrix metalloproteinases 2 and 9 in ex vivo *Trypanosoma cruzi* infection of human placental chorionic villi.', *Placenta*. Elsevier Ltd, 33(12), pp. 991–7. doi: 10.1016/j.placenta.2012.10.004.
- Castillo, C. *et al.* (2017) 'Toll-like receptor-2 mediates local innate immune response against *Trypanosoma cruzi* in ex vivo infected human placental chorionic villi explants', *Placenta*, 60, pp. 40–46. doi: 10.1016/j.placenta.2017.10.005.



- Castillo, C. *et al.* (2018) 'Host-parasite interaction: Changes in human placental gene expression induced by *Trypanosoma cruzi*', *Parasites and Vectors*. Parasites & Vectors, 11(1), pp. 1–13. doi: 10.1186/s13071-018-2988-0.
- Cella, M. and Colonna, M. (2015) 'Aryl hydrocarbon receptor: Linking environment to immunity', *Seminars in Immunology*. Elsevier Ltd, 27(5), pp. 310–314. doi: 10.1016/j.smim.2015.10.002.
- Cuna, W. R. *et al.* (2009) 'Pro-Inflammatory Cytokine Production in Chagasic Mothers and Their Uninfected Newborns', *Journal of Parasitology*, 95(4), pp. 891–894. doi: 10.1645/GE-1927.1.
- Däubener, W. *et al.* (2009) 'Antimicrobial and immunoregulatory effector mechanisms in human endothelial cells Indoleamine 2,3-dioxygenase versus inducible nitric oxide synthase', *Thrombosis and Haemostasis*, 102(6), pp. 1110–1116. doi: 10.1160/TH09-04-0250.
- Delgado, M. and Santos-Buch, C. (1978) 'Transplacental transmission and fetal parasitosis of *Trypanosoma cruzi* in outbred white Swiss mice', *Am J trop Med Hyg*, 27, pp. 1108–1115.
- Díaz-Luján, C. *et al.* (2004) 'Trypanosoma cruzi: productive infection is not allowed by chorionic villous explant from normal human placenta in vitro.', *Experimental parasitology*, 108(3–4), pp. 176–81. doi: 10.1016/j.exppara.2004.07.013.
- Díaz-Luján, C. *et al.* (2012) 'Placental Infection by Trypanosome Cruzi, the Causal Agent of Congenital Chagas Disease', in *Recent Advances in Research on the Human Placenta*. 1st edn. Croacia, pp. 127–148.
- Díaz-Luján, C. *et al.* (2016) 'Role of placental barrier integrity in infection by *Trypanosoma cruzi*', *Acta Tropica*. Elsevier B.V., 164, pp. 360–368. doi: 10.1016/j.actatropica.2016.09.021.
- Droguett, D. *et al.* (2017) '*Trypanosoma cruzi* induces cellular proliferation in the trophoblastic cell line BeWo', *Experimental Parasitology*, 173, pp. 9–17. doi: 10.1016/j.exppara.2016.12.005.
- Duaso, J. *et al.* (2010) '*Trypanosoma cruzi* induces tissue disorganization and destruction of chorionic villi in an ex vivo infection model of human placenta.', *Placenta*. Elsevier Ltd, 31(8), pp. 705–11. doi: 10.1016/j.placenta.2010.05.007.
- Duaso, J. *et al.* (2011) '*Trypanosoma cruzi* induces apoptosis in ex vivo infected human chorionic villi.', *Placenta*. Elsevier Ltd, 32(5), pp. 356–61. doi: 10.1016/j.placenta.2011.02.005.



- Duffy, T. *et al.* (2013) 'Analytical performance of a multiplex Real-Time PCR assay using TaqMan probes for quantification of *Trypanosoma cruzi* satellite DNA in blood samples.', *PLoS neglected tropical diseases*, 7(1), p. e2000. doi: 10.1371/journal.pntd.0002000.
- FAO/WHO (2007) *Expert Consultation on Protein and Amino Acid Requirements in Human Nutrition (2002: Geneva, Switzerland)*, WHO technical report series. doi: ISBN 92 4 120935 6.
- Frank, F. *et al.* (2000) 'The effect of placental subfractions on *Trypanosoma cruzi*.' , *Experimental and molecular pathology*, 69(2), pp. 144–51. doi: 10.1006/exmp.2000.2312.
- Frete, E. and Fabro, S. de. (1990) 'Trypanosoma cruzi: modification of alkaline phosphatase activity induced by trypomastigotes in cultured human placental villi', *Rev Inst Med Trop*, 32, pp. 403–409.
- Frete, R. E. and Kemmerling, U. (2012) 'Mechanism of *Trypanosoma cruzi* Placenta Invasion and Infection: The Use of Human Chorionic Villi Explants', *Journal of Tropical Medicine*, 2012, pp. 1–7. doi: 10.1155/2012/614820.
- Frete, R. and Fabro, S. (1995) 'In vivo in vitro analysis of lysosomes and acid phosphatase activity in human chagasic placentas', *Exp Mol Pathol*, 63, p. 153–160.
- Frumento, G. *et al.* (2002) 'Tryptophan-derived Catabolites Are Responsible for Inhibition of T and Natural Killer Cell Proliferation Induced by Indoleamine 2,3-Dioxygenase', *Journal of Experimental Medicine*, 196(4), pp. 459–468. doi: 10.1084/jem.20020121.
- Fujigaki, H. *et al.* (2006) 'The Signal Transducer and Activator of Transcription 1 $\alpha$  and Interferon Regulatory Factor 1 Are Not Essential for the Induction of Indoleamine 2,3-Dioxygenase by Lipopolysaccharide: Involvement of p38 Mitogen-Activated Protein Kinase and Nuclear Factor- $\kappa$ B ', *The Journal of Biochemistry*, 139(4), pp. 655–662. doi: 10.1093/jb/mvj072.
- Gupta, S. L. *et al.* (1994) 'Antiparasitic and antiproliferative effects of indoleamine 2,3-dioxygenase enzyme expression in human fibroblasts.' , *Infection and immunity*, 62(6), pp. 2277–2284. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=186508&tool=pmc-entrez&rendertype=abstract>.
- Gürtler, R. E. (2009) 'Sustainability of vector control strategies in the Gran Chaco





