

Participación del óxido nítrico y el  
estrés oxidativo, en las alteraciones  
estructurales de placentas humanas  
inducidas por la infección con  
*Trypanosoma cruzi in vitro*

---

Tesis para optar al título de Doctor en Ciencias Químicas

**Bioquímica**

**MARÍA FERNANDA TRIQUELL**

Director: Prof. Dr. Ricardo E. Fretes

Instituto de Biología Celular.  
Cát. de Biología Celular, Histología y Embriología.  
INICSA-CONICET.  
FACULTAD DE CS. MÉDICAS  
UNIVERSIDAD NACIONAL DE CÓRDOBA  
Córdoba, Argentina - Año 2016



**Director de Tesis**

Dr. RICARDO E. FRETES

**Comisión de Tesis**

Dra. SUSANA GEA

Dra. LAURA CERVI

Dr. FERNANDO IRAZOQUI

**Evaluador Externo**

Dra. CRISTINA NOWICKI

A mi hija Valentina

A mi compañero Esteban

A mis padres

## Agradecimientos

Quiero agradecer a todas las personas que hicieron posible que este trabajo llegue a su fin, a nivel laboral y a nivel personal. Sin la colaboración de todos ellos hubiera sido imposible que llegue hasta acá.

Primero quiero agradecer a mi familia, que me alentaron, me apoyaron incondicionalmente y me tuvieron una paciencia infinita. A mi hija Valentina, que cambió el sentido de mi vida, dándome el impulso para seguir siempre adelante y querer ser mejor persona, con su amor incondicional y alegrando cada día hizo que valga la pena las horas quitadas al sueño. A Esteban, mi compañero de fierro, en las buenas y en las malas, que me apoyó siempre sin dudar, en cada nuevo proyecto, ayudándome en todo, siendo un padre excelente y lo mas importante dándome su amor y contención. A mis padres, por ser mi ejemplo a seguir, por enseñarme a querer superarme siempre, a ser buena gente, por todo el amor y apoyo permanente. A mi hermana Cecilia, que me acompaña en las alegrías y en las tristezas, a la distancia pero siempre presente, a mis sobrinos por su amor y por entender las ausencias en los cumpleaños y eventos importantes. A mis tías Silvia y Tata por ser mis madres sustitutas en Córdoba y ser un apoyo incondicional en todos estos años.

Quiero agradecer a mi director Ricardo Fretes, que confió nuevamente en mí, por su paciencia, dedicación para enseñarme, guiarme y apoyarme en éste camino.

A mi comisión de tesis, Dra. Susana Gea, Dra. Laura Cervi y Dr. Fernando Irazoqui que hicieron aportes invaluable en este trabajo, haciendo sugerencias, críticas constructivas, donando generosamente reactivos y haciendo cada reunión de avances amena y sobre todo productiva.

A las autoridades del Instituto de Biología Celular, por permitirme realizar mi trabajo allí. A todos mis compañeros de la Cátedra de Biología Celular, Histología y Embriología, de la FCM de la UNC, por prestarme su tiempo en reiteradas oportunidades. A mis compañeras de la Cátedra de Embriología y Genética de la UNVM, por todo el apoyo y colaboración, sobre todo en esta última etapa.

A las autoridades de la Escuela de Posgrado de la Facultad de Cs Qcas. UNC, y a sus secretarías, por admitirme en la carrera y por su colaboración y eficiencia en cada paso de ella.

A los directivos de los Departamentos de Gineco-Obstetricia del Sanatorio Allende , el Hospital Privado, y la Maternidad Nacional de la ciudad de Córdoba, por haberme facilitado el acceso a su servicio para obtener las placentas; y por supuesto a las embarazadas que accedieron a participar desinteresadamente.

A mis Amigas del laboratorio (Cintia, Luciana, Mariana, María José, Evangelina, Ornella), por su ayuda invaluable tanto en lo laboral como en lo afectivo, por estar siempre dispuestas y ser generosas, sin su colaboración no hubiera podido hacer este trabajo. A mis compañeros del IBC por compartir conmigo, amistad, conocimientos y sobre todo reactivos. A Gina y Miriam por su asistencia técnica.

Y a todos los que de alguna u otra forma hicieron posible la realización de éste trabajo.

# ÍNDICE

---

ABREVIATURAS .....	10
RESUMEN .....	14
ABSTRACT .....	19
INTRODUCCIÓN PRIMERA PARTE .....	23
Placenta .....	24
Estructura .....	24
La circulación placentaria.....	27
Barrera Placentaria.....	28
Funciones de la Placenta.....	33
Óxido Nítrico.....	34
Funciones del Oxido Nítrico.....	34
Oxido Nítrico Sintasa (NOS).....	36
Generación de estrés oxidativo y nitrativo en la placenta .....	39
INTRODUCCIÓN SEGUNDA PARTE .....	41
La Enfermedad de Chagas .....	42
Curso Clínico de la enfermedad de Chagas .....	43
<i>Trypanosoma cruzi</i> : Características biológicas.....	44
Ciclo biológico .....	48
Vías de Transmisión del Chagas .....	50
Transmisión Congénita .....	51

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	58
Hipótesis.....	59
Objetivo General: .....	60
Objetivos específicos: .....	61
MATERIALES Y MÉTODOS.....	62
Materiales .....	63
Trypomastigotes.....	63
Placentas .....	63
Métodos .....	65
Cultivos.....	65
Procesamiento Histológico .....	66
Viabilidad Parasitaria .....	67
Determinación de $\beta$ -hCG en los medios de cultivo .....	67
Cuantificación de la producción de TNF $\alpha$ , sTNF-R1 y sTNF-R2.....	67
Identificación del linaje de <i>T. cruzi</i> .....	68
Cuantificación de la infección placentaria .....	68
Análisis de Producción de NO.....	71
Análisis de la expresión transcripcional y proteica de NOSe.....	72
Análisis de la producción de Nitrotirosina.....	79
Análisis de actividad de Gamaglutamil transpeptidasa .....	81
Análisis Estadístico.....	81
RESULTADOS .....	82

RESULTADOS: Sección 1.....	84
1. Expresión de la isoforma NOSe .....	84
1.1 Expresión del ARNm de la NOSe en explantos placentarios co-cultivados con dos cepas de <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	84
1.2 Análisis de la expresión proteica de NOSe.....	88
1.3 Expresión y localización histológica de la NOSe.....	89
1.4 Medición de la producción de NO por medio de la detección de nitritos en el medio sobrenadante de cultivo.....	92
CONCLUSIÓN - Sección 1.....	93
RESULTADOS - Sección 2.....	94
2.1 Análisis de la presencia de nitrotirosina en los explantos placentarios por Inmunohistoquímica.....	94
2.2 Cuantificación de la actividad de la enzima $\gamma$ GT como índice de estrés oxidativo generado en los co-cultivos placentarios.....	98
2.3 Inhibición de la producción de NO en los cultivos placentarios.....	99
2.4 Detección de formación de residuos de nitrotirosina con inhibidor de NOS (L-NAME) y con NAC .....	101
CONCLUSIÓN - Sección 2.....	104
RESULTADOS - Sección 3.....	105
3.1 Análisis morfométrico de alteraciones estructurales en co-cultivos placentarios.....	106
3.2 Concentración de $\beta$ hCG en medios sobrenadantes de co-cultivo .....	108

3.3 Análisis morfométrico de alteraciones estructurales en co-cultivos placentarios, con inhibidor de NOS (L-NAME) y con " <i>scavenger</i> " de especies reactivas de oxígeno (NAC).....	111
3.4 Análisis cualitativo del fibrinoide placentario y alteraciones estructurales	114
CONCLUSION - Sección 3.....	115
RESULTADOS - Sección 4.....	117
4.1 Niveles de TNF $\alpha$ en los medios sobrenadantes de co-cultivo .....	117
4.2 Niveles de Receptores solubles 1 y 2 en medios sobrenadantes de cultivo .....	118
CONCLUSION - Sección 4.....	119
RESULTADOS - Sección 5.....	120
5.1 Tipificación de la cepa congénita Lucky .....	120
5.2 Cuantificación de la motilidad parasitaria, a tiempo final de cultivos.....	120
5.3 Medida de la Carga parasitaria en explantos placentarios por qPCR .....	122
5.4 Carga parasitaria relativa en presencia de L-NAME y NAC.....	124
CONCLUSION - Sección 5.....	125
DISCUSIÓN .....	126
PUBLICACIONES .....	146
BIBLIOGRAFÍA.....	149

# **ABREVIATURAS**

<b>ADN</b>	Acido desoxirribonucleico
<b>ADNc</b>	Acido desoxirribonucleico copia o complementario
<b>ARNm</b>	Acido ribonucleico mensajero
<b>BH4</b>	Tetrahidrobiopterina
<b>βhCG</b>	Subunidad beta de la Gonadotropina Coriónica humana
<b>CaMs</b>	Calmodulinas
<b>CDC</b>	Centros para el Control y la prevención de Enfermedades de Estados Unidos de América
<b>CIMg</b>	Cloruro de Magnesio
<b>Ct</b>	Señal de fluorescencia o de amplificación
<b>CTB</b>	Citotrofoblasto
<b>DAB</b>	DiAminoBencidina
<b>dNTPs</b>	Desoxirribonucleótidos trifosfato
<b>DO</b>	Densidad Óptica
<b>DTU</b>	Unidad Discreta de Tipificación
<b>ECL</b>	Enzymatyc chemiluminiscence (Quimioluminiscencia enzimática)
<b>EDTA</b>	Ácido etilendiaminotetraacético
<b>ELISA</b>	Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay (Enzimoimmunoensayo)
<b>ERO</b>	Especies Reactivas de Oxígeno
<b>EUA</b>	Estados Unidos de América
<b>FAD</b>	Flavín Adenín Dinucleótido
<b>FDA</b>	Food and Drug Administration (Agencia de Alimentos y Medicamentos)
<b>Fig.</b>	Figura
<b>FMN</b>	Flavín Mono Nucleótido
<b>GADPH</b>	Gliceraldehído Fosfato Deshidrogenasa
<b>gDNA</b>	ADNg ácido desoxirribonucleico genómico
<b>γGT</b>	Gama glutamil transpeptidasa
<b>GSH</b>	Glutatión
<b>H<sub>2</sub>O</b>	Agua
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	Peróxido de Hidrógeno
<b>H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub></b>	Ácido Fosfórico
<b>HEM</b>	grupo hemo,
<b>HRP</b>	horseradish peroxidase (peroxidasa de rábano)
<b>IFN<sub>γ</sub></b>	Interferón gama
<b>IFPE</b>	
<b>IgG</b>	Inmunoglobulina G
<b>IHC</b>	Inmunohistoquímica
<b>KDa</b>	Kilodalton
<b>L</b>	Litros
<b>L-NAME</b>	N <sup>G</sup> -nitro-L-arginina-metil-éster
<b>L-NOARG</b>	N <sup>ω</sup> -nitro-L-arginina
<b>mg</b>	miligramos
<b>Min.</b>	Minutos

<b>ml</b>	Mililitros
<b>M-MLV RT</b>	Transcriptasa Reversa del virus Moloney de la Leucemia Murina
<b>NADP</b>	Nicotinamida Adenina Dinucleótido Fosfato
<b>NADPH</b>	Nicotinamida Adenina Dinucleótido Fosfato reducida
<b>NaNO<sub>2</sub></b>	Nitrito de Sodio
<b>NED</b>	Naftiletilendiamina
<b>nm</b>	nanomoles
<b>NO</b>	Oxido Nítrico
<b>NOS</b>	Oxido Nítrico Sintasa
<b>NOS<sub>e</sub></b>	Oxido Nítrico Sintasa endotelial
<b>NOS<sub>i</sub></b>	Oxido Nítrico Sintasa inducible
<b>NOS<sub>n</sub></b>	Oxido Nítrico Sintasa neuronal
<b>OMS (WHO)</b>	Organización Mundial de la Salud (World Health Organization)
<b>ONOO<sup>-</sup></b>	Peroxinitrito
<b>PAGE</b>	PolyAcrylamide Gel Electrophoresis (electroforesis en gel de poliacrilamida)
<b>PAS</b>	Peryodic Acid Schiff
<b>PCR</b>	Reacción en cadena de la polimerasa
<b>pg</b>	Picogramos
<b>PKD (buffer)</b>	Proteinase K Digestion Buffer
<b>PVDF</b>	Polifluoruro de vinilideno
<b>RBC (buffer)</b>	Red Blood Cell lysis buffer
<b>ROS</b>	Especies reactivas de oxígeno
<b>RPE (buffer)</b>	Buffer de lavado de membrana
<b>RPMI 1640</b>	Medio de cultivo comercial (creado por Moore en 1966, en el Roswell Park Memorial Institute)
<b>RT-PCR</b>	Reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa
<b>SAC</b>	S-Acetylcysteine (S-acetilcisteína)
<b>SBF</b>	Suero Bobino Fetal
<b>SCAR</b>	Sequence Characterized Amplified Region (secuencias caracterizadas específicas utilizadas para mapeos de genes)
<b>SDS</b>	Dodecil Sulfato Sódico
<b>SOD</b>	Superóxido Dismutasa
<b>STB</b>	Sinciciotrofoblasto
<b>sTNF-R1</b>	Receptor Soluble 1 del Factor de Necrosis Tumoral
<b>sTNF-R2</b>	Receptor Soluble 2 del Factor de Necrosis Tumoral
<b><i>T. cruzi</i></b>	Trypanosoma cruzi
<b>TAE (buffer)</b>	Buffer Tris, acetato y EDTA
<b>TBS (buffer)</b>	Buffer Salino de Tris
<b>TLB (buffer)</b>	Buffer de Lisis Tris
<b>TNF<math>\alpha</math></b>	Factor de Necrosis Tumoral alfa
<b>Tris-HCl</b>	Buffer Tris – Acido Clorhídrico
<b>v/v</b>	Volumen/volumen

$\mu\text{l}$   
 $\mu\text{m}$

microlitros  
micrómetros

# RESUMEN

## Resumen

La placenta es un órgano fundamental para el desarrollo fetal, posee diferentes funciones, transferencia de nutrientes, desechos y gases, metabólicas, inmunológicas, entre otras. Fisiológicamente su estado oxidativo es elevado debido a la alta tasa metabólica que posee, estos niveles de estrés oxidativo se ven exacerbados en diferentes patologías, como las infecciosas. El *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*) agente causal del Chagas, puede ser transmitido en un bajo porcentaje de la madre al feto a través de la placenta. El óxido nítrico (NO) es uno de los principales agentes deletéreos contra *T. cruzi* y la placenta lo produce a través de la enzima Oxido Nítrico Sintasa endotelial (NOSe), que se localiza en el sinciotrofoblasto de manera importante. Trabajos previos del laboratorio han demostrado niveles de NO deletéreos para *T. cruzi* en el espacio intervelloso de la placenta humana. Por lo tanto, nuestro objetivo es Identificar factores placentarios que participan en la invasión y/o infección por *Trypanosoma cruzi* y mecanismos relacionados que participan en la integridad estructural y funcional de la barrera placentaria conducente a la enfermedad de Chagas congénita. Los Objetivos Específicos son: 1- Determinar modificaciones de la expresión de NOSe, enzima productora de óxido nítrico, inducida por formas infectivas de *Trypanosoma cruzi*, *in vitro*. 2- Determinar la influencia de la carga parasitaria y la cepa de *Trypanosoma cruzi* en el estado de estrés oxidativo de los explantos placentarios en los co-cultivos *in vitro*. 3- Analizar posibles alteraciones estructurales vellositarias en presencia de las distintas cepas y cargas parasitarias de *Trypanosoma cruzi* y su relación con el estrés oxidativo. 4- Analizar la modificación o la influencia de las dos cepas de *Trypanosoma cruzi* en la producción de TNF $\alpha$  y sus receptores solubles en los co-cultivos e placentarios. 5-

Cuantificar la infección del tejido placentario modificada por la cepa del parásito y dosis del inóculo, modulada por agentes deletéreos placentarios

Material y Métodos: Explantos de vellosidades coriónicas de placentas humanas (n=10) provenientes de embarazadas normales y serológicamente negativas para enfermedades infecto-contagiosas, se co-cultivaron por 24 hs sin parásitos (control) y con  $1 \times 10^6$  y  $1 \times 10^5$  trypomastigotes de dos poblaciones de *T. cruzi*, cepas Tulahuen y Lucky (aislada de un caso congénito). Tulahuen pertenece a linaje DTU VI y Lucky fue tipificada en colaboración en laboratorio de Dr. Schijman (INGEBI-CONICET). Dichos cultivos recibieron diferentes tratamientos de acuerdo al objetivo. Resultados según objetivos: Lucky corresponde a DTU II/VI. Altas dosis de parásitos vivos incrementa el ARN (RT-PCR relativa) y proteína de NOSe (western blot e inmunohistoquímica con cuantificación por área marcada e intensidad) en forma significativa. Explantos tratados con parásitos inactivados y en experimento independiente con  $H_2O_2$  también incrementan NOSe pero en menor magnitud. Nitritos en el medio sobrenadante de cultivo aumentó con las mayores dosis de parásitos pero sin significación estadística. Debido al aumento significativo de NOSe pero sin aumento significativo de nitritos, orientó a la formación de peroxinitritos, motivo del siguiente objetivo. El estado de estrés oxidativo, determinado por inmunohistoquímica y cuantificación de área marcada e intensidad, incrementó significativamente con las dos cepas sobre el control y principalmente con el mayor inóculo de  $10^6$  parásitos que fue significativo incluso sobre la dosis de  $10^5$  parásitos. La medición de gamma glutamil transpeptidasa ( $\gamma$ GT) como índice de estrés oxidativo, incrementó significativamente sobre el control y sobre la dosis de  $10^5$  parásitos. El aumento de estrés oxidativo inducido por *T. cruzi* desapareció con los inhibidores de NOSe y de estrés oxidativo, empleando L-NAME y NAC. Estos resultados orientaron a cuantificar posibles lesiones de la barrera placentaria. El estudio estructural incluyó desprendimientos de

sinciciotrofoblasto (STB) fueron significativamente mayores con la dosis de  $10^6$  de *T. cruzi*. La dosis de  $10^5$  no tuvo diferencias sobre el control sin parásitos. Este efecto fue similar en explantos sin parásito tratados con 200  $\mu\text{M}$  y 500  $\mu\text{M}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Los desprendimiento de STB inducidos por *T. cruzi* se revierten significativamente con tratamientos con L-NAME (0,1 y 1 mM) y NAC (5 y 10 mM). Se constató alteración funcional de la barrera placentaria mediante disminución significativa de  $\beta\text{hCG}$  en medio sobrenadante con la dosis de  $10^6$  de parásitos y con 200  $\mu\text{M}$  y 500  $\mu\text{M}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$ . La presencia de *T. cruzi* induce modificaciones del fibrinoide tipo fibrina y tipo matriz del estroma de la vellosidad coriónica, efecto no observado con 200  $\mu\text{M}$  y 500  $\mu\text{M}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$ . La expresión de NO puede ser gatillada como respuesta inflamatoria innata y por ello se determinó  $\text{TNF}\alpha$  y sus Recetores 1 y 2 en los medios sobrenadantes de cultivos.  $\text{TNF}\alpha$  incrementa significativamente con dosis de  $10^6$  de *T. cruzi* y con ambas cepas. Receptores 1 y 2 disminuyen ( $p < 0.05$ ) con Lucky y tienden a disminuir con Tulahuen. Estos resultados pueden condicionar el nivel de infección de la vellosidad coriónica. Por ello se cuantificó infección mediante qPCR. La carga parasitaria en los explantos placentarios es mayor ( $p < 0.05$ ) cuando el inóculo fue de  $10^6$  sobre  $10^5$ . Con L\_NAME (0,1 y 1 mM) y NAC (5 y 10 mM) se observa una tendencia a aumentar sin ser significativo.

Podemos concluir que el *Trypanosoma cruzi* estimula la expresión de la enzima NOSe que se localiza principalmente en el STB que es la primera barrera placentaria. Este estímulo es dependiente de la cantidad de parásitos del inóculo, observándose un incremento estadísticamente significativo, de casi dos veces sobre el control en presencia de  $10^6$  trypomastigotes. El tejido placentario in vitro exagera su estado de estrés oxidativo y nitrosativo en presencia del *T. cruzi*, lo que corrobora por el aumento de residuos de nitrotirosina en las vellosidades coriónicas y por el aumento de la enzima  $\gamma$ glutamiltanspeptidasa, siendo una respuesta dosis dependiente,

cuando la carga parasitaria es muy elevada (comparable con una infección con alta parasitemia) pero también se observa con las cargas parasitarias menores (baja parasitemia). Dentro de los responsables de los daños estructurales en la placenta en presencia de *T. cruzi*, podemos señalar al NO y sobre todo a los peroxinitritos, ya que pudimos observar que cuando disminuye la producción de los mismos utilizando los tratamientos con L-NAME y NAC, los daños estructurales encontrados fueron menores. El incremento de TNF $\alpha$  como respuesta innata, puede generar el aumento de NO con las consecuencias de estrés oxidativo y alteraciones estructurales y funcionales de la barrera placentaria. Podemos concluir que la infección del tejido placentario es directamente proporcional a la cantidad de parásitos que se encuentran en el sobrenadante placentario, demostrando que si bien se observan algunas diferencias biológicas, (como la sobrevivencia analizada como motilidad parasitaria), no se observa una diferencia significativa entre ambas cepas en cuanto a la infección de los explantos placentarios. La dosis de inóculo de parásitos dispara mecanismos que modifican la infección y respuesta del tejido placentario en sus etapas iniciales de infección, en donde el NO pudiera participar en el control de la infección.