- Region: current challenges and possible approaches', *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 104(suppl 1), pp. 52–59. doi: 10.1590/S0074-02762009000900009.
- Gürtler, R. E., Segura, E. L. and Cohen, J. E. (2003) 'Congenital transmission of *Trypanosoma cruzi* infection in Argentina.', *Emerging infectious diseases*, 9(1), pp. 29–32. doi: 10.3201/eid0901.020274.
- Guyot, E. *et al.* (2013) 'The AhR twist: Ligand-dependent AhR signaling and pharmacotoxicological implications', *Drug Discovery Today*. Elsevier Ltd, 18(9–10), pp. 479–486. doi: 10.1016/j.drudis.2012.11.014.
- Hao, K. *et al.* (2012) 'Protein Expression of Aryl Hydrocarbon Receptors in Human Placentas from Mild Preeclamptic and Early Pregnancies', in *Recent Advances in Research on the Human Placenta*. InTech. doi: 10.5772/32038.
- Hao, N. and Whitelaw, M. L. (2013) 'The emerging roles of AhR in physiology and immunity', *Biochemical Pharmacology*. Elsevier Inc., 86(5), pp. 561–570. doi: 10.1016/j.bcp.2013.07.004.
- Hassanains, H. H., Chon, S. Y. and Guptas, S. L. (1993) 'Differential Regulation of Human Indoleamine 2, 3-Dioxygenase Gene Expression by Interferons- $\gamma$  and - $\alpha$  products so induced are believed to mediate many of the', *The Journal of biological chemistry*, 268(7), pp. 5077–5084.
- Heseler, K. *et al.* (2008) 'Antimicrobial and immunoregulatory effects mediated by human lung cells: Role of IFN- $\gamma$ -induced tryptophan degradation', *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, 52(2), pp. 273–281. doi: 10.1111/j.1574-695X.2007.00374.x.
- Heyes, M. P. *et al.* (1996) 'Human microglia convert l-tryptophan into the neurotoxin quinolinic acid', *Biochemical Journal*, 320(2), pp. 595–597. doi: 10.1042/bj3200595.
- Holmes, E. W. (1988) 'Determination of serum kynurenine and hepatic tryptophan dioxygenase activity by high-performance liquid chromatography', *Analytical Biochemistry*, 172(2), pp. 518–525. doi: 10.1016/0003-2697(88)90478-2.
- Hönig, A. *et al.* (2004) 'Indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) expression in invasive extravillous trophoblast supports role of the enzyme for materno-fetal tolerance.', *Journal of reproductive immunology*, 61(2), pp. 79–86. doi: 10.1016/j.jri.2003.11.002.
- Houston-Ludlam, G. A., Belew, A. T. and El-Sayed, N. M. (2016) 'Comparative



- transcriptome profiling of human foreskin fibroblasts infected with the sylvio and y strains of *Trypanosoma cruzi*', *PLoS ONE*, 11(8), pp. 1–15. doi: 10.1371/journal.pone.0159197.
- Ibana, J. A. *et al.* (2011) 'Inhibition of indoleamine 2,3-dioxygenase activity by levo-1-methyl tryptophan blocks gamma interferon-induced chlamydia trachomatis persistence in human epithelial cells', *Infection and Immunity*, 79(11), pp. 4425–4437. doi: 10.1128/IAI.05659-11.
- Jiang, Y. *et al.* (2010) 'Expression of aryl hydrocarbon receptor in human placentas and fetal tissues.', *The journal of histochemistry and cytochemistry*, 58(8), pp. 679–85. doi: 10.1369/jhc.2010.955955.
- Julliard, W., Fechner, J. H. and Mezrich, J. D. (2014) 'The Aryl Hydrocarbon Receptor Meets Immunology: Friend or Foe? A Little of Both', *Frontiers in Immunology*, 5(OCT), pp. 1–7. doi: 10.3389/fimmu.2014.00458.
- Juricek, L. *et al.* (2015) 'Activation of the aryl hydrocarbon receptor by carcinogenic aromatic amines and modulatory effects of their N-acetylated metabolites', *Archives of Toxicology*, 89(12), pp. 2403–2412. doi: 10.1007/s00204-014-1367-7.
- Karupiah, G. *et al.* (2000) 'NADPH oxidase, Nramp1 and nitric oxide synthase 2 in the host antimicrobial response', *Reviews in immunogenetics*, 2(3), p. 387–415. Available at: <http://europepmc.org/abstract/MED/11256747>.
- Kawajiri, K. and Fujii-Kuriyama, Y. (2007) 'Cytochrome P450 gene regulation and physiological functions mediated by the aryl hydrocarbon receptor', *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 464(2), pp. 207–212. doi: 10.1016/j.abb.2007.03.038.
- King, N. J. C. and Thomas, S. R. (2007) 'Molecules in focus: Indoleamine 2,3-dioxygenase', *The International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 39(12), pp. 2167–2172. doi: 10.1016/j.biocel.2007.01.004.
- Knubel, C. P. *et al.* (2010) 'Indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) is critical for host resistance against *Trypanosoma cruzi*', *The FASEB Journal*, 24(8), pp. 2689–2701. doi: 10.1096/fj.09-150920.
- Knubel, C. P. *et al.* (2011) '3-Hydroxy Kynurenine Treatment Controls *T. cruzi* Replication and the Inflammatory Pathology Preventing the Clinical Symptoms of Chronic Chagas Disease', *PLoS ONE*. Edited by G. H. Giambartolomei, 6(10), p. e26550. doi: 10.1371/journal.pone.0026550.



- Kropf, P. *et al.* (2004) 'Infection of C57BL/10ScCr and C57BL/10ScNCR mice with *Leishmania major* reveals a role for Toll-like receptor 4 in the control of parasite replication', *Journal of Leukocyte Biology*, 76(1), pp. 48–57. doi: 10.1189/jlb.1003484.
- Kudo, Y. (2013) 'The role of placental indoleamine 2,3-dioxygenase in human pregnancy.', *Obstetrics & gynecology science*, 56(4), pp. 209–216. doi: 10.5468/ogs.2013.56.4.209.
- Kudo, Y. and Boyd, C. a (2000) 'Human placental indoleamine 2,3-dioxygenase: cellular localization and characterization of an enzyme preventing fetal rejection.', *Biochimica et biophysica acta*, 1500(1), pp. 119–24. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10564724>.
- Leung, A. Y. H. *et al.* (2001) 'Quantification of polyoma BK viruria in hemorrhagic cystitis complicating bone marrow transplantation', *Blood*, 98(6), pp. 1971–1978. doi: 10.1182/blood.V98.6.1971.
- Li, F. *et al.* (2017) 'Indoleamine-2,3-dioxygenase and Interleukin-6 associated with tumor response to neoadjuvant chemotherapy in breast cancer', *Oncotarget*, 8(64), pp. 107844–107858. doi: 10.18632/oncotarget.22253.
- Ligam, P. *et al.* (2005) 'Localisation of Indoleamine 2,3-dioxygenase and Kynurenine Hydroxylase in the Human Placenta and Decidua: Implications for Role of the Kynurenine Pathway in Pregnancy', *Placenta*, 26(6), pp. 498–504. doi: 10.1016/j.placenta.2004.08.009.
- Löb, S. *et al.* (2009) 'Inhibitors of indoleamine-2,3- dioxygenase for cancer therapy: can we see the wood for the trees?', *Nature Reviews Cancer*. Nature Publishing Group, 9(June), pp. 445–452. doi: 10.1038/nrc2639.
- Lowry, O. H. *et al.* (1951) 'Protein measurement with the Folin phenol reagent', *J. Biol. Chem.*, 193(13), p. 265. doi: 10.1007/s00540-011-1254-9.
- Mahan, L. K., Escott-Stump, S. and Raymond, J. (2013) *Krause. Dietoterapia*. 13th edn, *Actividad Dietética*. 13th edn. Edited by Elsevier. Available at: <https://www.casadellibro.com/libro-krause-dietoterapia-13-ed/9788480869638/2033066>.
- Manuelpillai, U. *et al.* (2003) 'Increased mRNA expression of kynurenine pathway enzyme in human placenta exposed to bacterial endotoxin', in *Developments in Tryptophan and Serotonin Metabolism*, pp. 85–89.
- Manuelpillai, U. *et al.* (2005) 'Identification of kynurenine pathway enzyme mRNAs



- and metabolites in human placenta: Up-regulation by inflammatory stimuli and with clinical infection', *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 192, pp. 280–288. doi: 10.1016/j.ajog.2004.06.090.
- Mayer, J. P. *et al.* (2010) 'Congenital infections with *Trypanosoma cruzi* or *Toxoplasma gondii* are associated with decreased serum concentrations of interferon-  $\gamma$  and interleukin-18 but increased concentrations of interleukin-10', *Annals of Tropical Medicine & Parasitology*, 104(6), pp. 485–492. doi: 10.1179/136485910X12786389891362.
- Mellor, A. (2005) 'Indoleamine 2,3 dioxygenase and regulation of T cell immunity', *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 338(1), pp. 20–24. doi: 10.1016/j.bbrc.2005.08.232.
- Mellor, A. L. *et al.* (2002) 'Indoleamine 2, 3-dioxygenase, immunosuppression and pregnancy', *Journal of reproductive immunology*, 57(1–2), pp. 143–150.
- Mellor, A. L. and Munn, D. H. (1999) 'Tryptophan catabolism and T-cell tolerance: Immunosuppression by starvation?', *Immunology Today*, 20(10), pp. 469–473. doi: 10.1016/S0167-5699(99)01520-0.
- Mellor, A. L. and Munn, D. H. (2001) 'Extinguishing maternal immune responses during pregnancy: implications for immunosuppression', *Seminars in Immunology*, 13(4), pp. 213–218. doi: 10.1006/smim.2000.0317.
- Mellor, A. L. and Munn, D. H. (2004) 'IDO expression by dendritic cells: tolerance and tryptophan catabolism.', *Nature reviews. Immunology*, 4(10), pp. 762–74. doi: 10.1038/nri1457.
- Messenger, L. A. and Miles, M. A. (2015) 'Evidence and importance of genetic exchange among field populations of *Trypanosoma cruzi*', *Acta Tropica*. Elsevier B.V., 151(1), pp. 150–155. doi: 10.1016/j.actatropica.2015.05.007.
- Metz, R. *et al.* (2007) 'Novel tryptophan catabolic enzyme IDO2 is the preferred biochemical target of the antitumor indoleamine 2,3-dioxygenase inhibitory compound D-1-methyl-tryptophan.', *Cancer research*, 67(15), pp. 7082–7. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-07-1872.
- Mezrich, J. D. *et al.* (2010) 'An interaction between kynurenine and the aryl hydrocarbon receptor can generate regulatory T cells.', *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 185(6), pp. 3190–8. doi: 10.4049/jimmunol.0903670.
- Mezzano, L. *et al.* (2012) 'In Vitro Infection of *Trypanosoma cruzi* Causes Decrease in Glucose Transporter Protein-1 (GLUT1) Expression in Explants of Human



- Placental Villi Cultured under Normal and High Glucose Concentrations.’, *Journal of tropical medicine*, 2012, p. 969243. doi: 10.1155/2012/969243.
- Miller, R. K. *et al.* (2005) ‘Human placental explants in culture: approaches and assessments.’, *Placenta*, 26(6), pp. 439–48. doi: 10.1016/j.placenta.2004.10.002.
- Mittal, S. (2015) *Targeting the broadly pathogenic Kynurenine pathway, Targeting the Broadly Pathogenic Kynurenine Pathway*. doi: 10.1007/978-3-319-11870-3.
- Moretti, E. *et al.* (2005) ‘Chagas’ disease : study of congenital transmission in cases’, *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 38(1), pp. 53–55. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15717095>.
- Moser, D. R., Kirchhoff, L. V and Donelson, J. E. (1989) ‘Detection of Trypanosoma cruzi by DNA Amplification Using the Polymerase Chain Reaction’, *J. Clin. Microbiol.*, 27(7), p. 1477. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=267598&tool=pmc-entrez&rendertype=abstract>.
- Munn, D. H. *et al.* (1998) ‘Prevention of Allogeneic Fetal Rejection by Tryptophan Catabolism’, *Science*, 281(5380), pp. 1191–1193. doi: 10.1126/science.281.5380.1191.
- Murakami, Y. *et al.* (2012) ‘Inhibition of increased indoleamine 2,3-dioxygenase activity attenuates Toxoplasma gondii replication in the lung during acute infection’, *Cytokine*. Elsevier Ltd, 59(2), pp. 245–251. doi: 10.1016/j.cyto.2012.04.022.
- Narui, K. *et al.* (2009) ‘Anti-infectious Activity of Tryptophan Metabolites in the L-Tryptophan–L-Kynurenine Pathway’, *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, 32(1), pp. 41–44. doi: 10.1248/bpb.32.41.
- Nguyen, N. T. *et al.* (2010) ‘Aryl hydrocarbon receptor negatively regulates dendritic cell immunogenicity via a kynurenine-dependent mechanism.’, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(46), pp. 19961–6. doi: 10.1073/pnas.1014465107.
- Niederhorn, J. Y. (2006) ‘See no evil, hear no evil, do no evil: the lessons of immune privilege’, *Nature Immunology*, 7(4), pp. 354–359. doi: 10.1038/ni1328.
- Niño-Castro, A. *et al.* (2014) ‘The IDO1-induced kynurenines play a major role in the antimicrobial effect of human myeloid cells against *Listeria monocytogenes*’, *Innate Immunity*, 20(4), pp. 401–411. doi: 10.1177/1753425913496442.



- O'Connor, J. C. *et al.* (2009) 'Interferon- and Tumor Necrosis Factor- Mediate the Upregulation of Indoleamine 2,3-Dioxygenase and the Induction of Depressive-Like Behavior in Mice in Response to Bacillus Calmette-Guerin', *Journal of Neuroscience*, 29(13), pp. 4200–4209. doi: 10.1523/JNEUROSCI.5032-08.2009.
- Okuda, S. *et al.* (2002) '3-Hydroxykynurenine, an Endogenous Oxidative Stress Generator, Causes Neuronal Cell Death with Apoptotic Features and Region Selectivity', *Journal of Neurochemistry*, 70(1), pp. 299–307. doi: 10.1046/j.1471-4159.1998.70010299.x.
- Ozaki, Y., Edelstein, M. P. and Duch, D. S. (1987) 'The actions of interferon and antiinflammatory agents on induction of indoleamine 2,3-dioxygenase in human peripheral blood monocytes', *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 144(3), pp. 1147–1153. doi: 10.1016/0006-291X(87)91431-8.
- Pardridge, W. M. and Oldendorf, W. H. (1975) 'Kinetic analysis of blood-brain barrier transport of amino acids', *BBA - Biomembranes*, 401(1), pp. 128–136. doi: 10.1016/0005-2736(75)90347-8.
- Peluffo, G. *et al.* (2004) 'l-arginine metabolism during interaction of Trypanosoma cruzi with host cells', *Trends in Parasitology*, 20(8), pp. 363–369. doi: 10.1016/j.pt.2004.05.010.
- Pérez-Molina, J. A. and Molina, I. (2018) 'Chagas disease', *Lancet*. Elsevier Ltd, 391(10115), pp. 82–94. doi: 10.1016/S0140-6736(17)31612-4.
- Piron, M. *et al.* (2007) 'Development of a real-time PCR assay for Trypanosoma cruzi detection in blood samples', *Acta Tropica*, 103, pp. 195–200. doi: 10.1016/j.actatropica.2007.05.019.
- Qian, F. *et al.* (2012) 'Effects of 1-methyltryptophan stereoisomers on IDO2 enzyme activity and IDO2-mediated arrest of human T cell proliferation', *Cancer Immunology, Immunotherapy*, 61(11), pp. 2013–2020. doi: 10.1007/s00262-012-1265-x.
- Qvarnstrom, Y. *et al.* (2012) 'Sensitive and specific detection of Trypanosoma cruzi DNA in clinical specimens using a multi-target real-time PCR approach', *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 6(7). doi: 10.1371/journal.pntd.0001689.
- Ramírez, J. D. C. *et al.* (2015) 'Analytical Validation of Quantitative Real-Time PCR Methods for Quantification of Trypanosoma cruzi DNA in Blood Samples from Chagas Disease Patients', *The Journal of Molecular Diagnostics*. American