# **ABSTRACT**

## ABSTRACT

The human placenta fulfills vital functions in human pregnancy allowing the development of the unborn child, through transference of nutrients, waste and gases, metabolic and immunological roles and secreting hormones, among others. Placenta has an oxidative status due its high metabolic rate. This oxidative stress is increased by several pathologies, such as infections. *Trypanosoma cruzi* is the causal agent of the Chagas disease. The incidence of transmission from mother to unborn child through placenta is low.

Nitric oxide (NO) is one of the most important deleterious agents against *T. cruzi* and the placenta produces it by Nitric Oxide Synthase which is located mainly in the syncytiotrophoblast (STB), the first structure of the placental barrier. Previous data from the lab has showed that NO has deleterious levels in the intervillous space of the human placenta. Therefore, our objective was to identify placental factors that participate in the invasion and/or infection of placental tissue by *T. cruzi* and the mechanisms that participate in the structural and functional indemnity of the placental barrier. Specific objectives: 1. To determine modifications in the transcriptional and proteic expression of eNOS, the enzyme that produces nitric oxide (NO), induced by infective forms of *T. cruzi* in vitro. 2. To determine the influence of the parasite load and the strain of the *T. cruzi* in the production of oxidative stress in placental explants cultured in vitro. 3. To analyze possible structural and functional alterations of the placental barrier induced by *T. cruzi* in relation with oxidative stress status. 4. To analyze the effect of the two strains of *T. cruzi* on the production of TNF $\alpha$  and their receptors in the culture media. 5. To quantify the infection of the placental tissue modify by the strain and load of the parasite, which could be modulated by deleterious placental agents.

Material and Methods: Chorionic villi explants from human placentas (n=10) were obtained from clinical and serologically healthy pregnant women. Placental explants were co-cultured for 24 hs without parasites (control) and with  $1 \times 10^5$  and  $1 \times 10^6$  trypomastigotes of two strains of *T. cruzi*, Tulahuen and Lucky. Tulahuen belongs to DTU VI and Lucky (isolated from a congenitally infected newborn) was typified in collaboration with Dr. Schijman (INGEBI-CONICET) and belongs to DTU II/VI. These cultures were treated with different conditions. Results: Lucky belongs to DTU II/VI. The highest inocula of live parasites increase the NOSe RNA (RT-PCR) and protein (Western blot and immunohistochemistry) significantly. Placental explants treated with inactivated parasites and  $H_2O_2$  increased NOSe but in a lower fashion. Nitrites increased in the culture media but in a non significant level. These results point out to those nitrites could be generating peroxy-nitrites. The oxidative stress was determined by immunohistochemistry with quantification of intensity and area of marks. Nitrosylated proteins increased in an important manner, with two strains and with two dosis of parasites, but mainly with  $10^6$  inocula over  $10^5$  and control. Gamma glutamil transpeptidase, as a measure of oxidative stress, increased significantly. The increment of oxidative stress induced by *T. cruzi* diminished with NOSe and oxidative stres inhibitors, L-NAME and NAC. These results point out to quantify possible alterations of the placental barrier. Detachment of STB was significantly highest with  $10^6$  inocula over  $10^5$  parasites which do not have any significant differences with control (explants without parasites). Detachment was similar to  $10^6$  inocula when explants without parasites were treated with 200  $\mu M$  y 500  $\mu M$  of  $H_2O_2$  but detachment did not occurred when explants were treated with L-NAME (0,1 and 1 mM) and NAC (5 and 10 mM). Significantly decreased levels of  $\beta hCG$  were found in the culture media when explants were treated with  $10^6$  parasites and 200  $\mu M$  and 500  $\mu M$  of  $H_2O_2$ , pointing out to functional alteration of the placental barrier. *T. cruzi* also induced modification

in the deposits of fibrinoids in the stroma of the chorionic villi, effect that was not observed with 200  $\mu\text{M}$  y 500  $\mu\text{M}$  of  $\text{H}_2\text{O}_2$ . The increased level of NO could be triggered by innate inflammatory answer.  $\text{TNF}\alpha$  increased ( $p < 0.05$ ) in the cultura media with inoculla of  $10^6$  parasites, while Receptors 1 and 2 decreased also in a significantly manner with Lucky. These results could modify the infection of the placental tissue. Thus, we quantified parasite load in explants by qPCR. It was highest when inoculla was 106 parasites ( $p < 0.05$ ) over the 105 parasites. When explants were treated with L-NAME (0,1 and 1 mM) and NAC (5 and 10 mM), there was a non significant increased quantity of parasites in the placental explants.

We can conclude that *T. cruzi* induce the expression of eNOS which is located at STB, the first structure of the placental barrier. This effect depends on the parasite load in the intervilli space. Placental tissue increase its oxidative stress status according to the quantity of parasites of the inoculla, which could be associated with high and low parasitemias in the mother blood, which in turn alters the placental barrier, structurally and functionally. The  $\text{TNF}\alpha$  increment as an innate inflammatory answer could trigger increased NO generating peroxynitrites, which alters the normal structure and function of the placental barrier. The infection of the placental tissue is related to the quantity of parasites in the intervilli space. Therefore, the load of parasites that arrive to placenta modify mechanisms which in turn could modify the infection of the placental tissue by *T. cruzi* in their initial process.

# **INTRODUCCIÓN PRIMERA PARTE**

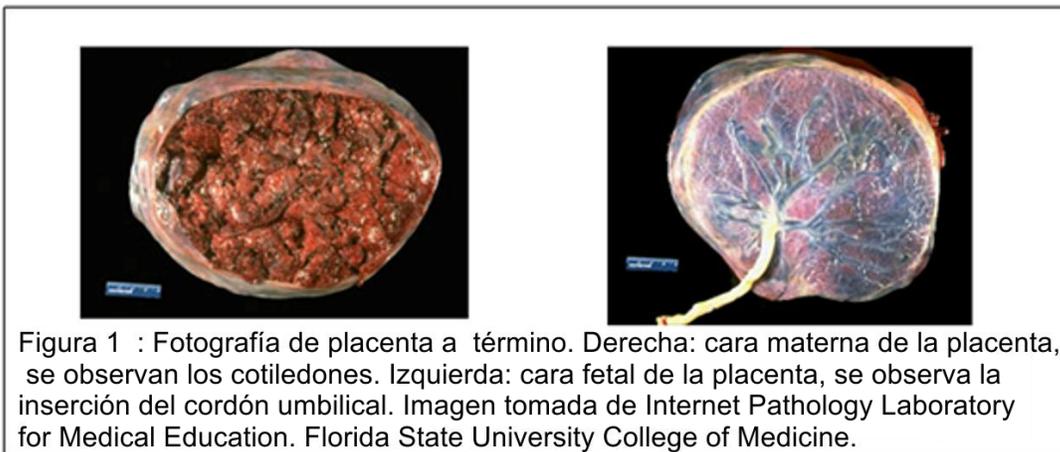
# Placenta

La placenta tiene un papel crucial en el embarazo tales como ser interfaz entre la madre y el feto, mediante sus funciones de intercambio de gases, nutrientes y desechos, en la síntesis y secreción de hormonas esteroides y péptidos, así como proporciona una barrera inmunológica entre la madre y el feto semi-alogénico (Myatt 2010).

## Estructura

La palabra placenta deriva del término plakois: torta, que se refiere a la forma de disco típica de la especie humana. La placenta es un órgano transitorio que relaciona estrechamente al feto con su madre y atiende las necesidades de respiración, nutrición y excreción del mismo durante su desarrollo. La placenta es expulsada en el momento del alumbramiento.

La placenta humana es de tipo hemocorial (o discoidal), lo que quiere decir que el tejido fetal penetra el endometrio hasta el punto de estar en contacto con la sangre materna. Este tipo de placenta la presentan todos los primates y los roedores. Sin embargo, entre los mamíferos existen otros tipos de placenta, como la endoteliocorial, la sindesmocorial y la epiteliocorial.



La placenta está compuesta por una porción fetal (formada por el corion) y una porción materna (formada por la decidua basal). Las dos porciones participan en el intercambio fisiológico de sustancias entre las circulaciones materna y fetal (Ross 2008).

La placenta a término es discoide, tiene un diámetro de 15 a 25 cm y aproximadamente 3cm de espesor, y pesa alrededor de 500 g. Luego que la placenta es expulsada se observa, con claridad en la cara materna de 15 a 20 zonas algo salientes, los cotiledones, cubiertos por una delgada capa de decidua basal. Los surcos que separan a los cotiledones son formados por los tabiques deciduales. Los tabiques placentarios no se fusionan con la placa coriónica, por lo que la sangre materna puede circular libremente entre un cotiledón y sus vecinos. (Fig 1)

La superficie fetal de la placenta está cubierta por completo por la lámina coriónica. Se observan arterias y venas de grueso calibre, los vasos coriónicos, que convergen hacia el cordón umbilical. A su vez, el corion está cubierto por el amnios (T.W. Sadler 2010).

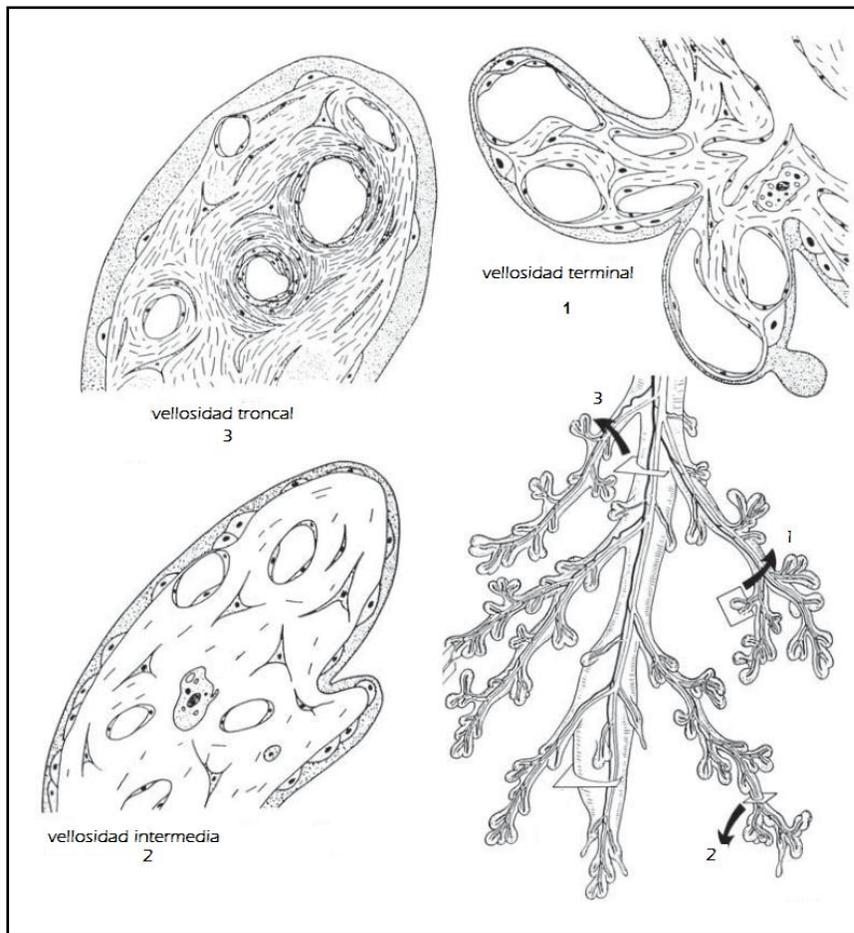
### **Tipos de vellosidades**

En las placentas maduras podemos identificar distintos tipos de vellosidades, las que tienen características estructurales y funcionales propias, las mismas se describen a continuación (Figura 2).

*Stem villi o vellosidades madre (vellosidades 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 o arteriolas y vénulas dependiendo de su localización

Intermediate villi o vellosidad intermedia: 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.

Terminal villi o vellosidad terminal: Son las ramificaciones finales, en forma de racimo, de las vellosidades intermedias maduras, se caracterizan por su abundante capilarización, y por la presencia de sinusoides altamente dilatados, representan el principal sitio de intercambio materno-fetal.

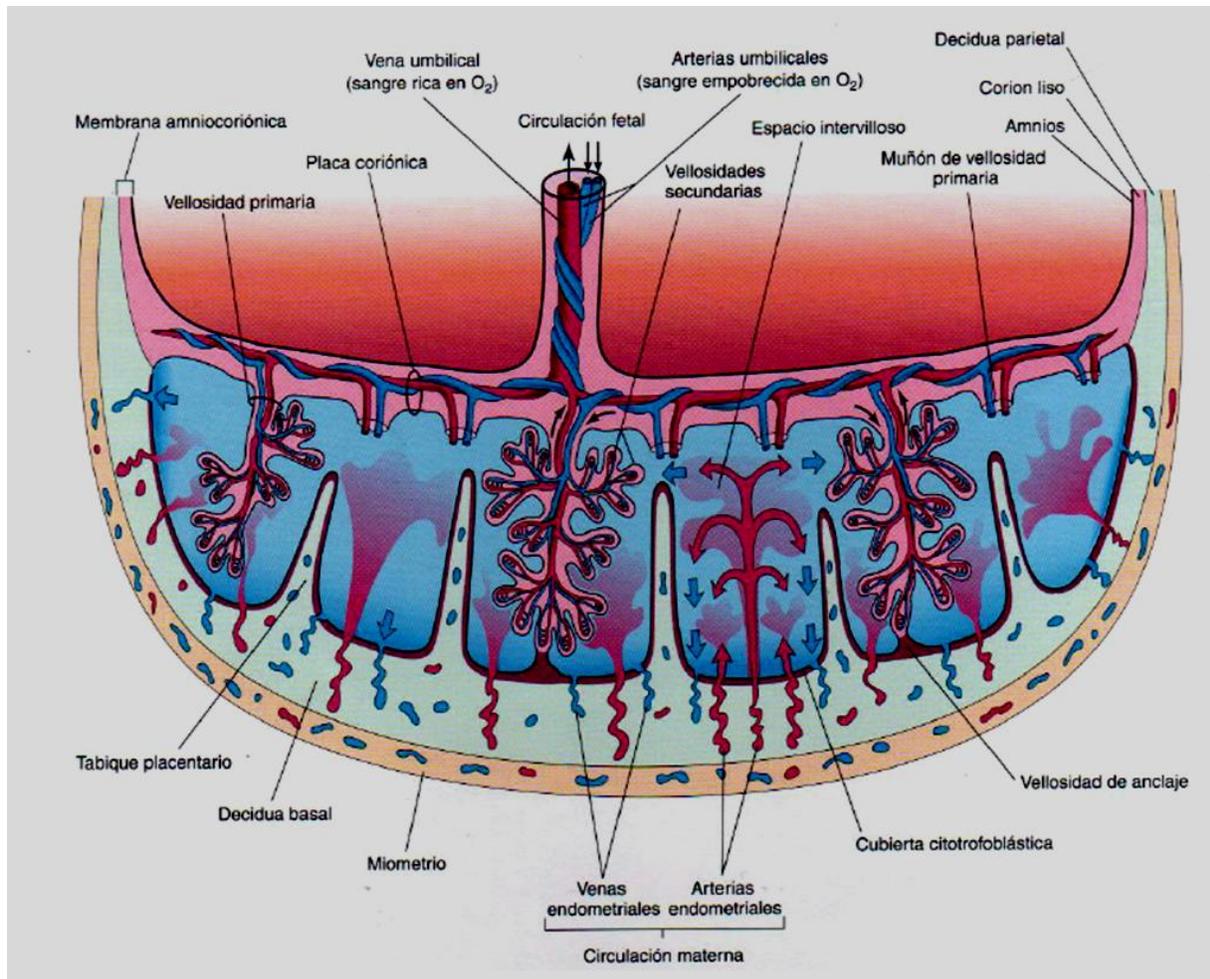


**Figura 2 Tipos de vellosidades.** 1 Vellosidad terminal, 2 Vellosidad intermedia y 3 Vellosidad troncal, extraído de (Benirschke et al. 2015)

## La circulación placentaria

Está integrada por la circulación fetal placentaria y la circulación materna placentaria. La placenta es un órgano vascular único que recibe los suministros de sangre tanto materna como fetal y por lo tanto tiene dos sistemas circulatorios separados: (1) circulación de la sangre materno-placentaria (uteroplacentario), y (2) circulación sanguínea feto-placentaria (fetoplacentaria). La circulación uteroplacentaria comienza con el flujo de la sangre materna en el espacio intervelloso por las arterias espiraladas deciduales. El intercambio de oxígeno y de nutrientes se produce cuando la sangre materna fluye alrededor de las vellosidades terminales en el espacio intervelloso. La sangre arterial materna que ingresa en el espacio intervelloso empuja la sangre desoxigenada hacia las venas endometriales uterinas y luego regresa a la circulación materna. La circulación fetal-placentaria permite que las arterias umbilicales lleven sangre fetal desoxigenada y pobre de nutrientes del feto a los vasos fetales centrales vellosos. Tras el intercambio de oxígeno y nutrientes, la vena umbilical transporta sangre oxigenada y rica en nutrientes que circula de nuevo a la circulación sistémica del feto. Al término del embarazo, en el espacio intervelloso la cantidad de sangre materna es aproximadamente de 150 ml y el flujo sanguíneo materno que llega a la placenta es de 475 mL/min (Fretes & Kemmerling 2012; Sadler 2016). Se estima que el área superficial de sincitiotrofoblastos es de aproximadamente  $12\text{m}^2$  (Ellery et al. 2009) y la longitud de los capilares fetales de la placenta a término plenamente desarrollado es de aproximadamente 320 kilómetros (Jackson et al. 1992) (Ross 2008).

La unidad funcional de intercambio materno-fetal de oxígeno y nutrientes se producen en las vellosidades terminales a través de la barrera placentaria. No se produce mezcla de sangre materna y fetal en la placenta. La Figura 3 ilustra la relación del útero, la placenta y el feto, y las direcciones del flujo sanguíneo de la madre a la placenta, así como el flujo de sangre fetal de la placenta al feto.



**Figura 3** Esquema de un corte transversal de la placenta, donde se puede observar la circulación placentaria. (Moore et al. 2013) Moore Embriología Clínica, pág. 126. 7ª Edición.

## Barrera Placentaria

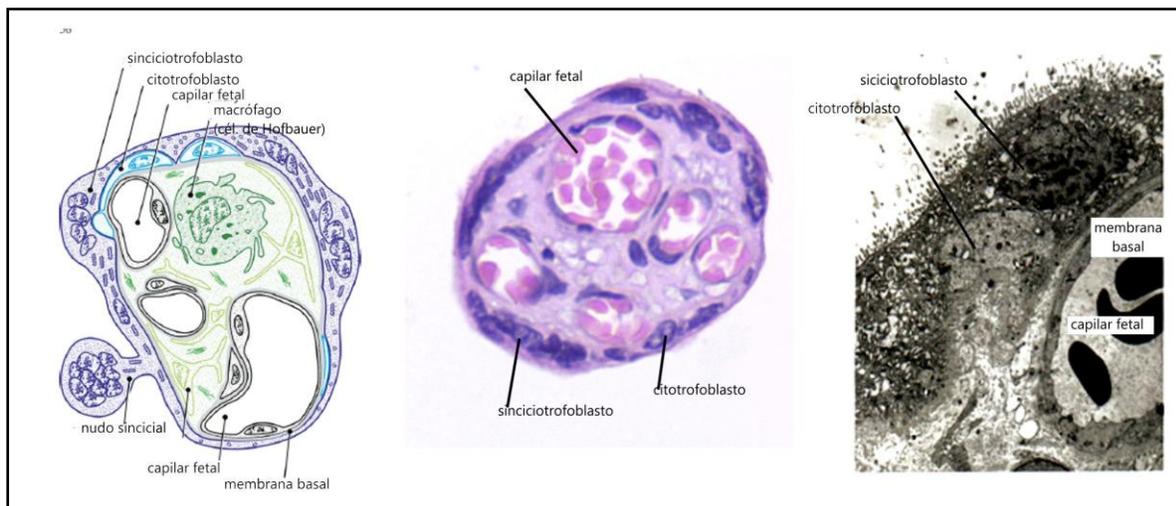
La separación de la sangre fetal y materna, que se conoce como barrera placentaria, es mantenida principalmente por las capas de tejido fetal. A partir del cuarto mes estas capas se van tornando muy delgadas para facilitar el intercambio de productos a través de la barrera placentaria, mientras el feto va creciendo. El adelgazamiento de la pared de la vellosidad se debe en parte a la disminución proporcional de la capa citotrofoblástica interna y al acercamiento de los capilares fetales al trofoblasto.