- Society for Investigative Pathology and the Association for Molecular Pathology, 17(5), pp. 605–615. doi: 10.1016/j.jmoldx.2015.04.010.
- Rios, C. and Santamaria, A. (1991) ‘Quinolinic acid is a potent lipid peroxidant in rat brain homogenates’, *Neurochemical Research*, 16(10), pp. 1139–1143. doi: 10.1007/BF00966592.
- Robbins, J. R. and Bakardjiev, A. I. (2012) ‘Pathogens and the placental fortress’, *Current Opinion in Microbiology*. Elsevier Ltd, 15(1), pp. 36–43. doi: 10.1016/j.mib.2011.11.006.
- Robinson, C. M., Hale, P. T. and Carlin, J. M. (2005) ‘The Role of IFN- $\gamma$  and TNF- $\alpha$ -Responsive Regulatory Elements in the Synergistic Induction of Indoleamine Dioxygenase’, *Journal of Interferon & Cytokine Research*, 25(1), pp. 20–30. doi: 10.1089/jir.2005.25.20.
- Rodríguez-Martínez, E. *et al.* (2000) ‘Effect of quinolinic acid on endogenous antioxidants in rat corpus striatum’, *Brain Research*, 858(2), pp. 436–439. doi: 10.1016/S0006-8993(99)02474-9.
- Sainio, E.-L., Pulkki, K. and Young, S. N. (1996) ‘L-Tryptophan: Biochemical, nutritional and pharmacological aspects’, *Amino Acids*, (10), pp. 21–47.
- Santamaría, A. *et al.* (2001) ‘Quinolinic acid induces oxidative stress in rat brain synaptosomes’, *Neuroreport*, 12(4), pp. 871–874. doi: 10.1097/00001756-200103260-00049.
- Schijman, A. G. (2007) ‘Congenital Chagas Disease’, *Disease of the Newborn*, 7069(06). doi: 10.1016/S0168-7069(06)13012-8.
- Schijman, A. G. *et al.* (2011) ‘International Study to Evaluate PCR Methods for Detection of *Trypanosoma cruzi* DNA in Blood Samples from Chagas Disease Patients’, *PLoS Neglected Tropical Diseases*. Edited by A. Rodriguez, 5(1), p. e931. doi: 10.1371/journal.pntd.0000931.
- Schmidt, S. K. *et al.* (2009) ‘Antimicrobial and immunoregulatory properties of human tryptophan 2,3-dioxygenase’, *European Journal of Immunology*, 39(10), pp. 2755–2764. doi: 10.1002/eji.200939535.
- Schmidt, S. K. *et al.* (2012) ‘Influence of tryptophan contained in 1-Methyl-Tryptophan on antimicrobial and immunoregulatory functions of indoleamine 2,3-dioxygenase.’, *PloS one*, 7(9), p. e44797. doi: 10.1371/journal.pone.0044797.
- Schwarcz, R. (2004) ‘The kynurenine pathway of tryptophan degradation as a drug target’, *Current Opinion in Pharmacology*, 4(1), pp. 12–17. doi:



- 10.1016/j.coph.2003.10.006.
- Sedlmayr, P. (2007) 'Indoleamine 2,3-Dioxygenase in Materno-Fetal Interaction', *Current Drug Metabolism*, 8(3), pp. 205–208. doi: 10.2174/138920007780362491.
- Shoda, L. K. M. *et al.* (2001) 'DNA from Protozoan Parasites Babesia bovis, Trypanosoma cruzi, and T. brucei Is Mitogenic for B Lymphocytes and Stimulates Macrophage Expression of Interleukin-12, Tumor Necrosis Factor Alpha, and Nitric Oxide', *Infection and Immunity*, 69(4), pp. 2162–2171. doi: 10.1128/IAI.69.4.2162-2171.2001.
- Silva, J. S., Twardzik, D. R. and Reed, S. G. (1991) 'Regulation of Trypanosoma cruzi infections in vitro and in vivo by transforming growth factor beta (TGF-beta).', *The Journal of Experimental Medicine*, 174(3), pp. 539–545. doi: 10.1084/jem.174.3.539.
- Silva, N. M. *et al.* (2002) 'Expression of indoleamine 2,3-dioxygenase, tryptophan degradation, and kynurenine formation during in vivo infection with Toxoplasma gondii: Induction by endogenous gamma interferon and requirement of interferon regulatory factor 1', *Infection and Immunity*, 70(2), pp. 859–868. doi: 10.1128/IAI.70.2.859-868.2002.
- Song, Z. (2002) 'Ligand-Dependent and Independent Modulation of Aryl Hydrocarbon Receptor Localization, Degradation, and Gene Regulation', *Molecular Pharmacology*, 62(4), pp. 806–816. doi: 10.1124/mol.62.4.806.
- de Souza, W., de Carvalho, T. M. U. and Barrias, E. S. (2010) 'Review on Trypanosoma cruzi: Host Cell Interaction.', *International journal of cell biology*, 2010. doi: 10.1155/2010/295394.
- Stahl, P. *et al.* (2014) 'Trypanosoma cruzi parasites fight for control of the JAK-STAT pathway by disarming their host', *Jak-Stat*, 3(4), p. e1012964. doi: 10.1080/21623996.2015.1012964.
- Stejskalova, L. *et al.* (2011) 'Aryl hydrocarbon receptor and aryl hydrocarbon nuclear translocator expression in human and rat placentas and transcription activity in human trophoblast cultures.', *Toxicological sciences: an official journal of the Society of Toxicology*, 123(1), pp. 26–36. doi: 10.1093/toxsci/kfr150.
- Sturm, N. R. *et al.* (1989) 'Sensitive detection and schizodeme classification of Trypanosoma cruzi cells by amplification of kinetoplast minicircle DNA sequences: use in diagnosis of Chagas' disease', *Molecular and Biochemical*





- Parasitology*, 33(3), pp. 205–214. doi: 10.1016/0166-6851(89)90082-0.
- Takikawa, O. *et al.* (1988) ‘Mechanism of Interferon- $\gamma$  Action BY INTERFERON- $\gamma$  AND EVALUATION OF THE ENZYME-MEDIATED TRYPTOPHAN DEGRADATION IN’, *The Journal of biological chemistry*, 263(February 5), pp. 2041–2048.
- Takikawa, O. (2005) ‘Biochemical and medical aspects of the indoleamine 2,3-dioxygenase-initiated L-tryptophan metabolism.’, *Biochemical and biophysical research communications*, 338(1), pp. 12–9. doi: 10.1016/j.bbrc.2005.09.032.
- Tarleton, R. L. (2003) ‘Chagas disease: a role for autoimmunity?’, *Trends in Parasitology*, 19(10), pp. 447–451. doi: 10.1016/j.pt.2003.08.008.
- Taylor, T. W. and Feng, G. (1991) ‘Relationship between interferon-gamma, indoleamine 2,3-dioxygenase, and tryptophan catabolism’, *FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 5, pp. 2516–2522.
- Telleria, J. and Tibayrenc, M. (2017) *American Trypanosomiasis, 100 Years of Research Chagas Disease*. 2nd edn. doi: 9780128010693.
- Thomas, S. R. and Stocker, R. (1999) ‘Redox reactions related to indoleamine 2,3-dioxygenase and tryptophan metabolism along the kynurenine pathway’, *Redox Report*, 4(5), pp. 199–220. doi: 10.1179/135100099101534927.
- Triquell, M. F. *et al.* (2009) ‘Placental infection by two subpopulations of *Trypanosoma cruzi* is conditioned by differential survival of the parasite in a deleterious placental medium and not by tissue reproduction.’, *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 103(10), pp. 1011–8. doi: 10.1016/j.trstmh.2009.03.004.
- Triquell, M. F. *et al.* (2018) ‘Nitric oxide synthase and oxidative-nitrosative stress play a key role in placental infection by *Trypanosoma cruzi*’, *American Journal of Reproductive Immunology*, 80(1), pp. 1–12. doi: 10.1111/aji.12852.
- Türck, J. *et al.* (2005) ‘Enhancement of antimicrobial effects by glucocorticoids’, *Medical Microbiology and Immunology*, 194(1–2), pp. 47–53. doi: 10.1007/s00430-003-0210-1.
- Vago, A. *et al.* (1996) ‘Kinetoplast DNA signatures of *Trypanosoma cruzi* strains obtained directly from infected tissues.’, *The American journal of pathology*, 149(6), pp. 2153–2159. doi: 10.1111/j.1468-1331.2007.02020.x.
- Valentich, M. A. *et al.* (2016) ‘Interacciones Materno-fetal-neonatal: placenta y



- glándula mamaria’, in 5 (ed.) *Histología y Embriología Humanas: Bases celulares y moleculares con orientación clínico-patológicas*. Médica Pan. Buenos Aires, Argentina: 2016, pp. 633–662.
- Volta, B. J. *et al.* (2016) ‘Serum Cytokines as Biomarkers of Early Trypanosoma cruzi infection by Congenital Exposure’, *The Journal of Immunology*, 196(11), pp. 4596–4602. doi: 10.4049/jimmunol.1502504.
- Wakx, A. *et al.* (2018) ‘Expression, Localization, and Activity of the Aryl Hydrocarbon Receptor in the Human Placenta’, *International Journal of Molecular Sciences*, 19(12), p. 3762. doi: 10.3390/ijms19123762.
- Walther, B. *et al.* (2010) ‘Placental Malaria is associated with reduced early life weight development of affected children independent of low birth weight’, *Malaria Journal*, 9(1), p. 16. doi: 10.1186/1475-2875-9-16.
- Wang, B. *et al.* (2011) ‘Toll-like receptor-3 ligation-induced indoleamine 2, 3-dioxygenase expression in human trophoblasts.’, *Endocrinology*, 152(12), pp. 4984–92. doi: 10.1210/en.2011-0278.
- WHO (2007) *Reporte sobre la enfermedad de Chagas*. Edited by F. Guhl and J. K. Lazdins-Helds. Buenos Aires, Argentina. Available at: [http://whqlibdoc.who.int/hq/2007/TDR\\_SWG\\_09\\_spa.pdf](http://whqlibdoc.who.int/hq/2007/TDR_SWG_09_spa.pdf).
- WHO (2015) *Chagas disease in Latin America: an epidemiological update based on 2010 estimates*, World Health Organization. doi: Export Date 4 November 2013.
- Yadav, M. C. *et al.* (2007) ‘IFN- $\gamma$ -induced IDO and WRS expression in microglia is differentially regulated by IL-4’, *Glia*, 55(13), pp. 1385–1396. doi: 10.1002/glia.20544.
- Yuasa, H. J. *et al.* (2010) ‘1-l-methyltryptophan is a more effective inhibitor of vertebrate IDO2 enzymes than 1-d-methyltryptophan’, *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*. Elsevier Inc., 157(1), pp. 10–15. doi: 10.1016/j.cbpb.2010.04.006.



## ANEXOS

### RESÚMENES PUBLICADOS EN REVISTAS CON REFERATO

**María José Moreira-Espinoza**, Evangelina Benizio, María Fernanda Triquell, María Belén Rabaglino, Gina María Mazzudulli, Mariana Piegari, Luciana Mezzano, Cintia María Díaz-Lujan, Ricardo E. Fretes. Effect of the mechanism of degradation of tryptophan in the infection of human placenta by *T. cruzi*. MEDICINA - Volumen 77 - (Supl. I), 2017, pág 399

**M.J. Moreira-Espinoza**, E. Benizio, M.B. Rabaglino, M. Vara Mesler, G.M. Mazzudulli, M. Piegari, L. Mezzano, C. Díaz-Lujan, M.F. Triquell, R.E. Fretes. Infection by *T. cruzi* up-regulates the catabolic pathway of tryptophan in human placental villi. Placenta, Vol. 51, p112 Published in issue: March 2017. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.placenta.2017.01.052>

**Moreira-Espinoza, M.J.**, Triquell, M.F, Moran, J.P., Piegari, M, Mezzano, L., Díaz-Lujan, C., Fretes, R.E. Expression and localization of enzymes indoleamina 2,3-Dioxygenase and aryl hydrocarbon receptor in Chagasic Placentas. XVIII Congreso de la Sociedad Española de Histología e Ingeniería Tisular; VI International Congress of Histology and Tissue Engineering; II Congreso Iberoamericano de Histología. Bilbao, 16, 17 y 18 de septiembre de 2015. Histology and Histopathology Cellular and Molecular Biology. Volume 30 (supplement 1), 2015 <http://www.hh.um.es>

**Maria J Moreira Espinoza**, Maria F Triquell, Cintia M Díaz Lujan, Gina Mazzudulli, Mariana Piegari, Luciana Mezzano, Ricardo E Fretes. Effect of tryptophan in placental explants infection by *Trypanosoma cruzi in vitro*. X Congreso de Protozoología y enfermedades parasitarias. 16 al 18 Nov del 2014. Mar de Plata, Argentina.

**María José Moreira-Espinoza**, María F. Triquell<sup>1</sup>, Cintia Díaz-Lujan, Gina Mazzudulli, Yondra C. Vanegas Padilla, M. Carmen Caballero-Bravo, Edel M. Paredes, Lizbeth Salazar-Sánchez, Ricardo E. Fretes. Participation of Tryptophan in the infection of human placental explants by *Trypanosoma cruzi*. II Congreso Mesoamericano de Ciencias Médicas. 22 al 24 de octubre del 2014. León, Nicaragua. Revista Clínica Escuela de Medicina UCR-HSJD Vol. 4, Núm. 8 (2014)



## COLABORACIONES EN RESUMENES EN REVISTA CON REFERATO

Maria B. Rabaglino, **Maria J. Moreira Espinoza**, Paula Hernández, Santiago Elizondo, Dante Beltramo. Maternal Lipoic Acid Intake Prevents Metabolic Changes Associated with Ovariectomy in the Wistar Rat Offspring. Society for Reproductive Investigation (SRI) 66th Annual Scientific Meeting is organized by Society for Reproductive Investigation (SRI) and will be held from Mar 12 - 16, 2019 at Paris Convention Center, Paris, Ile-de-France, France.