La barrera placentaria está formada por:

- Una capa continua de sincitiotrofoblasto (STB) (que cubre la superficie de las vellosidades y delineando así el espacio intervelloso).
- Una capa discontinua de citotrofoblasto (CTB) (continua hasta el segundo trimestre)
- Lámina basal del trofoblasto
- Tejido conjuntivo (mesenquimático) de la vellosidad
- Lámina basal del endotelio
- Endotelio de los capilares placentarios fetales en la vellosidad terciaria

(Figura 4) (Ross 2008) (Benirschke et al. 2015)

Las vellosidades coriónicas terciarias, unidad estructural y funcional de la placenta, poseen vasos sanguíneos fetales, un núcleo de tejido conectivo laxo (embrionario o mesenquimático), con fibroblastos y células de Hofbauer. Además, el trofoblasto, compuesto por el STB y el CTB recubre las vellosidades en su parte externa y contacta con el espacio intervelloso (Figura 4)



**Figura 4 Vellosidad coriónica donde observamos la barrera placentaria**, esquema modificado de (Benirschke et al. 2015), fotografías de M.O. y M.E. tomadas en nuestro laboratorio

Las células del CTB tienen un tamaño muy variable, por lo general son células grandes claras núcleo central redondo y se colorea débilmente.

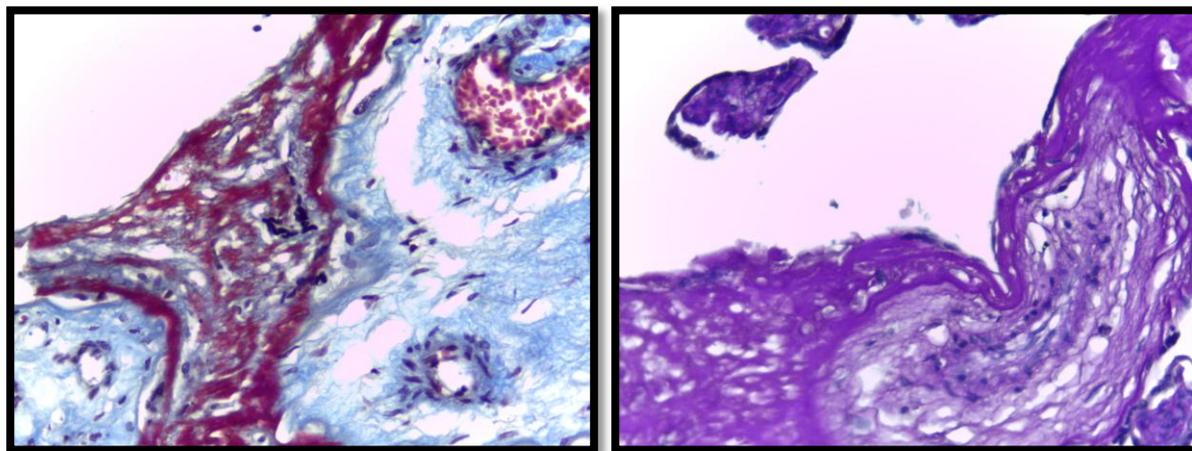
El STB es una masa citoplasmática multinucleada con núcleos pequeños (o más pequeños). La capa varía en espesor, se hace más delgada durante el transcurso del

embarazo. Con microscopía electrónica se observan abundantes microvellosidades sobre la superficie apical (Figura 4). Además el citoplasma superficial contiene numerosas vacuolas, como expresión de la función absorptiva. Se encuentran muchas vesículas recubiertas, como expresión de endocitosis mediada por receptor. Posee también un Retículo Endoplasmico Rugoso bien desarrollado y complejo de Golgi (Geneser 2000; Demir 1979).

La placenta, como órgano en desarrollo, experimenta la remodelación de tejidos constante, que se caracteriza por la pérdida funcional de las células trofoblásticas por apoptosis. Después de la proliferación y diferenciación en subtipos específicos de células, el trofoblasto envejecido es eliminado en forma selectiva y es reemplazada por una población de trofoblasto más joven sin afectar a las células vecinas. El CTB de la vellosidad coriónica es considerado como una célula madre desde la cual se renueva la capa trofoblástica. El CTB sufre procesos de división celular. Las células resultantes se diferencian y se fusionan con el STB pre-existente (Mayhew et al. 1999). Esta masa celular de STB en algunas zonas de las vellosidades forma agregados nucleares o nudos sinciciales, sobresalen hacia el interior de los espacios intervellosos, se desprenden y son arrastrados por la circulación materna, donde son digeridos enzimáticamente. De esta forma el STB se va renovando con el aporte de nuevos núcleos por parte del CTB (Geneser 2000). En dicha regeneración participa el fibrinoide placentario, el cual se puede identificar por sus distintas características tintoriales y morfológicas.

El Fibrinoide Placentario es histológicamente acelular, homogéneo, acidófilo y brillante, y se puede encontrar tanto en placentas normales como patológicas, en cualquier estadio del embarazo.

Estudios previos han descrito al fibrinoide placentario como un material degenerativo, cuya presencia denotaba procesos patológicos y envejecimiento placentario. Actualmente se lo reconoce como un constituyente normal de la placenta humana y la importancia que se le asigna es principalmente morfogénica e inmunológica y no tanto degenerativa.



**Figura 5: Fibrinoide intravellositario 40X.** Foto tomada en nuestro laboratorio. Derecha: Fibrinoide teñido con PAS, se observa por debajo del sinciotrofoblasto. Izquierda: con la coloración de MASSON se puede observar que es un fibrinoide tipo fibrina.

Los subtipos de fibrinoide descritos son en gran medida idénticos, siendo sus diferencias insignificantes. Actualmente, el clásico término histológico "fibrinoide" comprende dos matrices extracelulares que difieren en cuanto a estructura, composición y función: el fibrinoide tipo fibrina y el fibrinoide tipo matriz.

El fibrinoide tipo fibrina está histológicamente libre de células trofoblásticas, compuesto principalmente por fibrina, restos degenerativos de células sanguíneas, plaquetas y pueden encontrarse restos de sinciotrofoblasto incluidos o unidos a él. Con la tinción tricrómica de Masson se observa de color rojo a naranja. Rodea el espacio intervilloso en aquellos sitios donde no hay revestimiento de STB ni de endotelio materno, reemplazando localmente el sinciotrofoblasto en la superficie vellositaria (Kaufmann et al. 1996). Según Nelson et al. (1990) la correlación de

pequeñas áreas de fibrinoide reemplazando el STB son hallazgos normales en cada placenta normal a término y corresponden al 7% de la superficie vellosa a término, por lo que sugieren que la interacción fibina-trofoblasto puede modular la diferenciación trofoblástica (Nelson et al. 1990).

Sus funciones implicarían adaptar el espacio intervelloso para optimizar el flujo sanguíneo y para controlar el crecimiento del árbol vellositario, encerrando las nuevas ramas vellositarias que causan estasis o turbulencia en la sangre materna. También cumple un rol en los mecanismos de reparación celular, aunque esto se halla aún en debate. Si bien se concluyó que el depósito de fibrina podría ser necesario para la reepitelización del trofoblasto vellosito discontinuo, esto resulta incompatible con el hecho de que las células trofoblásticas que sobreviven a la degeneración local del trofoblasto por debajo de coágulo sanguíneo, no están en directo contacto con el fibrinoide tipo fibrina, sino que están separadas por una capa de fibrinoide tipo matriz, ni tampoco muestran señal alguna de fusión sincicial. Por tal razón, se piensa que probablemente no sea el fibrinoide tipo fibrina en sí mismo el que estimula los mecanismos de reparación trofoblástica como la proliferación, migración y fusión sincicial, sino más bien el fibrinoide tipo matriz secretado por el trofoblasto, secreción que fue iniciada posiblemente por los productos de coagulación sanguínea que se encontraban debajo, y posiblemente estaría envuelto en un proceso de transferencia materno-fetal (Kaufmann et al. 1996).

El fibrinoide de tipo matriz es secretado por células del trofoblasto extravelloso, el cual encierra células trofoblásticas y no está en contacto con la sangre materna o fetal, siempre está separado de ésta por fibrinoide tipo fibrina. Con la tinción tricrómica, se tiñe de azul o verde claro, por tener mayor afinidad por el colágeno.

Se encuentra en la placa coriónica, en el centro de los islotes celulares y del septo placentario, en forma generalizada en la placa basal, en la profundidad de las partes invasivas de las columnas de células trofoblásticas, en las superficies vellosas formando las capas profundas del fibrinoide perivelloso y rodeando células trofoblásticas remanentes.

Numerosos autores discutieron sobre una función inmunológicamente protectora del fibrinoide, sin embargo, aún no está claro si estas consideraciones son válidas para el fibrinoide tipo fibrina o el tipo matriz. Se piensa que moléculas como el heparán sulfato y los proteoglicanos sialilados proveerían inmunoprotección al enmascarar antígenos fetales y por lo tanto al prevenir el reconocimiento por células maternas (Kaufmann et al. 1996).

### **Funciones de la Placenta**

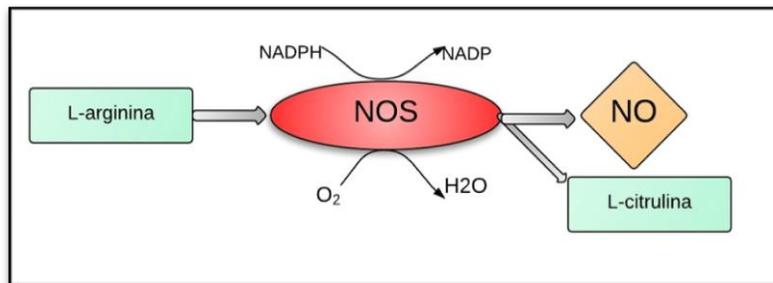
La placenta permite la interacción entre el feto y la madre para promover el crecimiento fetal y su viabilidad mientras preserva el bienestar materno. Realiza múltiples funciones, actuando como los pulmones, los riñones, y los sistemas gastrointestinal, endócrino e inmune del feto; además protege al feto del sistema inmune de la madre.

La placenta asegura el mantenimiento de un embarazo saludable por medio de la síntesis y la secreción de hormonas, por las células placentarias derivadas del cigoto a la circulación materna, que influencia el metabolismo materno para beneficio del feto (Pijnenborg et al. 1981; McParland & Pearce 1988; Kam et al. 1999; Handwerger & Freemark 2000) Hay también fuerte evidencia de que la placenta promueve la supervivencia del feto manteniendo el útero en una óptima condición fisiológica, permitiéndole al feto permanecer dentro del mismo la cantidad de tiempo necesario.

Para mantener la regulación hemodinámica en la interfase materno fetal, la placenta produce constitutivamente Oxido Nítrico (NO) a través de la enzima Oxido Nítrico Sintasa (NOS), que se encarga del tono basal de la vasculatura de la circulación feto placentaria, atenuando la acción de vasoconstrictores como la endotelina-1 y tromboxano.

## Óxido Nítrico

El radical libre Oxido Nítrico (NO) o monóxido de Nitrógeno, es una molécula de bajo peso molecular (30 kDa), es generado por el metabolismo de la L-arginina por la enzima Oxido Nítrico Sintasa (NOS)(Moncada & Higgs 1992), de la que hay tres isoformas (Lowenstein et al. 1994). Tiene la capacidad de difundir 30 a 100  $\mu\text{m}$  (Vaughn et al. 1998), puede atravesar las membranas biológicas y cumplir su función fuera de la célula.



**Figura 6** Esquema de la producción de NO por la enzima NOS (Oxido Nítrico Sintasa)

## Funciones del Oxido Nítrico

El Oxido Nítrico es considerado como uno de los reguladores claves en una variedad de funciones, participa en muy diversos procesos como la regulación del tono vascular (endotelio), la neurotransmisión (sistema nervioso central y periférico) y la citotoxicidad mediada por células (macrófagos y neutrófilos). Cuando es liberado por células endoteliales, actúa como un vasodilatador regulando la presión sanguínea, mientras inhibe la adhesión plaquetaria.

El NO tiene varios mecanismos de acción, entre ellos, la nitrosilación de grupos Fe-S prostéticos haciendo perder la función de enzimas que contienen ese grupo (James & Hibbs 1990; Liew et al. 1997); a nivel de la cadena respiratoria en mitocondria, inactivando los complejos I y II del transporte de electrones e inactivando la "aconitasa" del ciclo de Krebs; la enzima ribonucleótido reductasa implicada en la síntesis de ADN.

Estudios previos han demostrado que el NO ejerce un rol fundamental contra diversos microorganismos, entre ellos los parásitos (Clark & Rockett 1996). Se ha demostrado que la presencia del parásito gatilla, la producción de NO en macrófagos, que, junto con las especies reactivas del oxígeno ( $O_2^-$ ,  $H_2O_2$ ,  $OH^-$ ) forman peroxinitritos, que son altamente tóxicos para el parásito (Petray et al. 1994; Pohanka 2013).

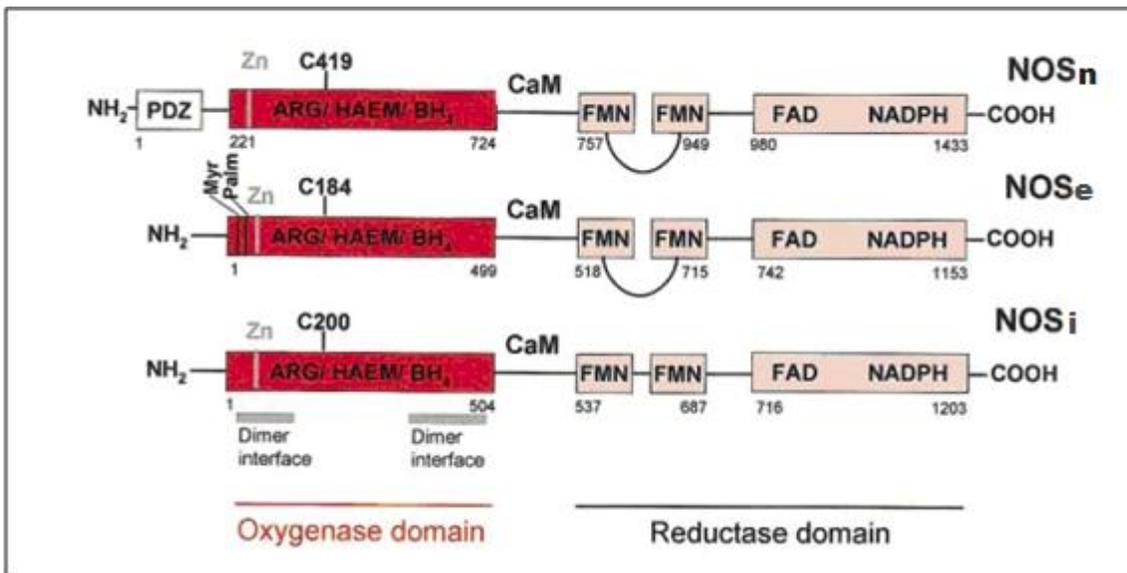
Venturini et al. (2000) propusieron un mecanismo de acción del NO sobre el parásito, siendo éste la inhibición de la acción de la cisteín proteinasa, nitrosilando el residuo catalítico Cys, estudios previos han descrito el efecto del NO sobre la actividad catalítica de enzimas homólogas a la cisteín proteinasa en diversos microorganismos. Las cisteín proteinasas parasitaria parecieran ser relevantes en varios aspectos del ciclo de vida del parásito y en la relación parásito-huesped. (Venturini et al. 2000). La principal cisteín proteinasa del *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*) es la cruzipaína; esta enzima, entre otras funciones, participa en la nutrición del parásito a expensas del huésped, en la penetración de los trypomastigotes de *T. cruzi* en la célula huésped y participa en los mecanismos de escape del parásito al sistema inmune del huésped (Cazzulo et al. 1997; Mottram et al. 1998; Duschak & Couto 2009), como así también en la respuesta inmune autorreactiva en modelos experimentales (Giordanengo et al. 2002; Gea et al. 2006). Por lo que el NO puede ser relevante en el desarrollo de nuevas estrategias del huésped contra el *T. cruzi* para evitar una transmisión vertical

de la madre hacia el recién nacido.

## Oxido Nítrico Sintasa (NOS)

Las Oxido Nítrico Sintasas (NOSs, EC 1.14.13.39) son enzimas generalmente referidas como diméricas, pero si tenemos en cuenta la asociación a calmodulina, requerida para su funcionamiento, podemos decir que son enzimas tetraméricas (dos monómeros de NOS con dos monómeros de CaMs asociados).

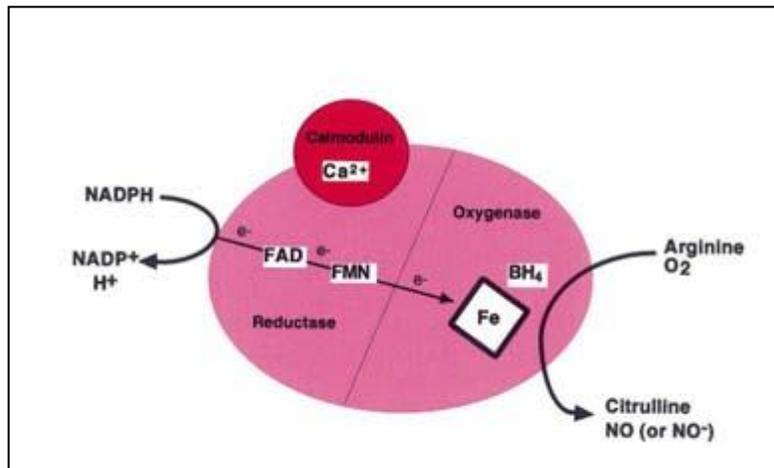
Al menos tres isoformas de ésta enzima, han sido clonadas, las tres comparten secuencias homólogas entre ellas (Figura 7), mientras que las isoformas endotelial y cerebral son constitutivamente expresadas y requieren calcio calmodulina para su máxima actividad, la isoforma expresada en macrófagos, requiere la síntesis de novo de RNA y proteína y es independiente de la activación de calcio calmodulina.



**Figura 7: Dominios estructurales de NOS<sub>n</sub>, NOSe y NOSi humanas.** Se observa la homología estructural entre las isoformas. Extraído de (Alderton et al. 2001)

La Oxido Nítrico Sintasa endotelial (NOSe) es una enzima constitutivamente expresada, que tiene cofactores unidos relativamente fuertes como (6R)-5,6,7,8-tetrahidrobiopterina (BH<sub>4</sub>), FMN, FAD y Hierro protoporfirina IX (HEM) y catalizan la reacción de L-arginina NADPH y O<sub>2</sub> al radical libre NO, citrulina y NADP. (Figura 9)

Cada isoforma está codificada por un gen simple copia, con similar estructura genómica entre cada una de las isoformas, sugiriendo un origen ancestral común para los genes de NOS. Las NOSs exhiben una estructura de dos dominios, con un dominio Oxigenasa N-terminal conteniendo sitios de unión para Hem, BH<sub>4</sub> y L-arginina está unido por el sitio de reconocimiento de CaM al dominio reductasa C-terminal que contiene sitios de unión para FAD, FMN y NADPH.



**Figura 8:** Esquema de la reacción catalizada por la NOS y sus co-factores. Extraído de (Alderton et al. 2001)

Las NOS, como mencionamos anteriormente, tienen la capacidad de oxidar una molécula de L-arginina obteniendo como producto NO, aún no está claro si la formación del NO por parte de las NOS es la primer especie reactiva de nitrógeno formada por la enzima o podría ocurrir la formación de nitroxil ( $\text{NO}^\cdot$ ) y ser oxidado a NO en presencia de la enzima Superóxido dismutasa (SOD); otros potenciales productos pueden ser peroxinitrito y nitrosotiol. La presencia de la SOD aumenta la producción de NO ya que remueve el superóxido que podría convertir rápidamente el NO en peroxinitrito (Radi 2004).

La regulación de la NOSe está determinada por una cascada de eventos determinando los niveles de ARNm y proteína de NOSe, la formación del complejo de

señalización de NOSe, su traslocación intracelular y fosforilación de NOSe (Fleming 2003).