Rabaglino M.B., **Moreira-Espinoza M.J.**, Garay I., Pasqualini M.E., Beltramo, D.M. Maternal dietary intake of alpha-Lipoic Acid during pregnancy and lactation in Wistar rats prevents development of metabolic syndrome in the adult offspring. Proceeding of 6th International Symposium on Metabolic Programming and Microbiome. Cancún, México. 3er Meeting of Ibero-American DOHaD (International Society for Development Origins of Health and Disease) Chapter. November 7th – 10th 2018.

Esteban Arrieta-Bolaños, Víctor Acuña-Alonzo, Rodrigo Barquera, Juan José Madrigal-Sánchez, Jeremy E. Stein, Priscilla Órlich-Pérez, **María José Moreira-Espinoza**, Edel Paredes-Carias, Yondra Vanegas-Padilla, Lizbeth Salazar-Sánchez, J. Alejandro Madrigal, Steven G.E. Marsh, Bronwen E. Shaw. Approximating admixture in Latin American populations using analysis of high-resolution HLA extended haplotypes: differential admixture Proportions in neighboring countries. 32nd European Immunogenetics and Histocompatibility conference. Art and Science: The evolving picture of immunogenetics. VENICE LIDO, MAY 9-12, 2018 [www.efi2018.org](http://www.efi2018.org) DOI: 10.1111/tan.13280

Evangelina Benizio, Maria Fernanda Triquell, **María José Moreira-Espinoza**, Marianela Vara-Messler, Luciana Mezzano, Mariana Piegari, Cintia Maria Díaz-Luján, Ricardo Fretes. Effect of *Trypanosoma cruzi* infection in trophoblast cells (BEWO cell line). Reunión Conjunta de Sociedades de Biociencias. Buenos Aires, Argentina. Del 13 al 17 de noviembre.



Maria Belen Rabaglino, Francisco Esmoriz, Marianela Vara Messler, **Maria José Moreira Espinoza**, Dante Beltramo. Maternal dietary intake of lipoic acid during pregnancy and lactation influences metabolism and weight gain in the wistar rat offspring. Reunión Conjunta de Sociedades de Biociencias. Buenos Aires, Argentina. Del 13 al 17 de noviembre.

Marina A Beladelli, **María J Moreira Espinoza**, Garrett M Gardner, Cintia M Díaz Luján, María F Triquell, Luciana Mezzano, Evangelina Benizio, Ricardo E Fretes, Mariana Piegari “La composición de ácidos grasos dietarios determina el grado De esplenomegalia en ratones con infección subpatente por *Trypanosoma cruzi*”. XXVIII Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Protozoología y Enfermedades Parasitarias SIMPOSIO Internacional de Biología Celular y Molecular de la Enfermedad de Chagas. Sociedad Argentina de Protozoología Santa Fe, 28 de noviembre de 2016.

Evangelina Benizio, Maria Fernanda Triquell, **Maria J Moreira-Espinoza**, Marianela Vara-Messler, Luciana Mezzano, Mariana Piegari, Ricardo Corral, Ricardo Fretes, Cintia M Díaz-Luján. Infección por *Trypanosoma cruzi* en placentas humanas in vitro ex vivo induce la producción de MIF, MMP-9 Y TNF $\alpha$ . XXVIII Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Protozoología y Enfermedades Parasitarias SIMPOSIO Internacional de Biología Celular y Molecular de la Enfermedad de Chagas. Sociedad Argentina de Protozoología Santa Fe, 28 de noviembre de 2016.

Mezzano L, Díaz Luján C, **Moreira Espinoza MJ**, Piegari M, Benizio E, Triquell MF, Fretes R. Alteraciones de la renovación del trofoblasto humano inducidas por el *Trypanosoma cruzi* en placentas diabéticas. XX Congreso Argentino de Diabetes “Control de Diabetes centrado en el paciente”. Buenos Aires, 9, 10 y 11 de noviembre del 2016. Sociedad Argentina de Diabetes.

Beladelli MA, **Moreira Espinoza MJ**; Díaz-Luján CM, Triquell MF, Mezzano L, Benizio E, Fretes RE, Piegari M. Parámetros biológicos detectables en un modelo murino de infección subpatente por *Trypanosoma cruzi*. XVII Jornada de Investigación Científica JIC 2016, 19 de octubre del 2016. FCM, UNC. RHCD 1246/16. Córdoba, Argentina.



Benizio, E; Triquell, MF; **Moreira Espinoza, MJ**; Mezzano, L; Piegari, M; Díaz-Luján, C; Fretes, R. Expresión de citoquinas proinflamatorias en placentas humanas in vitro ex vivo frente a infección por *Trypanosoma cruzi*. XVII Jornada de Investigación Científica JIC 2016, 19 de octubre del 2016. FCM, UNC. RHCD 1246/16. Córdoba, Argentina.

MB Rabaglino, **MJ Moreira-Espinoza**, JP Lopez, NH Garcia, D Beltramo. Maternal triclosan consumption predisposes to metabolic syndrome in Wistar rat Offspring. Aspen/Snowmass Perinatal Biology Symposium: “Interconnecting Animal and Human Systems to Understand Life-Long Disease” August 27-30th 2016, Snowmass Colorado.

Triquell MF, Díaz-Luján CM, Moreira-Espinoza MJ, Mezzano L, Benizio EL, Piegari M, Fretes RE. El estrés oxidativo causado por dos cepas diferentes de *Trypanosoma cruzi* en la placenta induce alteraciones trofoblásticas. XVI JIC Jornada de Investigación Científica. 28 de octubre del 2015. Córdoba, Argentina. RHCD N°271/15

Triquell MF, Díaz-Luján CM, **Moreira-Espinoza MJ**, Mezzano L., Benizio E, Piegari M, Fretes R. Placental oxidative stress caused by two different strains of *Trypanosoma cruzi* induces trophoblast alterations. XVIII Congreso de la Sociedad Española de Histología e Ingeniería Tisular; VI International Congress of Histology and Tissue Engineering; II Congreso Iberoamericano de Histología. Bilbao, 16, 17 y 18 de septiembre de 2015.

Benizio E; **Moreira Espinoza MJ**, Triquell MF, Mezzano L, Piegari M, Díaz Lujan C, Fretes R. Respuesta de células trofoblásticas (Línea celular BEWO) en presencia de infección por *Trypanosoma cruzi*. 3 era Reunión conjunta de Sociedades de Argentina de Biología. 9, 10 y 11 de septiembre del 2015. San Miguel de Tucumán, Argentina.

Mezzano, Luciana; Repposi, Gastón; Fretes, Ricardo E.; Triquell, Maria Fernanda; Díaz Luján, Cintia; Piegari, Mariana; Benizio, Evangelina; **Moreira Espinoza, María José**; Sartori, María José; Paris de Fabro, Sofía+. Expresión de la



proteína transportadora Glut1 en placentas humanas diabéticas infectadas *in vitro* con *Trypanosoma cruzi*. 8 Jornadas de actualizaciones en Diabetes. 3y 4 de junio de 2015. Córdoba, Argentina.

J. Moran, L. Mezzano, M.F. Triquell, O. Araya, **M.J. Moreira Espinoza**, D. Hardisson, C. Díaz - Luján, R. Fretes. Alterations in placental trophoblasts of pregnant women with Chagas disease. VI SLIMP / V LASRI – 2015 Mar del Plata, Argentina. April 13th – April 16th, 2015.

C. Díaz-Lujan, M.F. Triquell, E. Bolatti, **M.J. Moreira Espinoza**, D. Hardisson, C. Castillo, U. Kemmerling, R.E. Fretes. Congenital transmission of protozoa: placental infection by *Trypanosoma cruzi*. VI SLIMP / V LASRI – 2015 Mar del Plata, Argentina. April 13th – April 16th, 2015.

María Fernanda Triquell, **María José Moreira Espinoza**, Cintia Díaz Luján, Mariana Piegari, - Luciana Mezzano, Gina María Mazzudulli, Ricardo Fretes. High quantities of trypomastigotes of *Trypanosoma cruzi* produces placental structural alterations associated to oxidative stress in vitro. X Congreso de Protozoología y enfermedades parasitarias. Mar de Plata, Argentina 16 al 18 Nov del 2014. Mar de Plata, Argentina.

Beladelli MA, Piegari M, Gardner GM, Díaz-Luján CM, Triquell MF, **Moreira Espinoza MJ**, Fretes RE. Efecto de dietas con diferentes perfiles lipídicos en la esplenomegalia de ratones hembra preñados infectados con *T. cruzi* (resultados preliminares). XV JIC Jornada de Investigación Científica 24 de octubre del 2014. Córdoba, Argentina.

Joana Moran, Luciana Mezzano, M.F Triquell, C. Diaz-Lujan, **M.J Moreira**, D. Hardisson, R.E. Fretes, La infección materna por *T. cruzi* produce alteraciones de la proliferación del citotrofoblasto placentario. XXVI Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Protozoología. SAP 2013 Rosario, Argentina.



## HOJA DE INFORMACION AL PACIENTE

### “Participación del aminoácido esencial L-Trp y su vía catabólica en el mecanismo de infección de la placenta humana en la transmisión congénita de Chagas”.

Usted ha sido invitado a participar en la tesis de investigación dirigido por la Máster María José Moreira Espinoza, que será llevado a cabo por profesionales que investigan en el campo de las ciencias de la salud pertenecientes al Instituto de Biología Celular de la Facultad de Ciencias Médicas de la Universidad Nacional de Córdoba. Es importante que lea la descripción del estudio y su posible función en él en caso de que decida participar.

Será incluida en la tesis si es una embarazada sin ninguna complicación durante el embarazo y es sometida a cesárea la cual fue previamente programada por su médico obstetra y de manera totalmente independiente de su participación en este estudio. Así mismo, debe tener serología negativa para la enfermedad de Chagas u otras enfermedades infecciosas, además de no fumar previamente o durante el embarazo y no ser diabética o haber tenido diabetes gestacional.

Su participación, si usted decide hacerlo de manera libre y voluntaria, se refiere a un único momento del estudio, y consiste en el que luego de producirse el parto por cesárea ya programada por causas obstétricas, se conservará la placenta en lugar de ser desechada, como se hace habitualmente. La placenta será trasladada inmediatamente al Instituto de Biología Celular de la Facultad de Ciencias Médicas de la Universidad Nacional de Córdoba.

Este estudio ha sido revisado y aprobado por el Comité de Ética del Hospital Privado con la resolución número \_\_\_\_\_ y las Autoridades sanitarias que garantizan que los estudios de investigación no violen los derechos de las personas.

- **Procedimiento del estudio**

En este estudio se emplearán placentas de embarazadas normales (con las condiciones anteriormente detalladas) y pequeñas muestras se cultivarán con el parásito causante de la enfermedad de Chagas (*Trypanosoma cruzi*) y luego se analizará su interacción. Los restos de tejidos una vez analizados y fijados se conservarán en el Instituto de Biología Celular situado entre las calles Enrique Barros y Enfermera Gordillo de la Ciudad Universitaria. Aseguramos que la placenta no se empleará con otro fin más que el experimental citado.

El procedimiento que se realizará no es invasivo y no perjudicará de forma alguna a usted ni a su bebé recién nacido, ya que se empleará la placenta que normalmente es descartada luego del alumbramiento.





Dentro de los procedimientos propios del estudio, su médico completará una ficha con los siguientes datos de su historia clínica:

- a) Si ha tenido un embarazo normal o con alguna complicación.
- d) Estado del bebé al momento del parto
- e) Edad de la madre y causa de la cesárea.

Los resultados obtenidos de los experimentos realizados con la placenta en sus distintas etapas serán almacenados, analizados y eventualmente publicada en revistas científicas en forma anónima.

- **Posibles riesgos e incomodidades**

No existen riesgos pues NO se realizará procedimiento alguno sobre usted ni el bebé, excepto los que demande el procedimiento obstétrico que no resultará modificado por nuestra intervención. Los investigadores sólo le pedimos autorización para utilizar la placenta luego del alumbramiento.

- **Beneficios**

Su hijo y usted no obtendrán beneficio alguno por participar. El propósito de este estudio, que se ajusta a las normas internacionales referidas a la ética, es investigar y obtener más conocimientos sobre la relación entre la enfermedad de Chagas padecida por la madre y la transmisión de dicha enfermedad a su bebé durante el embarazo, con el objetivo de reconocer factores de riesgo o indicadores de una posible transmisión congénita y que permitan actuar en la prevención. La participación en este estudio no tendrá ningún costo para usted.

- **Confidencialidad**

En ningún momento se solicitará el nombre de la paciente o del hijo, número de documento o datos filiatorios.

- **Participación voluntaria**

Su participación en este estudio es plenamente voluntaria y Usted puede negarse a participar o puede retirarse del estudio en cualquier momento sin perder la atención médica que tiene derecho a recibir. Su participación puede ser interrumpida por su médico si se ha determinado que continuar participando podría dañar su salud.

Su médico la va a informar acerca de las características del estudio y debe contestar todas sus preguntas y aclarar sus dudas. Ante cualquier pregunta que tenga respecto a los procedimientos del estudio antes, durante o después del mismo, puede comunicarse con: **M.Sc. María José Moreira Espinoza** (Estudiante de Doctorado de Ciencias Químicas, Facultad de Ciencias Químicas, UNC), Instituto de Biología Celular, Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Córdoba. Tel. 0351-4334020 y/o **Dr. Ricardo E. Fretes**, (Director Responsable de Tesis doctoral en Ciencias Químicas), director del Instituto de Biología Celular, Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Córdoba. Tel. 0351-4334020.



### Consentimiento informado

Declaro que se me ha informado de manera completa los detalles de la investigación. Que me invitan a participar porque mi parto, por causas obstétricas, será realizado por cesárea. Entiendo que sólo estoy donando la placenta luego del alumbramiento para el único fin expresado (conocer los mecanismos de transmisión de la enfermedad de Chagas). Comprendo que no tendré beneficio alguno por participar como tampoco riesgos para mí o el bebé y que si decido no participar en nada cambiará la atención que reciba. Se me ha informado que los investigadores no intervienen en absoluto en el procedimiento de la cesárea. Acepto que todos los datos solicitados y obtenidos sean almacenados de manera totalmente anónima en una base de datos y que los investigadores podrán publicar o presentar en reuniones científicas los resultados de la investigación, conservando dicho anonimato. Puedo solicitar que mis datos sean retirados de la investigación cuando lo desee y no verme por ello perjudicada.