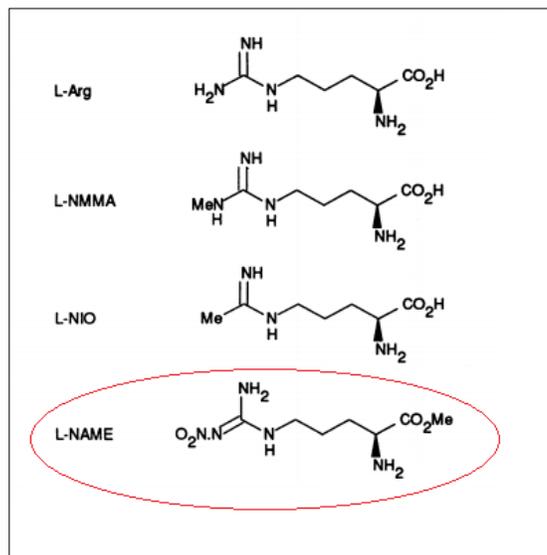
La producción materna de NO y la expresión de NOSe aumenta durante el embarazo, tejidos placentarios humanos han demostrado expresar selectivamente la isoforma NOSe (Eis et al. 1995; Rossmanith et al. 1999; Krause et al. 2011). La presencia de NOSe, ha sido demostrada en las células endoteliales del cordón umbilical, placa coriónica y vasos troncales de las vellosidades coriónicas (no en las células endoteliales de los capilares terminales). También se demostró la presencia de NOSe en el STB, que contacta directamente con la circulación materna, por lo que el NO derivado de ésta célula podría servir para impedir la adhesión de plaquetas en su superficie. Adicionalmente el NO producido por STB puede actuar como parte de la barrera inmunológica, impidiendo la adhesión de leucocitos maternos, previniendo un posible rechazo, o ejerciendo un efecto citotóxico/citostático sobre los patógenos maternos. Un aumento en la producción de NO ha sido observado en el embarazo, lo que contribuiría a la disminución de la resistencia vascular observada en el mismo. La expresión de NOSe no se observó en el CTB, que es la célula progenitora del STB (Buttery et al. 1994; Eis et al. 1995).

Hay múltiples publicaciones que describen la relación de la expresión de NOSe con diversas patologías, como pre-eclampsia, retardo de crecimiento intrauterino, diabetes entre otras, denotando la importancia tanto del NO como del estrés oxidativo en la producción y en la progresión de estas patologías. Se comprobó que la utilización de análogos de la L-arginina producen una inhibición competitiva de la NOS. Diversos trabajos publicados demuestran que la inhibición de esta enzima produce retardo en el crecimiento intrauterino (Tarrade et al. 2014; Thaete et al. 2005). En ausencia de su sustrato la NOS produce especies reactivas de oxígeno. Diferentes publicaciones demuestran que la inhibición de la NOS produce o agrava la clínica de

la preclampsia, debido a los radicales libres aumentados, lo que se pudo verificar mediante la utilización de un captador de radicales libres del oxígeno, como el S-acetylcisteína (SAC) disminuía la sintomatología de esta patología (Yu et al. 2012).

### Inhibidor de la NOS: L-NAME

La actividad de las NOS puede ser inhibida por análogos de la L-arginina (Figura 9), estas inhibiciones han sido documentadas por numerosas publicaciones, NG-nitro-L-arginina (L-NOARG) y su metil éster (L-NAME) fueron identificados como potentes inhibidores de y la síntesis de NO endotelial y neuronal (Rees et al. 1990; Tarrade et al. 2014), observándose tanto in vitro como in vivo el aumento de la presión vascular.



**Figura 9- Estructura molecular de L-arginina y sus análogos**, L-NAME (N<sup>G</sup>-nitro-L-arginina-metil-éster) encerrado en un círculo, fue el usado en este trabajo.

### Generación de estrés oxidativo y nitrativo en la placenta

La NOS puede producir especies reactivas de oxígeno en ausencia de su sustrato L-arginina. Las mediciones de los marcadores de estrés oxidativo en sangre materna y la orina muestran que el embarazo por sí mismo es un estado de estrés oxidativo, debido a la alta actividad metabólica de la placenta y al metabolismo de la madre durante el embarazo (Myatt et al. 1996; Morris et al. 1998; Toescu et al. 2002). Este

efecto se acentúa en los embarazos complicados por preeclampsia, restricción del crecimiento intrauterino y la diabetes, observándose un aumento de los marcadores de la producción de especies reactivas del oxígeno y la disminución de las defensas antioxidantes (Wang & Walsh 2001; Wisdom et al. 1991; Zusterzeel et al. 2001; Ceriello et al. 2002; Giugliano et al. 1996)

Como fue mencionado anteriormente, el NO tiene diversos mecanismos de acción, uno de sus efectos los ejerce a través de la nitrosilación de proteínas. Esta es una modificación postraduccional, resultante de la adición de un grupo NO<sub>2</sub> en la posición orto de los residuos tirosina. Hay dos vías principales que nos llevan a la formación de 3-nitrotirosina, las dos centradas en la formación de dióxido de nitrógeno (NO<sub>2</sub>), peroxinitrito (un fuerte agente nitrante) y dependientes de mecanismos de hemoperoxidasa. La formación de 3 nitrotirosina es considerado como un marcador de estrés nitro-oxidativo y es observado en procesos inflamatorios bajo la producción de NO y oxidantes. Proteínas nitrosiladas han sido descritas en diferentes enfermedades humanas y animales, particularmente en varios casos de miocarditis chagásica (Kierszenbaum 2007). También se observa un aumento de la nitrosilación de proteínas en el tejido placentario, en patologías como pre eclampsia, retardo de crecimiento intrauterino (IUGR), diabetes, corioamnionitis; donde las proteínas nitrosiladas son una huella del estrés oxidativo sufrido en ese tejido, teniendo una correlación con el aumento de la apoptosis, y la producción de abortos espontáneos (Burton & Jauniaux 2004). Por lo que nuestro objetivo fue observar en presencia de dos cepas de *T. cruzi* si la producción de NO se modificaba y por consiguiente si se observaban variaciones en la formación de proteínas nitrosiladas, las que son un reflejo o una huella del estrés oxidativo al que estuvo expuesto el tejido, y su posible influencia en el daño en el tejido placentario y en la infección productiva por el *T. cruzi*.

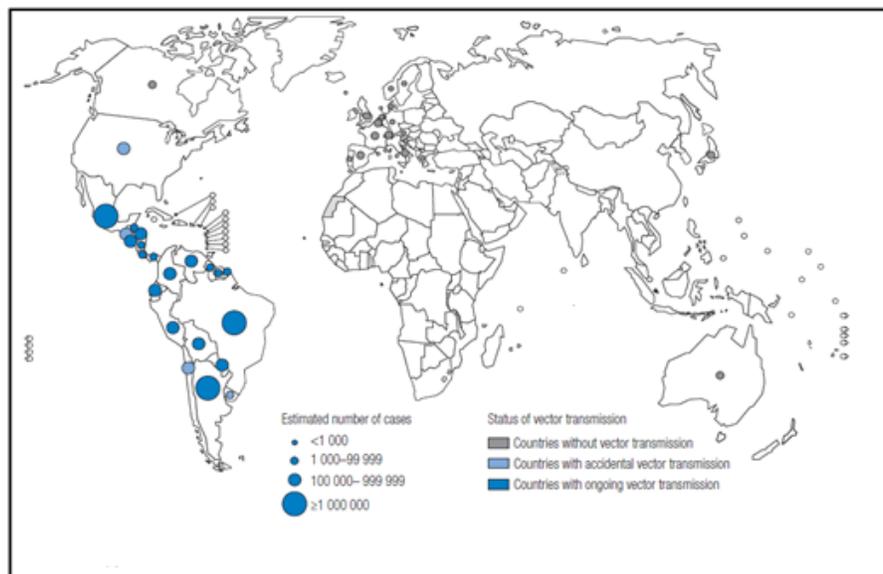
# **INTRODUCCIÓN**

# **SEGUNDA PARTE**

## La Enfermedad de Chagas

La enfermedad de Chagas, descrita por Carlos Chagas en 1909 (Chagas 1909), está causada por el protozoo flagelado *Trypanosoma cruzi*, el cual es transmitido principalmente por el reduvido vector *Triatoma infestans*, comúnmente llamado vinchuca.

Dicha enfermedad provoca una de las endemias que en Latinoamérica afecta aproximadamente a 6 o 7 millones de personas (WHO 2015) y aproximadamente el 25% de la población de América Latina se encuentra en riesgo de contraerla (WHO 2015). La endemia se extiende desde la frontera de México con Estados Unidos hasta el sur de la Argentina (Figura. 10). Es una enfermedad asociada a la pobreza y, como muchas otras enfermedades no atendidas de las zonas tropicales, promotora de pobreza. Causa pérdida transitoria o permanente del trabajo (Wilson et al. 2005; Hotez et al. 2006), debilitamiento del poder económico de los países y por consiguiente contribuye a la pobreza.



**Figura 10** Distribución geográfica de los casos de infección por *Trypanosoma cruzi* en base a estimaciones oficiales y estado de la transmisión vectorial en todo el mundo. Tomado de (WHO 2010)

Aunque tradicionalmente era una enfermedad confinada a América Latina, la enfermedad de Chagas, ha comenzado a manifestarse como un problema de salud pública en los EUA y Europa. Dos son las principales causas del avance de ésta enfermedad, en poblaciones antes libres de ella. Primero, debido al continuo influjo de inmigrantes a esos países provenientes de las zonas endémicas, entre los cuales, ciertamente hay numerosos individuos infectados con *Trypanosoma cruzi*, en los consultorios médicos en Europa se está observando, en la práctica clínica, un número creciente de pacientes con esta infección (Riera et al. 2006). Este aumento en el número de enfermos fue detectado por tamizajes de rutina de bancos de sangre u órganos en los EUA (Centers for Disease Control and Prevention 2007). La frecuencia de los incidentes en los bancos de sangre ha llevado a la implementación, a principios del 2007, de la primera prueba de diagnóstico para la enfermedad de Chagas, aprobada por la FDA (Federal Drug Administration o Agencia Federal para la regulación de Drogas) para su uso en los EUA (U.S. Food and Drug Administration 2006). Segundo, se ha notado también un incremento del número de casos autóctonos de la dolencia en humanos en los EUA (Riera et al. 2006; Beard et al. 2003; Dorn et al. 2007), que pueden estar asociados con el creciente número de reportes sobre infecciones por *T. cruzi* en animales domésticos o silvestres.

### **Curso Clínico de la enfermedad de Chagas**

El curso clínico de la enfermedad de Chagas incluye una etapa aguda y una crónica, separadas por un período de tiempo indeterminado durante el cual el paciente es relativamente asintomático.

**Fase aguda.** Después de una picadura por una vinchuca infectada, puede aparecer una lesión focal en el sitio de inoculación. Esta lesión recibe el nombre de chagoma y consiste en una zona indurada de eritema e hinchazón con inflamación de los

ganglios locales. Cuando la puerta de entrada ha sido la conjuntiva, hay un edema no doloroso de los párpados y de los tejidos aledaños que característicamente es unilateral (lo que se conoce como el signo de Romaña).

La fase aguda de la enfermedad es generalmente asintomática, sólo 1-2% de los pacientes presentan síntomas, los cuales se presentan 1-2 semanas después de adquirir la infección. Las manifestaciones clínicas de la fase aguda incluyen: fiebre, anorexia, diarrea, inflamación de los ganglios, inflamación del hígado y del bazo y miocarditis. La fase aguda se resuelve espontáneamente en 4-8 semanas. Un pequeño número de pacientes, generalmente niños, desarrollan miocarditis aguda o meningoencefalitis que pueden ser fatales

**Fase indeterminada o latente.** Empieza 8-10 semanas después de la infección. Durante esta etapa, los enfermos no tienen ningún síntoma y son detectados por la presencia de anticuerpos específicos.

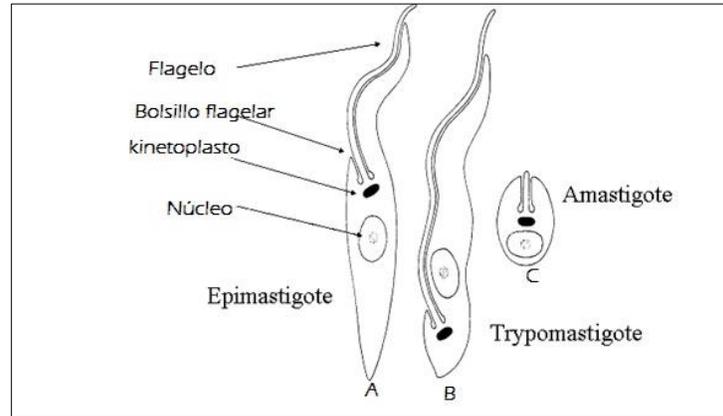
**Fase crónica.** En aproximadamente un 30% de los casos se presentan complicaciones en el corazón y en el tracto digestivo, 10 a 30 años después de la infección inicial. Los problemas cardiacos son los más serios y se manifiestan principalmente como daño al tejido muscular del corazón y con trastornos de la conducción de la señal eléctrica del corazón, lo que produce insuficiencia cardiaca. La afectación gastrointestinal consiste en la dilatación del esófago (megaesófago) y del colon (megacolon) y se debe, muy probablemente a daño local del sistema neuronal autonómico. (Tanowitz et al. 1992).

### ***Trypanosoma cruzi*: Características biológicas**

El *Trypanosoma cruzi* es un protozoo flagelado del orden Kinetoplastida, Familia Trypanosomatidae, caracterizado por la presencia de un solo flagelo y una sola mitocondria, dentro de la cual su genoma se encuentra ordenado en una compleja y compacta red denominada Kinetoplasto. Es un parásito intracelular con un ciclo

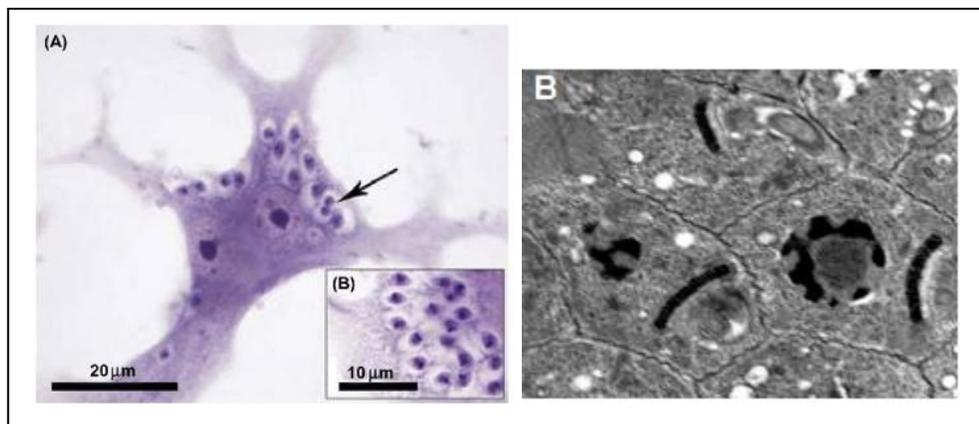
de vida complejo, que involucra vertebrados e invertebrados.

El *Trypanosoma cruzi* presenta distintos estadios durante su replicación en los hospedadores intermediarios y los definitivos:



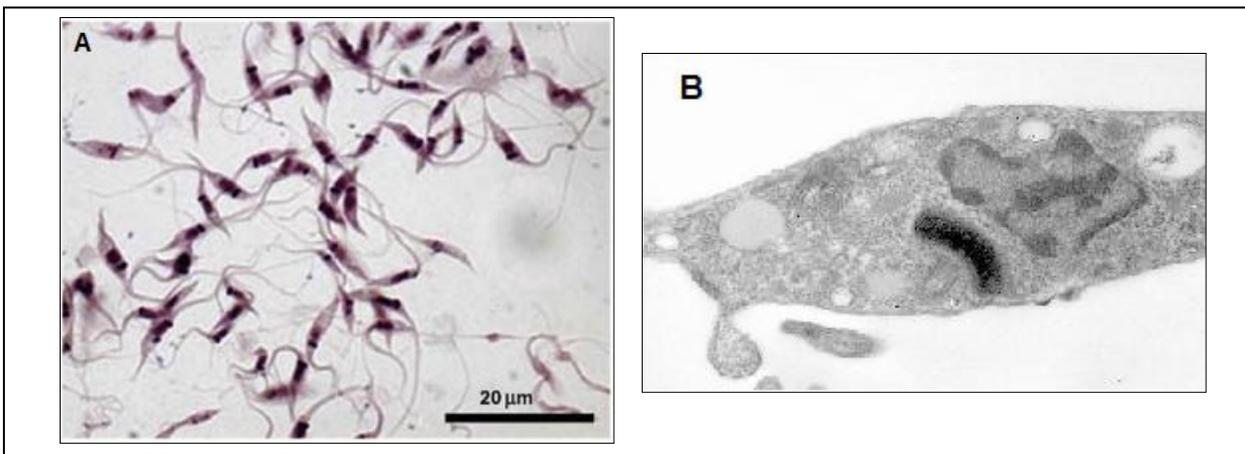
**Figura 11** Esquema de los distintas formas biológicas del *Trypanosoma cruzi*. **A** Epimastigote. **B**. Trypomastigote y **C**. Amastigote. Imagen modificada extraída de: Online Course in Molecular Parasitology ([http://dna.kdna.ucla.edu/parasite\\_course-old/default.htm](http://dna.kdna.ucla.edu/parasite_course-old/default.htm))

**Amastigote:** También conocido como esferomastigote, micromastigote, forma aflagelada o forma de leishmania. Es la forma intracelular replicativa del parásito (Figura 11 C, Figura 12.). Es un organismo pequeño de 3 a 5  $\mu\text{m}$  posee un núcleo y un kinetoplasto. El mismo sufre división binaria, encontrándose en el citoplasma de la célula huésped.



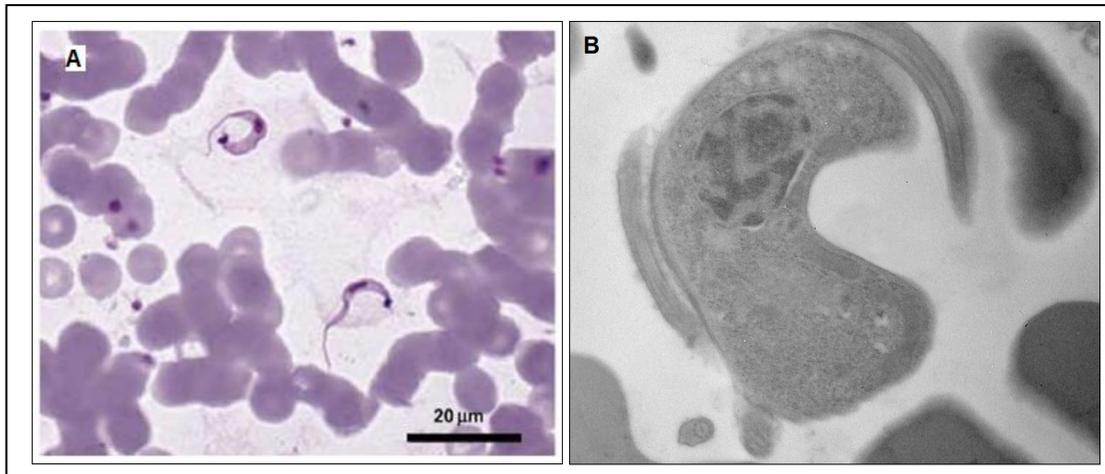
**Figura 12 A)** Imagen histológica de amastigotes en células de cultivo. Imagen extraída de (Telleria & Tibayrenc 2010). **B)** Amastigotes - Microscopía electrónica realizada en nuestro laboratorio

**Epimastigote:** Tiene forma de huso y mide entre 20-40  $\mu\text{m}$  de largo. El kinetoplasto se encuentra ubicado anterior al núcleo (Figura 11 A, Figura 13). Esta forma del *T. cruzi* es observada en el intestino de su huésped invertebrado. Los epimastigotes son capaces de dividirse y pueden ser encontrados dentro de las células de vertebrados durante el final del ciclo cuando los amastigotes se transforman en trypomastigotes o viceversa en el principio de un nuevo ciclo los trypomastigotes se transforman en amastigotes.(De Souza 2002).



**Figura 13 A) Imagen histológica de epimastigotes** en cultivo axénico. Imagen extraída de (Telleria & Tibayrenc 2010). **B) Epimastigotes - Microscopía electrónica** realizada en nuestro laboratorio

**Trypomastigotes:** Esta forma tiene cerca de 25  $\mu\text{m}$  de largo y 2  $\mu\text{m}$  de ancho. El kinetoplasto está ubicado posterior al núcleo (Figura 11 B, Figura 14). Pueden ser observados en las células de los tejidos o en la sangre de su huésped vertebrado, en el intestino posterior y en las heces de su huésped invertebrado, en la fase estacionaria de crecimiento de los cultivos axénicos, y en el sobrenadante de los cultivos celulares.



**Figura 14. A) Imagen histológica de trypomastigotes** en extendido de sangre periférica. Imagen extraída de (Telleria & Tibayrenc 2010). **B) Trypomastigotes - Microscopía electrónica** realizada en nuestro laboratorio.

El trypomastigote no es capaz de dividirse en la circulación sanguínea, y morfológicamente se pueden observar dos formas de trypomastigotes, uno más delgado con un núcleo mas elongado, un kinetoplasto subterminal y un flagelo corto libre, y el otro es ancho, con un núcleo ovalado, un kinetoplasto casi terminal y un flagelo libre largo. La predominancia de uno sobre otro es dependiente de la cepa del *T. cruzi* y del tiempo de infección, ha sido sugerido que las formas más alargadas son responsables principalmente de la infección de las células de vertebrados y las formas más anchas son más hábiles de infectar a los huéspedes invertebrados (De Souza 2002).

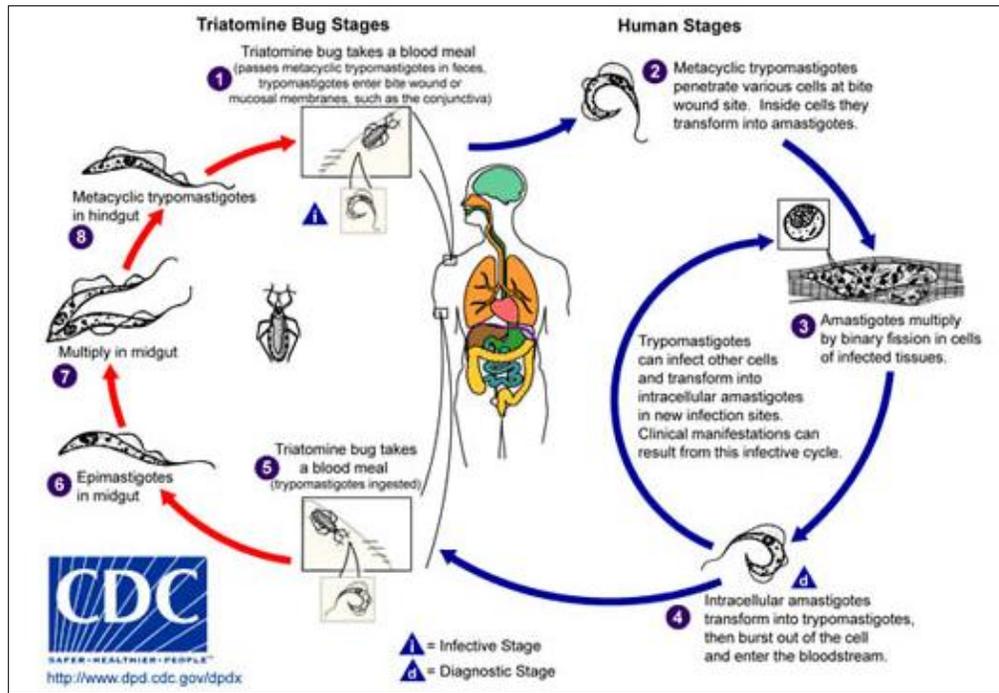
*T. cruzi* es un caso paradigmático de evolución predominantemente clonal (Tibayrenc & Ayala 1987) con evidencias de recombinación genética (Yeo et al. 2005), siendo esto relevante en las manifestaciones de la patogenia y la resistencia a drogas. La nomenclatura intraespecífica de *T. cruzi* ha sido recientemente revisada para incluir 6 genotipos (entre paréntesis la antigua denominación): TcI (formado por TcI), TcII (formado por TcIIb), TcIII (formado por TcIIc), TcIV (formado por TcIIa), TcV (formado por TcIIId) y TcVI (formado por TcIIe). Incluyen todas las cepas y stock de clones aislados (Brisse et al. 2001; Zingales et al. 2009). Aunque

todos causan la enfermedad en el hombre, el polimorfismo entre las poblaciones de *T. cruzi* puede influenciar la transmisión congénita de la enfermedad y la patología fetal y/o neonatal (Andrade 1982; Bittencourt 1992; Solana et al. 2002).

### **Ciclo biológico**

El *Trypanosoma cruzi* presenta un complejo ciclo de vida, que cumple en un insecto vector y un mamífero huésped (Figura 15).

El ciclo biológico comienza cuando el huésped invertebrado se alimenta con la sangre del huésped vertebrado infectado. Los huéspedes invertebrados son *Hemiptera* y *Reduvidae*, tales como *Rhodinus prolixus*, *Triatoma infestans*, *Panstrongylus megistus*, y otros, aunque el más ampliamente distribuido en Argentina es el *Triatoma infestans*. Durante su alimentación, los trypomastigotes de la sangre del huésped vertebrado son ingeridos por el insecto. Se asume que en el estómago del insecto la mayoría de los trypomastigotes sanguíneos se transforman en epimastigotes y algunos en formas redondeadas. En el intestino, los epimastigotes se multiplican repetidamente por un proceso de división binaria. En el recto, cierta proporción de epimastigotes se transforman en trypomastigotes metacíclicos, los que son eliminados con las heces y son capaces de infectar al huésped vertebrado (Tanowitz et al. 1992) (Figura 15).



**Figura 15 Ciclo biológico del *Trypanosoma cruzi*. Izquierda:** en el huésped invertebrado. **Derecha:** en el huésped vertebrado. Imagen extraída de la página web del CDC. Center of Disease Control and Prevention. <http://dpd.cdc.gov/dpdx/HTML/TrypanosomiasisAmerican.htm>

La infección del huésped susceptible se inicia cuando un insecto infectado defeca mientras se alimenta, liberando trypanosomas metacíclicos en sus heces. Los trypanosomas, incapaces de atravesar la piel intacta, entran en el organismo a través de excoriaciones de la piel (sitio de la picadura), o a través de las mucosas. Una vez ingresados al torrente sanguíneo, el trypomastigote debe ingresar en una célula huésped para diferenciarse en amastigote y poder replicarse mediante fisión binaria. Luego se transformará nuevamente en trypomastigote, produciendo la lisis de la célula y quedando libres en el torrente sanguíneo, capaces de continuar su ciclo intracelular en otras células susceptibles.

## Vías de Transmisión del Chagas

**Transmisión por vectores:** Epidemiológicamente la principal vía de infección ocurre a través del insecto triatomino infectado, (Coura 2007). Dentro de las especies de triatominos involucrados, *Triatoma infestans* la más ampliamente distribuida, (WHO 2005) (WHO 2012). Contra la cual se han hecho la mayoría de las campañas, logrando la interrupción de la transmisión vectorial en gran parte del Cono Sur, mediante el proyecto de la OPS/OMS INCOSUR, Iniciativa Chagas Cono Sur (1991-2002)(INCOSUR Report 2001).

**Transmisión transfusional:** La transfusión de sangre infectada, conteniendo trypomastigotes, eran responsables del 5-20% de los casos de la enfermedad de Chagas (Schmunis et al. 2000), aunque publicaciones más recientes expresan que en todos los países del cono sur excepto Bolivia, cerca del 100% de los donantes de sangre son analizados para la detección de la infección por *T. cruzi* (Carlier & Torrico 2003) y en el 2007 se ha implementado en los EUA la prueba diagnóstico para el mal de Chagas en los bancos de sangre, aprobada por la FDA, (Tarleton et al. 2007), por esto es de esperar que la transmisión transfusional sea mucho menor a la publicada por Schmunis en 2000.

**Transmisión digestiva:** La transmisión oral de la enfermedad de Chagas ha sido reportada en varias microepidemias de enfermedad de Chagas agudo en Brasil, Colombia y México, después de la ingestión de alimentos contaminados con triatominos infectados o sus deyecciones (Camandaroba et al. 2002; WHO 2015).

**Transmisión por transplante de órganos:** Transplantes de riñón, hígado, médula ósea, páncreas y corazón, tanto de donantes vivos como muertos son causas de transmisión del *T. cruzi* (WHO 2015).

**Transmisión accidental:** La transmisión accidental de la enfermedad de Chagas ha sido reportada en varias situaciones, en laboratorios, hospitales y laboratorios de investigación, manipulando diferentes fuentes de materiales contaminados, como deyecciones de triatominos, cultivos de parásitos y sangre infectada de humanos y de animales. Todo el personal manipulando muestras biológicas infectadas con *T. cruzi* debe seguir precauciones de seguridad para el trabajo de laboratorio.(WHO 2015).

**Transmisión congénita:** La transmisión congénita de la infección por *T. cruzi*, lleva a la enfermedad congénita de Chagas. Puede ser sospechada en cualquier niño nacido de una mujer infectada por el *T. cruzi*, sin importar el estadio de la infección en la que ésta se encuentre.(Bittencourt 1992; Freilij & Altcheh 1995; Schijman 2007; Carlier et al. 2015).

### **Transmisión Congénita**

El *Trypanosoma cruzi* llega al feto a través de la vía hematógena, atravesando la barrera placentaria (Bittencourt 1976). Este evento puede suceder en cualquier fase de la enfermedad materna. En la fase aguda la parasitemia es alta y persistente, por lo que el riesgo es mayor. Pero como este período es muy corto son pocos los casos que se observan. (Moretti et al. 2005; Bittencourt 1976). En fase crónica, indeterminada hay una parasitemia intermitente por lo que la transmisión también puede ocurrir. (Bittencourt 1992; Bittencourt 1976).

Para que ocurra la infección congénita el *T. cruzi* debe atravesar la primera barrera placentaria que es el trofoblasto según lo describió Bittencourt (1992), y de acuerdo a resultados de nuestro laboratorio, el sinciotrofoblasto expresa enzimas lisosomales que podrían restringir la propagación del parásito, también se observó modificación en la expresión en la fosfatasa alcalina placentaria, y esta enzima participa en el proceso de invasión del *T. cruzi* al trofoblasto. (Fretes & de Fabro

1990; Sartori et al. 2002; Fretes & De Fabro 1995; Sartori et al. 1997; Frank et al. 2000). Estos factores antes mencionados y otros factores estudiados en el presente trabajo podrían ser los responsables de que el parásito no sea capaz de establecer una infección productiva en el tejido placentario in vitro, como fue demostrado en resultados previos de nuestro laboratorio (Díaz-Luján et al. 2004; Triquell et al. 2009; Diaz-Luján et al. 2012).

### **Epidemiología**

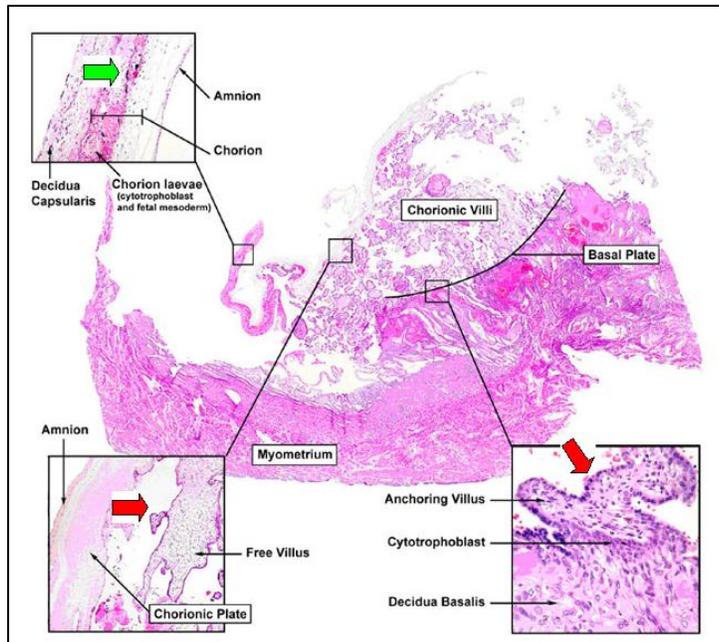
La prevalencia de la infección por *T. cruzi* en las embarazadas en Sud América varía del 4% al 50% en centros urbanos y en áreas rurales (WHO et al. 2007) y la incidencia de transmisión congénita es de 0,5 a 4% de acuerdo a Bittencourt (1992) y Argentina tuvo una media anual de 142 casos entre los años 1994-2001 (Gürtler et al. 2003), aunque hay reportes de niños nacidos con Chagas congénito mayores entre 800 a 1700 niños nacidos por año en la Argentina (Sosa-Estani 2005) con una incidencia de 1% al 12% (Carlier & Torrico 2003)(Freilij & Altcheh 1995) publicaciones más recientes analizan la transmisión congénita en países donde la enfermedad es endémica, encontrando una incidencia de alrededor del 5% versus la incidencia en países no endémicos del 2,7% (Howard et al. 2014). La importancia de la enfermedad congénita de Chagas ha emergido a la luz en virtud de que las vías tanto transfusionales como vectoriales están siendo controladas, lo que da una mayor relevancia de esta vía de transmisión para explicar la presencia del *T. cruzi* en Países Latinoamericanos, (Gürtler et al. 2003; Blanco et al. 1999; Sosa-Estani 2005). Esta importancia se incrementa más aún dada la alta seroprevalencia de las embarazadas que aportarán enfermos chagásicos en el futuro, que a su vez, constituirán posibles nuevas fuentes de infección, conjuntamente con menores posibilidades laborales, educacionales y económicas para los damnificados.

### **Vías De Transmisión Congénita**

El *Trypanosoma cruzi* llega al feto por vía hematógica, atravesando la barrera placentaria, algunos autores sostienen que es necesaria una lesión previa para el ingreso. En la vellosoidad coriónica, el *T. cruzi* se transforma en amastigote dentro de las células de Hofbauer hasta que es liberado a la circulación fetal (Bittencourt 1992; Schijman 2007).

Se han descrito otras vías por las que puede entrar el *T. cruzi* a la circulación fetal, se ha visto en estudios histo-patológicos la presencia de nidos de amastigotes en fibroblastos coriónicos y en el mesénquima subamniótico del seno marginal, donde las membranas placentarias se adhieren a la placa coriónica, lo que denotaría la posibilidad de la transferencia de parásitos por la vía coriónica sin el necesario paso a través del trofoblasto. (Fernandez-Aguilar et al. 2005) (Fig 16)

Otra posible transmisión de la enfermedad puede ocurrir en el momento del nacimiento a través del canal de parto, éste mecanismo puede ocurrir en recién nacidos parasitológicamente negativos, que se transforman en parasitológicamente positivos unas semanas posteriores al nacimiento (Moya et al. 1989; Blanco et al. 2000).



**Figura 16.** Las flechas muestran posibles vías de entrada del *Trypanosoma cruzi* a la placenta y por consiguiente al feto. Flecha roja: vía **hematógena**, atravesando la **vellosidad coriónica**. Flecha verde: **a través del seno marginal**. Extraído de <https://embryology.med.unsw.edu.au/embryology/index.php/Placenta - Histology>.

### Factores que Influyen en la transmisión congénita

Hasta el presente no se ha postulado una explicación para la baja transmisión congénita, aún cuando se ha descrito aumento de parasitemia en el tercer trimestre del embarazo (Bittencourt 1992). Observándose que la mayoría de los casos congénitos se establecen en embarazadas en etapa indeterminada o crónica de la enfermedad y de que es necesaria la **persistencia del parásito** para la enfermedad.

Hay evidencias de que la **competencia inmunológica de la placenta** y las **diferentes cepas de *T. cruzi*** juegan un rol en la frecuencia de la transmisión congénita (Bittencourt, 1992; Delgado-Santos Buch, 1978). Otros factores que podrían estar participando en la transmisión congénita son: La edad materna, donde se observó que la frecuencia de transmisión era mayor en madres más

jóvenes (Bittencourt 1992, 1984), aunque otros trabajos observaron lo contrario (Salas et al. 2007).

Las diferencias filogenéticas en las cepas de *T. cruzi* (Zingales et al. 1998; Zingales et al. 2009) pueden ser una de las posibles causas de las múltiples formas que ocurren de la enfermedad (Higo et al. 1997; Sturm et al. 2003). Se ha descrito que diferentes cepas participan en la patogenia del Chagas (Andrade 1982), en mecanismos de invasión a las células huéspedes (Ruiz et al. 1998; Neira et al. 2002; Stecconi-silva et al. 2003) y en la progresión de la patología. En la transmisión congénita del Chagas, se observó también, que la cepa del parásito juega un rol importante en su frecuencia de transmisión y en la patogenia de la enfermedad, en ratones se observó que la cepa del parásito influía en la frecuencia tanto de reabsorciones de los fetos, en la parasitemia de la madre, en la fertilidad de la misma, como de la transmisión congénita del parásito (Solana et al. 2002; Luquetti et al. 2015)

Las cepas del *Trypanosoma cruzi* han sido clasificadas en Unidades Discretas de Tipificación (DTU) I al VI (Zingales et al. 2009), teniendo cada una de ellas características de distribución geográfica particular, presentaciones clínicas, virulencia y susceptibilidad a fármacos característicos. (WHO 2012)

Se han asociado los distintos genotipos a la transmisión congénita El genotipo TcV se ha informado en el 80-100% de los casos congénitos en Argentina, Bolivia, sur de Brasil, Chile y Paraguay, mientras que TcII se ha identificado en los pocos casos detectados en los otros estados brasileños (Virreira et al. 2006; Virreira et al. 2007; Burgos et al. 2007; Corrales et al. 2009; Garcia et al. 2014), pero otros autores postulan que la cepa que se transmite es la predominante en la población, sin que haya un genotipo directamente asociado a la transmisión congénita (Schijman 2007)

En el presente trabajo utilizamos dos cepas, una aislada de un caso congénito, colaboración del Dr. Hector Freilij (Hospital Ricardo Gutiérrez, Buenos Aires) que es una población que contiene una mezcla de dos DTU: el II y el VI; la otra cepa utilizada en el trabajo es la cepa Tulahuen, que pertenecen al DTU VI. Ambas cepas han sido tipificadas en el laboratorio del Dr. Schijman. (INGEBI-CONICET)(Cura et al. 2012).

No sólo el genotipo del *T. cruzi* puede ser un factor importante en la transmisión congénita, se observó que la **parasitemia** pareciera ser determinante en la infección congénita, asociándose con el riesgo de transmisión congénita (Bua et al. 2012; Hermann et al. 2004).

La fase de de la enfermedad también ha sido descrita como relevante en la transmisión, siendo en la fase aguda una incidencia del 53% y en la crónica del 5%.

**El estado inmunológico de la madre** juega un rol muy importante en la transmisión congénita, se ha observado que una respuesta innata disminuída con una liberación de TNF $\alpha$  baja, se asocia en alguna medida a la transmisión congénita. También se ha reportado asociación entre una respuesta del tipo T helper I disminuida de los Li T con menor liberación de IFN $\gamma$  (Hermann et al. 2004).

TNF es necesario para el control de las infecciones, pero en altas cantidades, TNF podría ser perjudicial para el huésped. El papel de los receptores de TNF solubles como un mecanismo de defensa contra el exceso de TNF se ha observado en los modelos experimentales de sepsis. En el embarazo sin complicaciones, el aumento de los receptores de TNF solubles, que se detectó en el suero y el líquido amniótico, así como en la orina, parece proteger al feto contra TNF. Las alteraciones en el control de la respuesta inflamatoria, podrían tener consecuencias para la transmisión congénita y la respuesta de los niños, incluso cuando el papel del TNF y la regulación de los niveles de TNF en la transmisión vertical no son

claros. García et al (2008) postula que el aumento sTNF-R2 en los recién nacidos infectados podría proteger a los niños de la respuesta inflamatoria inducida por *T. cruzi*, pero sin tener en cuenta el papel funcional para el huésped, los altos niveles de sTNF-R2 podrían orientar a la presencia de la transmisión materno infantil de la infección *T. cruzi*.(García et al. 2008)

### **Consecuencias Clínicas de la transmisión congénita**

Los recién nacidos presentan diferentes consecuencias clínicas, desde bebés recién nacidos asintomáticos hasta diversos grados o tipos de sintomatologías (Freilij & Altchek 1995) Actualmente existe coincidencia en diferentes estudios realizados, en todos los países de zonas endémicas, en que un porcentaje muy elevado de niños nacidos con infección congénita (60 a 90 %) no presenta sintomatología al nacer ni en los meses subsiguientes, con excepción de algunos trabajos en Bolivia, donde se ha reportado un 50% de niños sintomáticos (Carlier & Torrico 2003). Los signos clínicos más frecuentes encontrados en los pacientes sintomáticos son: hepatomegalia, esplenomegalia, hepatoesplenomegalia, meningoencefalitis, insuficiencia cardíaca y anemia (Moya & Moretti 1997; Bittencourt 1976). Por ello, la hepatomegalia y la esplenomegalia deben ser tenidas en cuenta en zonas endémicas para sospechar la enfermedad, y más aún si existen antecedentes maternos. La miocarditis ha sido observada con baja frecuencia. Cuando ocurre, significa un severo cuadro neonatal que requiere terapéuticas con cardiotónicos y diuréticos, además del tratamiento etiológico. La frecuencia de trastornos neurológicos no ha sido establecida con certeza. Algunos autores refieren que el 50% de casos neonatales presentan alteraciones del SNC (Truyens, Mjihdi, et al. 2005). También ha sido publicado por diversos autores, otras consecuencias como bebés nacidos prematuros, bajo peso al nacer y abortos espontáneos (Luquetti et al. 2015; Saleme et al. 1971; Bittencourt et al. 1972)

# **HIPÓTESIS Y OBJETIVOS**

## Hipótesis

Por todo lo anteriormente expuesto, nosotros hipotetizamos que la infección del tejido placentario podría estar afectado por las diferentes características biológicas de las dos cepas estudiadas (Tulahuen y un aislado de un caso congénito al que denominamos Lucky), además de ello, la carga parasitaria podría ser un factor relevante en la infección del tejido placentario.

Por otro lado la placenta frente a la infección placentaria por *Trypanosoma cruzi*, podría generar una respuesta innata, que induce la producción de citoquinas proinflamatorias, como el  $TNF\alpha$ , y la secreción de óxido nítrico (NO) y peroxinitritos. Estos factores pueden impedir la infección placentaria, debido a que tienen efectos parasiticidas, y también podrían generar un daño en la barrera placentaria. La infección del tejido placentario podría resultar de un equilibrio entre las alteraciones placentarias y el efecto deletéreo sobre el *T. cruzi*.