Finalmente, he tenido posibilidad de hacer preguntas que me fueron respondidas a entera satisfacción y por ello doy mi consentimiento para participar de manera LIBRE Y VOLUNTARIA

|                |                        |                   |
|----------------|------------------------|-------------------|
| ____/____/____ | _____                  | _____             |
| Fecha          | Firma voluntaria       | Nombre y Apellido |
|                | _____                  | _____             |
|                | Firma del Investigador | Nombre y Apellido |



## COMITÉ DE ETICA



HNC  
Hospital Nacional de Clínicas

HNC 100  
AÑOS  
1913-2013

COMITE DE ETICA  
Hospital Nacional de Clínicas

Registro N° 176/13

Comité de ética

### 1. Datos y características del estudio

|   |   |  |
|---|---|--|
| 1 | Titulo de la investigación  | Participación del aminoácido esencial L. triptófano y su vía catabólica en el mecanismo de infección de la placenta humana en la transmisión congénita de chagas |
| 2 | Institución donde se llevara a cabo el estudio                                  | Instituto de Biología Celular, FCM - UNC   |
| 3 | Autoridad responsable de la institución o Director de tesis (según corresponda) | Dra. Mirta Valentich   |
| 4 | Investigador responsable  | Maria José Espinoza  |
| 5 | Tipo de investigación   | Descriptivo Correlacional  |

### 2. Resolución final

El CEHNC, en reunión plenaria, ha decidido aprobar el protocolo en la reunión plenaria del 12 de diciembre de 2013 según consta en el Libro de Actas I, N° 131.

La investigación cumple con las disposiciones y regulaciones provinciales y nacionales que salvaguardan los derechos de los participantes en investigación clínica.

Se comunica al investigador principal deberá notificar a este Comité:

- o El inicio de la ejecución del estudio dentro de las 72 horas (mediante el formulario correspondiente).
- o La suspensión o cancelación del estudio de manera inmediata.
- o El reporte de avance anual (según lo disponga este comité) donde incluirá el estado de progreso del protocolo y cualquier otra situación que modifique el curso de la investigación y/o revista mayor seguridad para los participantes.
- o Las enmiendas al protocolo de manera oportuna y para su aprobación.



Firma del Presidente / Coordinador

Prof. Dra. NILDA L. MONTRULL  
Coordinadora del Comité de Ética  
0415-4496



## INDICE DE FIGURAS

|  |    |
|--|----|
| Fig. 1. Distribución global de casos de Chagas   | 8  |
| Fig. 2. Ciclo biológico de <i>Trypanosoma cruzi</i>  | 9  |
| Fig. 3. Aspectos macroscópicos de las placentas humanas  | 12 |
| Fig. 4. Esquema del tipo de vellosidades en la placenta humana   | 13 |
| Fig. 5. Barrera placentaria en una placenta humana a término   | 15 |
| Fig. 6. Esquema que representa la formación de vía de la L-Kyn a partir de L-Trp   | 18 |
| Fig. 7. Vellosidades coriónicas de placentas humanas a término, marcadas mediante IHQ con anticuerpo específico para TDO   | 20 |
| Fig. 8. Activación de IDO  | 21 |
| Fig. 9. Curva estándar de ADN de explantos placentarios con <i>Trypanosoma cruzi</i> .   | 32 |
| Fig. 10. Representación esquemática de una cromatografía de sobrenadante para el amino ácido L-Trp.  | 33 |
| Fig. 11. Efecto de la infección por <i>T. cruzi</i> sobre la viabilidad de explantos placentarios en un modelo <i>in vitro</i>   | 38 |
| Fig. 12. Efecto de la infección por <i>T. cruzi</i> sobre la actividad de IDO  | 39 |
| Fig. 13. Efecto de la infección por <i>T. cruzi</i> en explantos placentarios sobre la localización y expresión de IDO.  | 41 |
| Fig. 14. Efecto de la infección por <i>T. cruzi</i> sobre la producción de Kyn en explantos placentarios.  | 42 |
| Fig. 15. Efecto de la infección por <i>T. cruzi</i> sobre la localización y expresión de AhR.  | 43 |
| Fig. 16. Efecto de la inhibición y estimulación de la actividad de IDO sobre la degradación del L-Trp  | 45 |
| Fig. 17. Efecto de la inhibición y estimulación de la actividad de IDO sobre Kyn en el sobrenadante de explantos infectados de <i>T. cruzi</i> (Explantos + Tc) y explantos sin parásitos (Explantos). | 46 |
| Fig. 18. Efecto de la inhibición y estimulación de IDO sobre la carga parasitaria en explantos placentarios infectados con <i>T. cruzi</i> durante 24 h de infección                                   | 47 |
| Fig. 19. Efecto de la inhibición y estimulación de IDO sobre la carga parasitaria en explantos placentarios infectados con <i>T. cruzi</i> .   | 48 |
| Fig. 20. Nidos de amastigotes de explantos infectados con <i>T. cruzi</i> que fueron tratados durante 48 h.p.i con L-IMT o IFN- $\gamma$ .   | 49 |



|   |    |
|---|----|
| Fig. 21. Efecto de la inhibición y estimulación de la actividad de IDO sobre la viabilidad de explantos placentarios.   | 50 |
| Fig. 22. Efecto de la adición exógena de L-Trp sobre la actividad de IDO en homogenato de explantos placentarios infectados con <i>T. cruzi</i> y controles.          | 53 |
| Fig. 23. Efecto de la adición exógena de L-Trp sobre la concentración de Kyn en el homogenato de explantos placentarios infectados o no con <i>T. cruzi</i> .         | 54 |
| Fig. 24. Efecto de la adición exógena de L-Trp sobre la concentración de Kyn en sobrenadante de cultivo de explantos placentarios infectados o no con <i>T. cruzi</i> | 55 |
| Fig. 25. Cuantificación de carga parasitaria en explantos placentarios tratados con L-Trp.  | 56 |
| Fig. 26. Efecto de la adición exógena de L-Trp sobre la viabilidad de explantos placentarios  | 56 |
| Fig. 27. Efecto de las Kyns sobre la movilidad de Tps de <i>T. cruzi</i> .  | 57 |
| Fig. 28. Efecto de las Kyns sobre la viabilidad de explantos placentarios.  | 58 |
| Fig. 29. Cuantificación de carga parasitaria en explantos placentarios tratados con 3-HK o 3-HAA.   | 59 |
| Fig. 30. Efecto de las Kyns sobre la viabilidad de explantos placentarios infectados con <i>T. cruzi</i>  | 60 |
| Fig. 31. Expresión de IDO en placentas humanas Chagásicas.  | 62 |
| Fig. 32. Expresión de AhR en placentas humanas Chagásicas.  | 63 |
| Fig. 33. Expresión de IFN- $\gamma$ en placentas humanas Chagásicas.  | 64 |

## INDICE DE TABLAS

|  |    |
|--|----|
| Tabla. 1. Principales diferencias entre triptófano 2,3-dioxigenasa (TDO), indoleamina 2,3-dioxigenasa e indoleamina 2,3-dioxigenasa2 (IDO2). | 20 |
| Tabla. 2. Secuencias de Primers empleados para la determinación de <i>T. cruzi</i> .   | 31 |