## **Objetivo General:**

Analizar el efecto de la producción de Oxido Nítrico, Especies Reactivas de Oxígeno y peroxinitritos en la infección de la placenta normal, por dos cepas de *Trypanosoma cruzi*, su efecto en la estructura de la barrera placentaria, y la influencia del inóculo parasitario en este proceso.

## Objetivos específicos:

1. Determinar modificaciones de la expresión de NOSe, enzima productora de óxido nítrico, inducida por formas infectivas de *Trypanosoma cruzi*, *in vitro*.
2. Determinar la influencia de la carga parasitaria y la cepa de *Trypanosoma cruzi* en el estado de estrés oxidativo de los explantos placentarios en los co-cultivos *in vitro*.
3. Analizar posibles alteraciones estructurales vellositarias en presencia de las distintas cepas y cargas parasitarias de *Trypanosoma cruzi* y su relación con el estrés oxidativo.
4. Analizar la modificación o la influencia de las dos cepas de *Trypanosoma cruzi* en la producción de TNF $\alpha$  y sus receptores solubles en los co-cultivos placentarios.
5. Cuantificar la infección del tejido placentario modificada por la cepa del parásito y dosis del inóculo, modulada por agentes deletéreos placentarios

# **MATERIALES Y MÉTODOS**

## Materiales

### Trypomastigotes

Se utilizaron **Trypomastigotes** de *Trypanosoma cruzi* de 2 cepas, Tulahuen perteneciente al DTU VI (Diaz-Lujan y col. 2012), y otra aislada de un caso congénito en colaboración con el Dr. Hector Freilij (Hospital Ricardo Gutierrez, Buenos Aires), denominada Lucky por nosotros (Triquell y col. 2009), la cual es una mezcla de dos linajes DTU II y VI (tipificación en colaboración con Dr. Schijman, INGEBI-CONICET)

- Los trypomastigotes se obtuvieron de ratones Albino Swiss, infectados y sangrados en pico de parasitemia (Fretes & de Fabro 1990), con los que se infectaron células Vero, manteniendo la infección en las mismas. Los parásitos se aislaron de la sangre de los ratones mediante centrifugación a 900 rpm, se estacionaron durante 1 h a 37 °C y luego el plasma se centrifugó nuevamente a 2000 rpm, obteniendo el pellet de parásitos. Trypomastigotes se obtuvieron además, de los medios de cultivos sobrenadantes, provenientes de la infección de las células Vero susceptibles a infección con *T. cruzi*, cultivadas en frascos (Greiner) de 75 cm<sup>3</sup>, pH: 7,35, a 37 ° C y con 5% de CO<sub>2</sub>, obteniendo cantidades significativas de formas trypomastigotes para los experimentos.

### Placentas

- Se utilizaron 10 Placentas provenientes de embarazadas normales provistas por el Sanatorio Allende, Hospital Privado y Maternidad Nacional de la ciudad de Córdoba. Se efectuaron un análisis Clínico – serológico para garantizar el estado de salud de las pacientes aportantes de las placentas, aspecto fundamental de la investigación. Para resguardar los aspectos ético-legales de investigación se efectuó el consentimiento informado de las embarazadas confirmando su voluntad

de donar las placentas para la investigación. Se consideró normales aquellas provenientes de embarazadas con serologías negativas para enfermedades infecto-contagiosas y sin antecedentes clínicos de patologías del embarazo.

- Las placentas inmediatamente después de la cesárea fueron trasladadas manteniendo la esterilidad al laboratorio donde fueron procesadas bajo campana de flujo laminar. De la cara materna de la placenta se removieron varios cotiledones los que se limpiaron de membranas y decidua basal, obteniéndose vellosidades coriónicas de la zona central trofoblástica. Estas fueron lavadas sucesivamente en solución fisiológica hasta quedar libres de sangre. Se cortaron muestras de las vellosidades con bisturí con un tamaño de 2 a 3 mm con un peso fresco promedio aproximado de 0,020 – 0,030 g.

# Métodos

## Cultivos

- Se efectuaron cultivos de vellosidades coriónicas en interacción con trypomastigotes del *T. cruzi*, empleando medio de cultivo RPMI 1640 sin rojo fenol (Sigma), pH 7.35, 10% de SBF (Natocor) inactivado a 56°C durante 30 minutos (para inactivar el sistema del Complemento), con 5% de CO<sub>2</sub> y humedad adecuada, durante 24 hs (Fretes-Fabro, 1990), en placas de cultivo (Greiner) de 24 wells estériles en los que se colocaron 3 explantos vellositarios de aproximadamente 0.020g – 0.030 g.

Se realizaron cultivos independientes con dos cepas y dos cantidades de trypomastigotes de *Trypanosoma cruzi*:

Tulahuen (DTU VI) 10<sup>6</sup> parásitos/ml y 10<sup>5</sup> parásitos/ml

Lucky (DTU II/VI) 10<sup>6</sup> parásitos/ml y 10<sup>5</sup> parásitos/ml

Además se utilizó un inhibidor de la enzima NOSe, el L-NAME un análogo no metabolizable de la L-arginina en las siguientes condiciones de cultivo

L-NAME 0,1 mM + Tulahuen (DTU VI) 10<sup>6</sup> parásitos/ml

Lucky (DTU II/VI) 10<sup>6</sup> parásitos/ml

L-NAME 1 mM + Tulahuen (DTU VI) 10<sup>6</sup> parásitos/ml

Lucky (DTU II/VI) 10<sup>6</sup> parásitos/ml

Se utilizó N Acetil Cisteína o NAC, que es un antioxidante, siendo un precursor del glutatión reducido y del aminoácido cisteína, fue utilizado en las siguientes condiciones de cultivo:

-NAC 5 mM + Tulahuen (DTU VI)  $10^6$  parásitos/ml

Lucky (DTU II/VI)  $10^6$  parásitos/ml

-NAC 10 mM + Tulahuen (DTU VI)  $10^6$  parásitos/ml

Lucky (DTU II/VI)  $10^6$  parásitos/ml

Para cada situación de cultivo, se realizaron los controles correspondientes, en ausencia de parásitos.

- Al término de los tiempos establecidos de cultivo se tomaron los explantos y se los fijó en una solución de Formol bufferado al 10% para su posterior estudio histológico o se congelaron a  $-80^{\circ}\text{C}$  para realizar la extracción de ARN, ADN y proteínas. Los medios de cultivo, luego del análisis de la viabilidad parasitaria, fueron centrifugados a 3500 rpm por 15 minutos y los sobrenadantes se reservan a  $-80^{\circ}\text{C}$  para la medición de nitritos,  $\beta\text{hCG}$ .

### **Procesamiento Histológico**

- Las muestras de vellosidades placentarias luego de que fueron colectadas y fijadas en Formol 10%, se deshidrataron en una serie graduada de etanol de 15 minutos cada paso ( $50^{\circ}$ ,  $70^{\circ}$ ,  $96^{\circ}$ ,  $100^{\circ}$ ) hasta llegar a xilol. Se incluyeron en parafina y se realizaron cortes seriados ( $5\mu\text{m}$ ) que se desparafinaron e hidrataron usando xilol y una serie graduada de etanol hasta PBS. Algunos cortes fueron teñidos con Hematoxilina/Eosina, PAS y MASSON y otros procesados mediante técnicas inmunohistoquímica, que se detallan más adelante.

### **Viabilidad Parasitaria**

- La viabilidad parasitaria se determinó mediante test de motilidad y exclusión de colorantes intravital (giemsa o azul trypan) (Black-Berenbaum, 1964) y recuento en cámara cuenta glóbulos de Neubauer de los parásitos cosechados al finalizar los tiempos estipulados.

- Se incubaron los trypomastigotes de ambas cepas de *T. cruzi* durante 30 minutos a 37° C con distintos medios de cultivo y se analizó la viabilidad del parásito por test de movilidad. Los medios de cultivo utilizados fueron, medios adicionados con el inhibidor de NOS, L-NAME a diferentes concentraciones 0,1 mM, 1 mM y 10 mM, y como control se utilizó medio de cultivo fresco RPMI adicionado con SBF al 10%. Se realizó para verificar si había toxicidad directa sobre el parásito por parte del inhibidor de NOS.

### **Determinación de $\beta$ -hCG en los medios de cultivo**

Para determinar la viabilidad del STB en cultivo de explantos vellositarios, se determinaron los niveles de  $\beta$ -hCG (Gonadotropina Coriónica Humana) en los medios sobrenadantes de cultivo, empleando un inmunoensayo automatizado estándar específico para la hormona humana, el cual consistió en un ensayo inmunométrico quimioluminiscente de fase sólida, con un límite de detección 1.1 mUI/ml (Immulate Siemens, Munich, Alemania). Los resultados fueron expresados como mUI/ml y como media  $\pm$  SD.

### **Cuantificación de la producción de TNF $\alpha$ , sTNF-R1 y sTNF-R2**

Los niveles de TNF, sTNF-R1 y sTNF-R2 (receptores solubles para TNF 1 y 2) fueron determinados por ensayos de dos sitios ELISA usando kits disponibles comercialmente (OptEIA kit, BD Pharmingen, San José CA) de acuerdo al protocolo del fabricante. Brevemente, el anticuerpo específico fue adsorbido en una placa

(Costar Corp. Cambridge, MA). Las placas fueron lavadas con 0,05 % de Tween en PBS y bloqueado con 1% de SBF en PBS-albumina. Luego de la adición de 100  $\mu$ l de la muestra, las placas se incubaron toda la noche a 4°C. Luego fueron lavadas e incubadas con el anticuerpo secundario de detección biotinilado y Avidina-HRP conjugada. Se midió absorción a 490 nm y se interpoló con una curva estándar. Las muestras se midieron por duplicado. El límite de sensibilidad del ensayo fue de 2 pg/ml.

### **Identificación del linaje de *T. cruzi***

El linaje de la cepa aislada congénitamente fue tipificado en el laboratorio del Dr. Schijman (INGEBI-CONICET), a partir de ADN purificado, usando una combinación de estrategias de PCR que tuvieron como target marcadores genómicos nucleares, como los fragmentos de genes para miniexón, el gen para el ARN ribosomal 24 s alfa y el fragmento SCAR A10.

### **Cuantificación de la infección placentaria**

#### PCR cuantitativa absoluta

#### Extracción de ADN genómico de explantos placentarios

Se tomaron los explantos placentarios de aproximadamente 0,020-0,030 g de tejido y se los disgregó para facilitar la extracción del material genético. Para la purificación del ADN se trabajó con el protocolo que se detalla a continuación:

Se resuspendió el tejido en 2 volúmenes de Buffer de Lisis, 10mM Tris-HCl; 0,1M EDTA y 0,5% (p/v) SDS pH 8 con Proteinasa K (Promega, EE.UU.) en una concentración final de (100  $\mu$ g/ml). Se incubó Over Night a 50°C.

Se realizó una extracción con Fenol:Cloroformo (50:50). Se agregó un volumen de Fenol:Cloroformo cada un volumen de lisado. Se agitó manualmente y se centrifugó a máxima velocidad 10-15 min. Luego, se tomó la fase superior.

Se precipitó el DNA con acetato de sodio 0,3 M y 2 volúmenes de Etanol.

El pellet se lavó con etanol 70% se centrifugó a 12.000 rpm durante 15 min.

Se resuspendió el pellet en 100 µl de agua Milli Q estéril.

Se cuantificó la concentración de ADN a una densidad óptica (DO) de 260 nm en espectrofotómetro. Para analizar la pureza de la muestra se determinó la relación de DO a 260nm / DO a 280 nm. La relación debe ser cercana a 2.

### Curva de calibrado de *Trypanosoma cruzi*

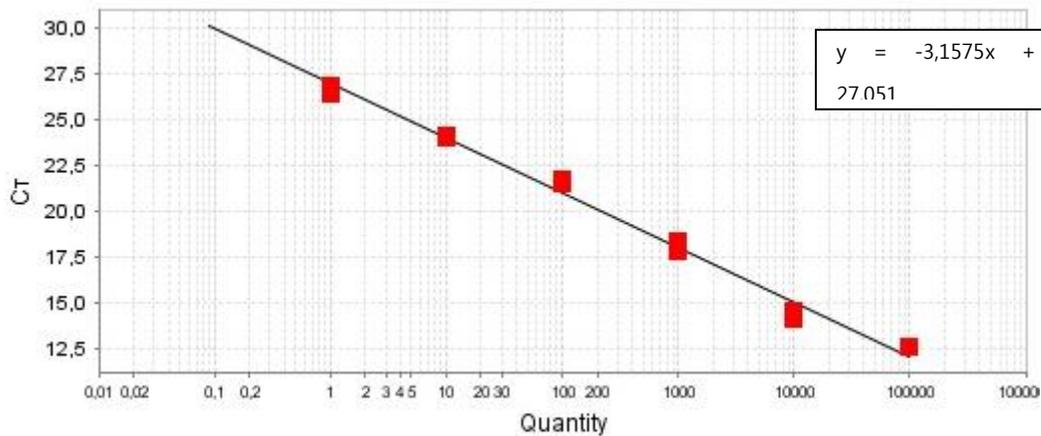
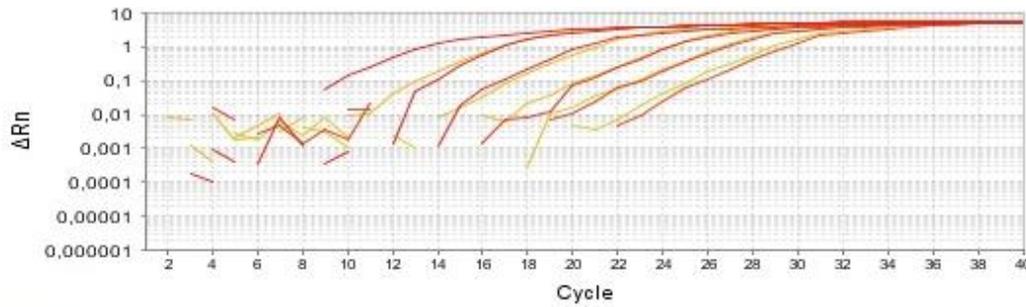
Para llevar a cabo una cuantificación absoluta es necesario utilizar cantidades conocidas del ADN molde con su correspondiente señal de fluorescencia o señal de amplificación (Ct). Conociendo estos valores de una muestra problema, se podrá interpolar en la recta patrón y obtener de este modo, la cantidad de ADN de la muestra desconocida.

### Extracción de ADN genómico de *Trypanosoma cruzi*

Para la obtención del ADN genómico de los parásitos se tomó un volumen de sobrenadante de cultivo conteniendo  $10 \times 10^6$  parásito/ml y se utilizó el protocolo de extracción anteriormente explicado.

### Curva de ADN parásito

Se realizaron diluciones seriadas al décimo del ADN genómico del parásito para obtener una curva de calibrado desde  $10 \times 10^4 - 1$  parásito en relación al Ct. Se calculó la ecuación de la recta, la eficiencia de amplificación (E),  $R^2$  de la misma.



Eficiencia 107.36 %

$R^2$  0.989

#### Condiciones de PCR cuantitativa

Las reacciones de PCR en tiempo real se llevaron a cabo en un volumen final de 15  $\mu$ L/pozo en el equipo de PCR tiempo real 7500 Fast (Applied Biosystems)

empleando el programa que se detalla debajo. Los cebadores utilizados fueron TCZ<sub>1</sub> (5'-CGA GCT CTT GCC CAC ACG GGT GCT-3') y TCZ<sub>2</sub> (5'-CCT CCA AGC AGC GGA TAG TTC AGG-3') en una concentración de 200 nM y añadiendo 10 µg de ADN molde de cada muestra en cada pocillo por triplicado.

Programa qPCR:

Paso	Temperatura	Tiempo
Desnaturalización inicial	95 °C	15 mín
Desnaturalización	95 °C	15 seg
Anneling	60 °C	20 seg
Elongación	72 °C	20 seg

N° ciclos: 40

Cálculo cantidad de parásito en tejido placentario infectado

Mediante la interpolación del valor de Ct dado para la muestra incógnita en la curva de calibrado se obtiene la cantidad de parásito presente en 10 µg de ADN genómico placentario.

### **Análisis de Producción de NO**

- En los sobrenadantes de los cultivos se midió la producción de NO utilizando reactivo de Griess para medir nitritos y lectura a 540 nm en lector de ELISA (Green et al., 1982).

-El sistema reactivo de Griess está basado en la reacción de diazotación de la sulfanilamida con el Dihidrocloruro de Naftiletilenediamida (NED) en presencia de los nitritos y en medio de ácido fosfórico (H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>).

-Se realizó una curva patrón de Nitritos con soluciones de  $\text{NaNO}_2$  de las siguientes concentraciones: 100  $\mu\text{M}$ , 50  $\mu\text{M}$ , 25  $\mu\text{M}$ , 12,5  $\mu\text{M}$ , 6,25  $\mu\text{M}$ , 3,13  $\mu\text{M}$ , 1,56  $\mu\text{M}$ .

-Para el blanco de reacción se utilizó 50  $\mu\text{l}$   $\text{H}_2\text{O}$  bidestilada más 50  $\mu\text{l}$  de reactivo de Griess.

-Se tomaron 50  $\mu\text{l}$  de muestra (tanto para el estándar como para la muestra problema) más 50  $\mu\text{l}$  de reactivo de Griess (solución A + solución B, preparado en el momento de ser usado) se incubó en oscuridad durante 10 minutos y se leyó en lector de placa de Elisa BioRad Model 680, a 540 nm. Las concentraciones de las muestras problema se obtuvieron aplicando la fórmula obtenida de la línea de regresión que se realizó con los valores de la curva patrón.

### **Análisis de la expresión transcripcional y proteica de NOSe**

#### **RT-PCR**

Para el análisis de la expresión transcripcional de NOSe, se aisló el ARN de explantos placentarios utilizando el kit RNeasy FFPE de Qiagen, la extracción se realizó de la siguiente manera:

A uno de los explantos tomados de los co-cultivos y mantenidos en aire líquido hasta ser procesados, se lo seccionó con un bisturí estéril (un bisturí por muestra) luego se lo suspendió en 150  $\mu\text{l}$  de buffer PKD más 10  $\mu\text{l}$  de Proteinasa K. Se incubó 15 minutos a 55 °C, luego agrego 320  $\mu\text{l}$  de buffer RBC, se vortexeó y el lisado se transfirió el lisado a columna " gDNA eliminator spin column" puesto en un tubo colector de 2 ml. Centrifugado a 8000 g por 30 segundos y guardamos el filtrado. Al mismo le agregamos 720  $\mu\text{l}$  de etanol 100% al filtrado. Tomamos 700  $\mu\text{l}$  de la muestra y lo agregamos a la columna RNAeasy minielute spin (que viene con un tubo colector de 2 ml, centrifugamos a máxima velocidad por 30 segundos,

descartamos el filtrado, repetimos el paso anterior hasta que pasamos toda la muestra. Agregamos 500  $\mu$ l de buffer RPE a la columna, centrifugamos 15 segundos a velocidad máxima, descartamos el filtrado. Ponemos en un tubo colector nuevo a la columna centrifugamos a máxima velocidad 5 minutos. Descartamos el filtrado. Se puso la columna en tubo de colección de 1,5 ml agrego 30  $\mu$ l de H<sub>2</sub>O, centrifugamos 1 minuto a máxima velocidad. Para cuantificar el ARN aislado leímos la absorbancia de la muestra a 260 nm x 44  $\mu$ g/ml x factor de dilución. Para chequear la integridad del ARN corrimos en gel de agarosa al 1,2 % en buffer TAE 1x.

- Se aisló el RNA para analizar la transcripción de NOS en las distintas situaciones, realizando una reacción de RT-PCR semicuantitativa para NOS-e, utilizando un control interno la expresión de la enzima estable GADPH (Lyall et al., 1998; Rossmanith et al., 1999). Se determinó las Nitric Oxide Synthases tipo III (endotelial). Se efectuó extracción de ARN de las vellosidades coriónicas para realizar la RT-PCR.

- Un microgramo de ARN se empleó para una transcripción reversa hacia ADNc, se utilizó la enzima M-MLV RT (Superscript III Reverse Transcriptase Invitrogen) 400 U por muestra, se utilizaron random primers, siguiendo el protocolo establecido por el fabricante de la transcriptasa reversa.

- El ADNc se utilizó como templado para la PCR. Utilizando primers para NOSe y para GADPH. Se realizó una MasterMix para cada muestra, conteniendo el ADNc que luego fue dividido en dos para realizar cada PCR a los fines de poder semicuantificar la producción de NOSe relacionado a la producción constitutiva de la enzima GADPH.

-La mezcla de reacción de PCR de 50 µl conteniendo la mezcla de la reacción de la transcripción reversa, 1nM de mezcla de dNTP, 1U de ADN taq-polimerasa (Invitrogen) y buffer de reacción 1x conteniendo 1,5 mM de ClMg, los primers

eNOS: sense: 5'GTT ACC ATG GCA ACC AAC GTC CTG3' ; antisense 5'TCT CCC GGA ACT GGA AGG GAA AG3' (Lyall et al. 1998).

GAPDH: sense: 5'GGAGTCAACGGATTTGGT 3, antisense 5'GTGATGGGATTTCCATTGAT 3' (Rossmann et al. 1999; Markvardsen et al. 1995) fueron agregados a 0,4 µM cada uno.

Realizamos 30 ciclos de amplificación, luego de 4 minutos de desnaturalización inicial a 94° C seguido de ciclos de desnaturalización (1 min 94 °C) annealing (1 min 60° C) y extensión (2 min 72 °C). La extensión final fue realizada por 10 minutos a 72 °C. La reacción fue realizada en el termociclador Eppendorf modelo...

Los productos de PCR fueron corridos en gel de agarosa al 1,8% utilizando buffer TAE 0,5x. La intensidad de las bandas fueron analizadas con el programa Scion Image for Windows 4.0.3.2 y la intensidad de la banda de la NOSe fue normalizada con la intensidad de la banda obtenida de la PCR de la GAPDH.

### **Inmunohistoquímica**

La expresión proteica de eNOS se analizó usando anticuerpos IgG policlonal específicos contra el extremo amino terminal de NOSe (Santa Cruz Biotechnology Company, NOS3 (N20): sc-653).

Los cortes se desparafinaron con xilol y rehidrataron en una serie sucesiva de alcoholes (100°, 96°, 70°, 50°) hasta llegar a PBS 1X pH 7,3. La actividad peroxidasa endógena se bloqueo con peróxido de hidrógeno 3% en PBS por 15 minutos.

Los sitios de unión inespecífica de las inmunoglobulinas fueron bloqueados por un preincubado de 15 minutos con 5% de SBF (GIBCO BRL, Grand Island, N. Y.) diluido en PBS, y se lavó 3 veces con PBS.

Se incubaron los cortes con el anticuerpo primario, anti IgG de humano contra NOSe obtenido en conejo en una dilución 1:200 durante la noche a 4°C.

Luego de descartar el anticuerpo primario y secar alrededor del corte se colocó el anticuerpo secundario, anti-IgG Biotinilado en PBS por 30 minutos a temperatura ambiente. Se lavó tres veces con PBS y se secó.

Se colocó la Peroxidasa conjugada con Estreptavidina por 20 minutos a temperatura ambiente, y luego de lavar y secar se incubó con la solución del sustrato de la Peroxidasa y el cromógeno, DAB (3,3'diaminobencidina) en Peróxido de Hidrógeno 0,3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en Buffer Tris 0,05M pH 7,6 controlando en microscopio hasta obtener coloración, aproximadamente 1 minutos.

Todas las incubaciones se realizaron en cámara húmeda.

Luego de varios lavados con agua destilada se contrastó con Hematoxilina Biopur por 1 minuto, se deshidrató, clarificó y se montó con medio de montaje Canadax BIOPUR.

Se realizó el control de técnica utilizando SBF al 20% en PBS en lugar del anticuerpo primario y el control experimental con cortes de tejidos sin cultivar con *T. cruzi*.

Para esta técnica se utilizó el kit de sistema de detección amplificado (Biotin-Streptavidin) BioGenex.

Semicuantificación en Video Microscopio Zeiss, empleando el software AxioVision 3.0.6 (Carl Zeiss Microscopy). Cortes cada 60  $\mu\text{m}$  de los explantos Se analizó unas 600  $\mu\text{m}$  de cada explanto placentario. Se midió el porcentaje del área marcada para NOSe con respecto al área total analizada. La intensidad de marca se cuantificó con el software Axiovision 3.0.6 (Carl Zeiss Microscopy), realizando un análisis de la intensidad promedio de los pixels del área marcada, tomando los valores 0 para la ausencia de intensidad (color negro) y 255 para el máximo de intensidad (color blanco), el análisis se realizó en las fotografías en blanco y negro invertidas.

### **Western blot**

#### EXTRACCIÓN DE PROTEÍNAS TOTALES DE TEJIDO PROVENIENTES DE EXPLANTOS PLACENTARIOS

Mediante el uso de un buffer de extracción proteica cracking buffer se obtuvieron las proteínas del tejido.

#### CUANTIFICACIÓN PROTEICA MEDIANTE TÉCNICA de Lowry

-Solución Standard de seroalbumina bovina (1 mg/ml). -Muestra problema, de concentración desconocida.

-Reactivo de Lowry, compuesto por tres soluciones que se mezclan en el momento de su utilización, y que son las siguientes: A: Carbonato sódico al 2% en NaOH 0.1 M B: Sulfato cúprico al 1% C: Tartrato sódico-potásico al 2% En el momento de su uso se mezclan 50ml de A con 0.5 ml de B y 0.5 ml de

C. -Reactivo de fenoles de Folin-Ciocalteau. Este reactivo viene preparado comercialmente y se debe mantener en refrigeración. Para su uso se diluye inmediatamente antes en la relación de 1 parte de reactivo por 2 de agua destilada.

## CUANTIFICACION DE PROTEINAS DE LA MUESTRA

Muestra Problema (1ml) +R. de Lowry (5ml) → Agitar enérgicamente y dejar 15 minutos → Reactivo de Folin (5 ml).

Luego de 30 minutos se lee la Absorbancia a 500 nm

ELECTROFORESIS EN GELES DE POLIACRILAMIDA (SDS-PAGE) Y *WESTERN BLOT*

Con el objeto de analizar la expresión de la enzima productora de NO en la placenta, la NOSe, se utilizó el ensayo de SDS-PAGE seguido de *Western blot*, el cual consistió básicamente en tres pasos: separación electroforética de los componentes de la muestra en un gel de poliacrilamida, electrotransferencia de los mismos a una membrana de difluoruro de polivinilo (PVDF) e identificación de las moléculas transferidas por interacción con anticuerpos específicos.

La electroforesis en geles de poliacrilamida (PAGE) se desarrolló siguiendo esencialmente el método descrito por Laemmli (1970)(Laemmli 1970), utilizando para el armado de los geles el sistema de electroforesis modular vertical Mini-Protean 3 (Bio-Rad, EUA.). Todos los geles fueron realizados en condiciones desnaturizantes, agregando el detergente iónico dodecil sulfato de sodio, SDS (SDS-PAGE), en presencia de un agente reductor de enlaces disulfuro ( $\beta$ -mercaptoetanol). Para ello, se utilizó un gel de apilamiento con una concentración de acrilamida/bisacrilamida del 5% (P/V) y un gel de separación con una concentración de acrilamida/bisacrilamida del 15% (P/V). Las muestras se prepararon con una solución de Tris-HCl 50 mM, SDS 2% (P/V), glicerol 10% (V/V),  $\beta$ -mercaptoetanol 5% (V/V), azul de bromofenol 0,05% (P/V), pH 6,8 (solución de siembra) en proporción 3:1. Las muestras fueron incubadas a 100 °C durante 5 min para favorecer la desnaturización de las moléculas, y sembradas directamente

sobre el gel de apilamiento. La corrida electroforética se llevó a cabo empleando solución de corrida [Tris 25 mM, glicina 0,2 M; SDS 0,1%], a un voltaje constante de 200 V, sumergiendo el módulo en baño de hielo. La corrida finalizó cuando el frente de corrida alcanzó 0,5 cm del borde inferior del gel de separación.

Luego de la electroforesis se realizó la transferencia de las proteínas a una membrana de PVDF (Bio-Rad), empleando el mismo equipo de Bio-Rad (transferencia sumergida). Se utilizó un protocolo estándar de transferencia de proteínas (Hames, 1990), empleando como solución de transferencia Tris 25 mM, glicina 192 mM, pH 8,3, metanol 20% (V/V), a intensidad de corriente constante de 180 mA durante 1 h, refrigerando el dispositivo en todo momento.

Posteriormente, se llevó a cabo la detección inmunoquímica de NOSe como se describe a continuación.

Bloqueo: los sitios de la membrana de PVDF sin proteínas adsorbidas fueron bloqueados por inmersión de la misma en solución de leche descremada 5% (P/V) en buffer TBS (Tris-HCl 50 mM; NaCl 150 mM; pH 7,5) con el agregado de Tween 20 al 0,05% (V/V). Se incubó durante 1 h a temperatura ambiente con agitación.

Primera incubación: la membrana de PVDF se incubó con una solución de Igs de anti NOSe en una dilución 1:2.000 preparada con la solución diluyente de *Western blot* [leche descremada 0,5% (P/V) en TBS-Tween 20 0,05% (V/V)]. Se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente con agitación.

Segunda incubación: la membrana se incubó con anticuerpos de Anti rabbit, conjugados con la enzima peroxidasa en una dilución 1:2.000 en solución diluyente de *Western blot*. Se incubó durante 1 h a temperatura ambiente y en agitación.

Revelado: se empleó el kit de quimioluminiscencia ECL™ *Western Blotting Analysis System* (GE Healthcare, EE. UU.), siguiendo las indicaciones del fabricante. La membrana se incubó con el reactivo durante 1 min a temperatura ambiente, se escurrió y se colocó en un soporte de acrílico cubriéndola con un nylon para evitar el contacto del sustrato con la película reveladora. Finalmente, la membrana fue expuesta a una película fotográfica Kodak Biomax XAR Film (Kodak, EE. UU.) en un cuarto oscuro durante 1,5-2 min. El revelado de la película fotográfica se efectuó en forma manual empleando el método convencional de revelado y fijación (Reforzador y Fijador GBX, Kodak, Brasil).

Luego de cada etapa se realizaron tres lavados, los cuales consistieron en sumergir la membrana de PVDF en solución de TBS-Tween 20 al 0,05% (V/V) durante 5 min con agitación.

## **Análisis de la producción de Nitrotirosina**

### **Inmunohistoquímica**

- Se realizó en cortes de 5µm montados en vidrios con gelatina la inmunomarcación para la nitrotirosina como un índice de estrés oxidativo.

Los cortes se desparafinaron con xilol y rehidrataron en una serie sucesiva de alcoholes (100°, 96°, 70°, 50°) hasta llegar a PBS 1X pH 7,3. La actividad peroxidasa endógena se bloqueó con peróxido de hidrógeno 30% en PBS por 30 minutos.

Los sitios de unión inespecífica de las inmunoglobulinas fueron bloqueados por un preincubado de 1 hora con 20% de SBF (GIBCO BRL, Grand Island, N. Y.) diluido en PBS.

Se incubaron los cortes con el anticuerpo primario: anticuerpo monoclonal anti – nitrotirosina de conejo 1/100 (24 horas en cámara húmeda a 4 °C).

Luego de descartar el anticuerpo primario lavar con PBS, se secó alrededor del corte se colocó el anticuerpo secundario, multilinker, anti-IgG Biotinilado en PBS por 1 hora a temperatura ambiente en cámara húmeda. Se lavó tres veces con PBS y se secó.

Se colocó la Peroxidasa conjugada con Estreptavidina por 20 minutos a temperatura ambiente, y luego de lavar y secar se incubó con la solución del sustrato de la Peroxidasa y el cromógeno, DAB (3,3'diaminobencidina) con Peróxido de Hidrógeno 0,3 %  $H_2O_2$  en Buffer Tris 0,05M pH 7,6 controlando en microscopio hasta obtener coloración, aproximadamente 1 minutos.

Luego de varios lavados con agua destilada, se deshidrató, clarificó y se montó con medio de montaje Canadax BIOPUR.

Se realizó el control de técnica utilizando SBF al 20% en PBS en lugar del anticuerpo primario y el control experimental con cortes de tejidos cultivados sin *T. cruzi*.

- Se tomaron 10 fotos al azar de cada preparado y se cuantificó el porcentaje de área tejido marcado para nitrotirosina con respecto al área total analizada, este análisis se realizó con el software Axiovision 3.0.6 (Carl Zeiss Microscopy), la intensidad de marca se cuantificó con el software UTHSCSA Image tool 3.0, realizando un análisis de la intensidad promedio de los pixels del área marcada, tomando los valores 0 para la ausencia de intensidad (color negro) y 255 para el máximo de intensidad (color blanco), el análisis se realizó en las fotografías en blanco y negro invertidas.

## **Análisis de actividad de Gamaglutamil transpeptidasa**

La enzima de mamífero es parte del mecanismo de defensa antioxidante celular inicia la descomposición del glutati6n extracelular (GSH, proporciona a las c6lulas un suministro local de ciste6na y contribuye a mantener los niveles de GSH intracelulares. Se realiz6 una t6cnica cin6tica con los homogenatos de tejidos, midiendo el producto de reacci6n en 3 tiempos, 0, 5' y 10'. La  $\gamma$ -glutamyl transferasa es una carboxipeptidasa que cataliza la siguiente reacci6n:

$L\text{-}\gamma\text{-glutamyl-3-carboxi-4-nitroanilida} + \text{glicilglicina} \rightarrow L\text{-}\gamma\text{-glutamylglicilglicina} + 5\text{-amino-2-nitrobenzoato}$ .

El producto de la reacci6n se lee a 405 nm y se calcula un  $\Delta\text{Abs}$  restando cada lectura de la anterior y promediando el valor. La actividad se correlaciona con la cantidad de prote6nas medidas por Lowry, y el homogenato se realiz6 con el buffer TLB que no inhibe la actividad enzim6tica. El ensayo se realiz6 como se describe a continuaci6n.

## **An6lisis Estad6stico**

Los resultados est6n presentados como Media  $\pm$  SEM. La comparaci6n de los valores de 6rea de alteraciones estructurales en tejidos, 6rea de marcaci6n positiva para NOSe y Nitrotirosina, intensidad de marca positiva de Nitrotirosina, expresi6n semicuantitativa del ARNm de la NOSe, an6lisis de expresi6n proteica por western blot de NOSe, actividad de  $\gamma$ GT, niveles de TNF $\alpha$  y sus Receptores solubles 1 y 2 y cuantificaci6n de carga parasitaria absoluta, fue realizado por el m6todo de an6lisis de varianza de dos v6as (ANAVA). Las diferencias entre los grupos individuales fueron testeadas utilizando el m6todo de Bonferroni, test post hoc utilizado para la comparaci6n de varianzas. Las comparaciones correspondientes a los valores de los niveles de nitritos fueron realizados por el m6todo de Student t test. Fue considerado estad6sticamente significativo un nivel de probabilidad  $p \leq 0,05$ .

# RESULTADOS

### Resultados Previos

En trabajos previos de nuestro laboratorio analizamos la producción de NO en co-cultivos placentarios de 24hs en presencia de  $10^6$  parásitos de dos cepas de *Trypanosoma cruzi* (Tulahuen y Lucky)

Se observó un aumento no significativo en los sobrenadantes de los co-cultivos en la cantidad de nitritos, como metabolito estable de la producción de óxido nítrico (Triquell et al. 2009). Se pudo observar una tendencia al aumento con ambas cepas de parásito, con respecto al control sin infectar, teniendo en cuenta estos datos y que el NO es un agente deletéreo para el *T. cruzi*, que la placenta expresa la enzima NOSe que produce este metabolito, más todo lo expuesto en la introducción nos llevaron a plantearnos las preguntas que intentamos responder a continuación.

## RESULTADOS: Sección 1

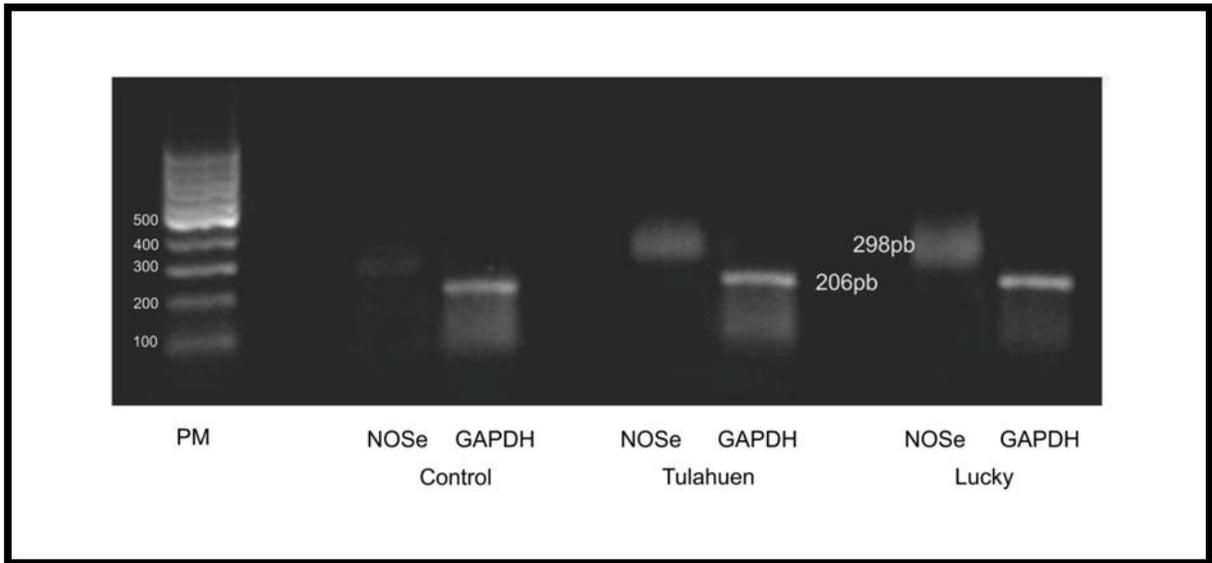
Determinar modificaciones de la expresión de NOSe, enzima productora de óxido nítrico, inducida por formas infectivas de *Trypanosoma cruzi*, *in vitro*.

### 1. Expresión de la isoforma NOSe

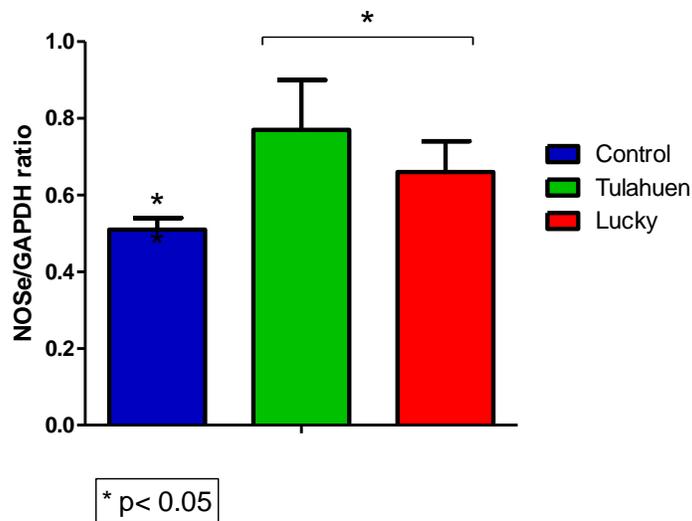
#### 1.1 Expresión del ARNm de la NOSe en explantos placentarios co-cultivados con dos cepas de *Trypanosoma cruzi*

Para determinar si la transcripción de la enzima productora del NO en la placenta, se encuentra aumentada en presencia del parásito, se analizó semicuantitativamente la producción del ARNm específico para la enzima.

En el tejido placentario co-cultivado con la cepa Tulahuen y el aislado Lucky durante 24 hs, se observó un aumento en la transcripción del ARNm de la NOSe con respecto al control que fue cultivado en las mismas condiciones pero sin la presencia de trypomastigotes. En la Figura 1 se observa la corrida en el gel de agarosa del producto de la RT-PCR semicuantitativa para NOSe y como control interno la expresión de la enzima GAPDH que posee una expresión constitutiva en la placenta.

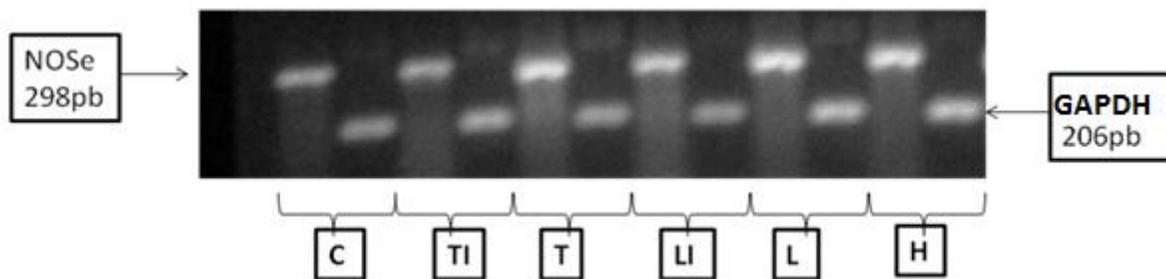


**Figura 1 Expresión transcripcional de NOS2e en cultivos placentarios** Corrida electroforética del producto de RT-PCR del ARN extraído de los explantos placentarios de los diferentes co-cultivos. Se observa imagen representativa de al menos tres ensayos. De izquierda a derecha observamos: Marcador de PM, los productos de RT-PCR para NOS2e y GAPDH de **Control**: cultivo placentario sin *T. cruzi* de 24hs. **Tulahuen**: cultivo placentario co-cultivado con  $10^6$  *T. cruzi* de la cepa Tulahuen por 24 hs. **Lucky**: cultivo placentario co-cultivado con  $10^6$  *T. cruzi* de la cepa Lucky por 24 hs.



**Figura 2 Expresión relativa de la enzima NOS2e normalizada con respecto a la expresión de GAPDH.** Control: expresión de NOS2e en explantos placentarios cultivados por 24 hs sin *T. cruzi*. Tul: expresión de NOS2e en explantos placentarios co-cultivados con  $10^6$  parásitos de la cepa Tulahuen por 24 hs. Lucky: expresión de NOS2e en explantos placentarios co-cultivados con  $10^6$  parásitos de la cepa Lucky por 24hs. Se muestra el Valor Medio  $\pm$  ESM. El análisis se realizó con el test estadístico ANAVA seguido del test post-hoc de Comparación Múltiple de Bonferroni. Se consideró estadísticamente significativo un p-valor  $< 0,05$  (\*).

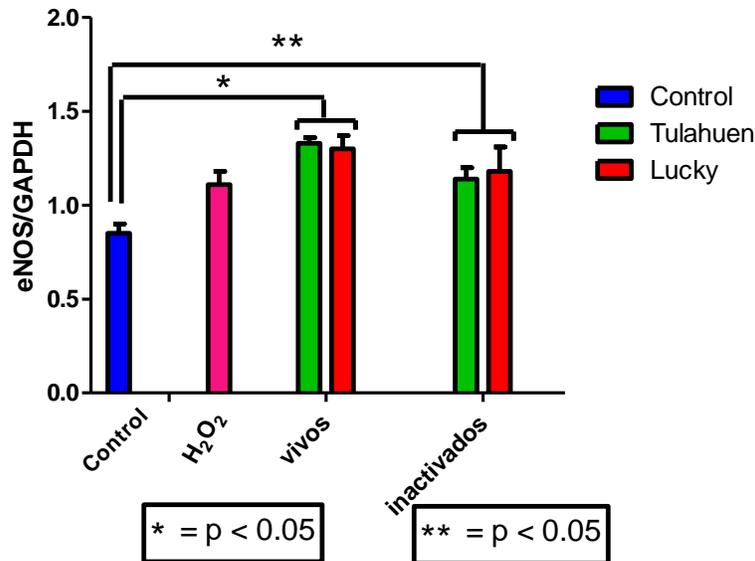
Se midió la intensidad promedio del producto de RT-PCR corrido en gel de agarosa del ARNm de NOSe de los co-cultivos placentarios con ambas cepas y cultivo control; y se lo normalizó con la expresión de la enzima GAPDH. Se observó un incremento en la expresión de NOSe en las placentas infectadas, siendo mayor la expresión en el co-cultivo con la cepa Tulahuen, como se observa en la Figura 2. La diferencia de expresión que se observó entre ambas cepas no fue estadísticamente significativa.  $p > 0,05$ . Por el contrario la diferencia de expresión entre las placentas infectadas y el control sin infección presentaron una diferencia estadísticamente significativas ( $p \leq 0,05$ ).



**Figura 3** Corrida electroforética del producto de RT-PCR del RNA extraído de los explantos placentarios para NOSe y GAPDH de los diferentes co-cultivos. Se observa imagen representativa de al menos tres ensayos. **C:** Control, cultivo placentario sin *T. cruzi* de 24hs. **TI:** cultivo placentario co-cultivado con  $10^6$  *T. cruzi* inactivados por calor de la cepa Tulahuen por 24 hs. **T:** cultivo placentario co-cultivado con  $10^6$  *T. cruzi* de la cepa Tulahuen por 24 hs **LI:** cultivo placentario co-cultivado con  $10^6$  *T. cruzi* inactivado por calor de la cepa Lucky por 24 hs. **L:** cultivo placentario co-cultivado con  $10^6$  *T. cruzi* de la cepa Lucky por 24 hs. **H:** cultivo placentario con  $H_2O_2$  200 $\mu$ M por 24 hs

Seguidamente, se analizó si la expresión se veía modificada por el estímulo del parásito inactivado por calor, para ello cultivamos explantos placentarios con  $10^6$  parásitos de ambas cepas, viables, en iguales condiciones que el experimento anterior, y con  $10^6$  parásitos de ambas cepas, inactivados por calor, sin la capacidad de infectar, para analizar si el estímulo que gatilla la expresión de NOSe, requiere

de la invasión del parásito. Otro estímulo que se ensayó, fue exponer el tejido placentario a  $H_2O_2$  200  $\mu$ M, especie reactiva de oxígeno.

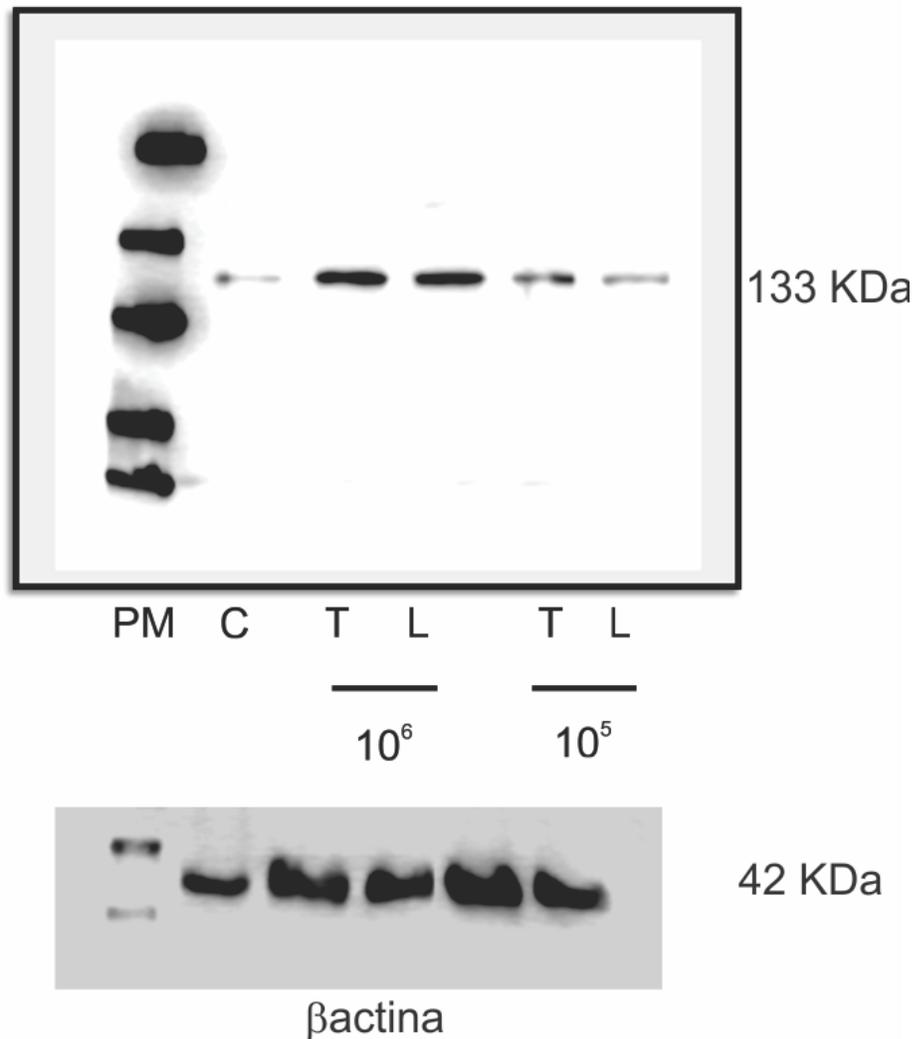


**Figura 4 Expresión relativa de la enzima NOSe normalizada con respecto a la expresión de GAPDH. Control:** expresión de NOSe en explantos placentarios cultivados por 24 hs sin *T. cruzi*.  **$H_2O_2$  200  $\mu$ M:** expresión de NOSe en explantos cultivados con  $H_2O_2$  200  $\mu$ M por 24 hs. **Vivos:** expresión de NOSe en explantos placentarios co-cultivados con parásitos de la cepa Tulahuen y Lucky vivos, por 24 hs. **Inactivados:** expresión de NOSe en explantos placentarios co-cultivados con parásitos de la cepa Tulahuen y Lucky inactivados por calor, por 24 hs. Se muestra el Valor Medio  $\pm$  ESM. El análisis se realizó con el test estadístico ANAVA seguido del test post-hoc de Comparación Múltiple de Bonferroni. Se consideró estadísticamente significativo un p-valor < 0,05 (\*) (\*\*).

Se puede observar que en presencia de  $10^6$  trypomastigotes de ambas cepas de *T. cruzi* se produce un aumento en la expresión del ARNm de NOSe, cuando se cultivó con parásitos son inactivados por calor, se observó un aumento de la expresión menor que con los parásitos vivos, significativo estadísticamente. Además en presencia de  $H_2O_2$  200 $\mu$ M, se observa un aumento en la expresión, aunque el mismo no fue significativo.

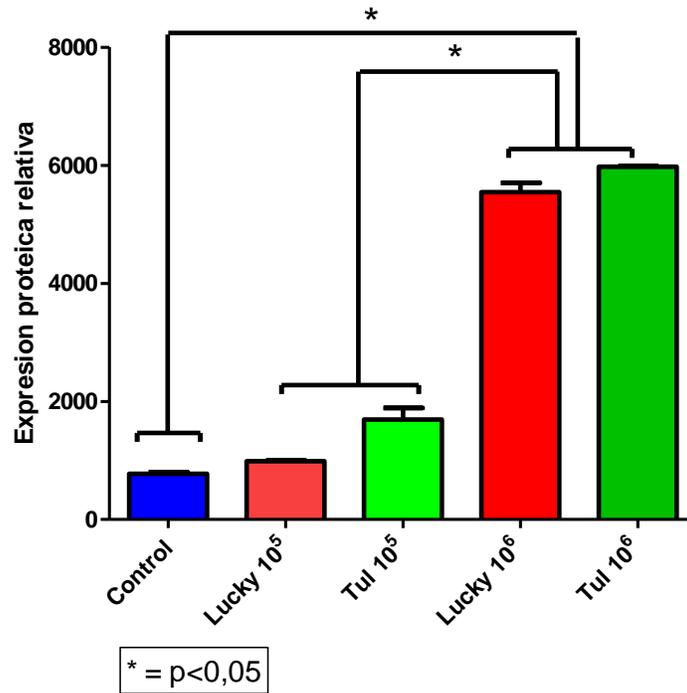
## 1.2 Análisis de la expresión proteica de NOSe

En la Figura 5 se observa una imagen del Western blot para detectar NOSe en explantos placentarios co-cultivados con las cepas Tulahuen y Lucky con dos cargas parasitarias diferentes cada uno  $10^6$  y  $10^5$  trypomastigotes.



**Figura 5 Expresión de NOSe en explantos placentarios cultivados con *T. cruzi*.** Se observa imagen representativa de al menos tres ensayos independientes de Western blot, donde se observa en el panel superior la expresión de NOSe en **C**: control cultivo de explantos placentarios sin parásitos. **T**: cultivos de explantos placentarios con trypomastigotes de la cepa Tulahuen. **L**: cultivos de explantos placentarios con trypomastigotes de la cepa Lucky, ambas cepas en dos concentraciones de parásitos,  $10^6$  y  $10^5$ . En el panel inferior se observa la expresión de  $\beta$ actina, para el análisis semicuantitativo de la expresión de NOSe.

### Cuantificación relativa de la expresión de NOSe



**Figura 6 Relación de cuantificaciones densitométricas de bandas de NOSe /  $\beta$ -actina** de al menos tres experimentos independientes. Se muestra el Valor Medio  $\pm$  ESM. El análisis se realizó con el test estadístico ANAVA seguido del test post-hoc de Comparación Múltiple de Bonferroni. Se consideró estadísticamente significativo un p-valor < 0,05 (\*).

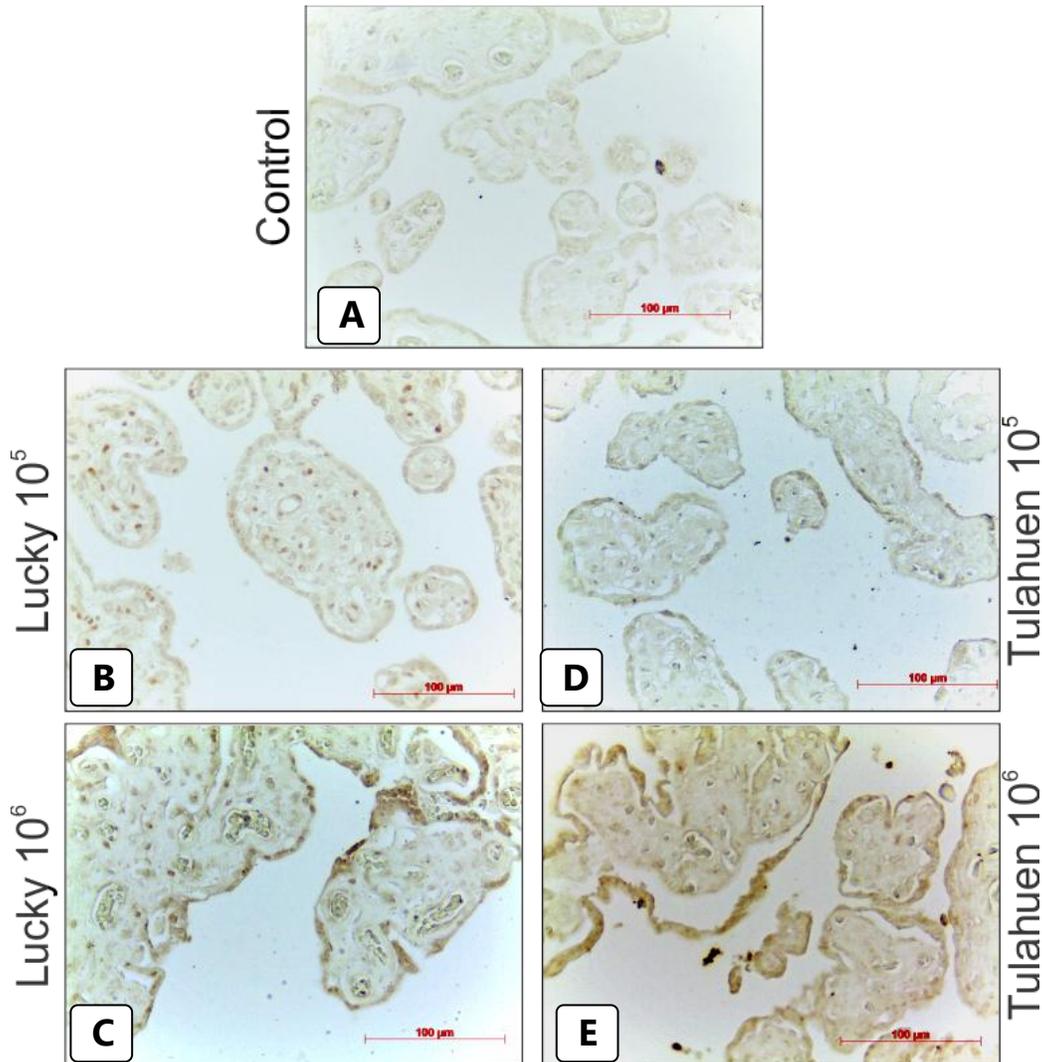
Se observó un aumento de la expresión de NOSe en presencia de ambas cepas de parásitos en los co-cultivos placentarios de 24hs. que no fue estadísticamente significativa con  $10^5$  parásitos de ambas cepas, y con  $10^6$  el incremento si fue estadísticamente significativo en relación al control y en relación a la menor cantidad de parásitos ( $10^5$ ), entre ambas cepas no se observó diferencias significativas en la expresión de NOSe en ninguna de las dos cargas parasitarias expuestas.

### 1.3 Expresión y localización histológica de la NOSe

Se realizó un análisis de la expresión de la NOSe por medio de una técnica IHQ específica, para cuantificar la inmunomarcación, y localizar las estructuras

placentarias que expresan esta enzima en presencia y ausencia de parásitos, ya que la misma es fundamental para la defensa del tejido placentario frente al *T. cruzi*.

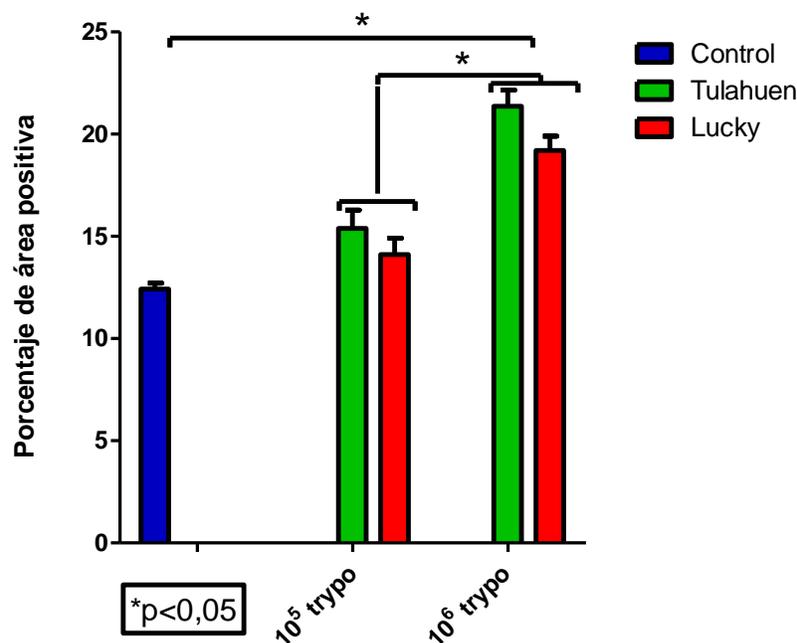
Se analizó en los co-cultivos placentarios de 24 hs., con ambas cepas, con  $10^6$  y  $10^5$  parásitos.



**Figura 7: Inmunohistoquímica para la detección de NOSe** explantos placentarios cultivados por 24 hs **A)** Control sin parásitos y co-cultivos con parásitos de las cepas: **B)** Lucky  $10^6$  trypanomastigotes **C)** Lucky  $10^5$  trypanomastigotes **D)** Tulahuen  $10^6$  trypanomastigotes **E)** Tulahuen  $10^5$  trypanomastigotes. Imagen representativa de al menos tres ensayos independientes, tomada con Video Microscopio Zeiss. 400x.

En el Figura 7 se observa la Inmunohistoquímica para NOSe, donde se advierte la expresión de la NOSe localizada principalmente en el sinciotrofoblasto, y en el

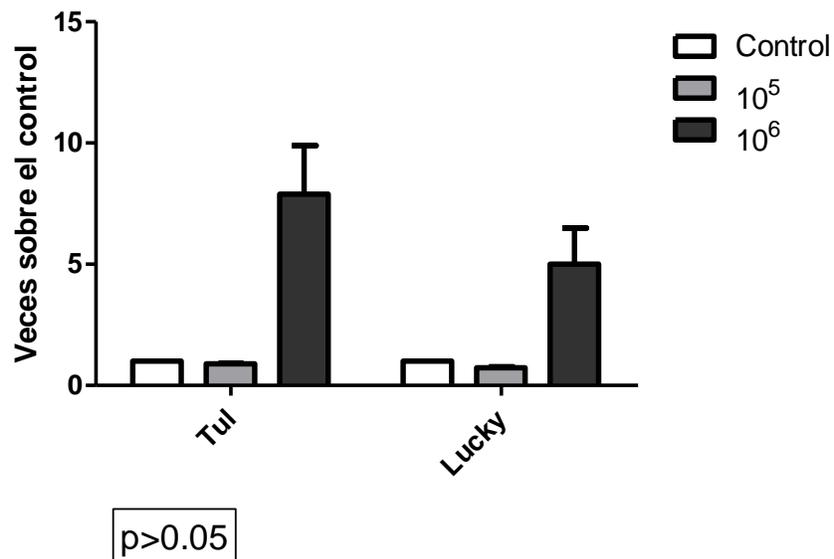
endotelio de los vasos sanguíneos fetales, en presencia de las dos cepas de *T. cruzi* se observa un aumento en la expresión de la NOSe, lo que se puede apreciar en la Figura 8 un aumento significativo en el área de marca con respecto al control sin infectar, y que entre ambas cepas no hay una diferencia significativa, además este aumento es proporcional a la cantidad de trypomastigotes a los que son expuestas el tejido placentario, observando una diferencia significativa entre la expresión de NOSe en presencia de  $10^6$  trypomastigotes y  $10^5$  trypomastigotes de ambas cepas.



**Figura 8 Cuantificación del porcentaje de área con marca positiva para NOSe.** Se observa la representación gráfica de los porcentajes de área marcados/ el área total, analizado mediante software Axiovision.3.0.6. Se analizaron los porcentajes de áreas de marca de Control de cultivos placentarios cultivados sin parásitos y las áreas de cultivos placentarios con la cepa Tulahuen  $10^6$  y  $10^5$  trypomastigotes y la cepa Lucky  $10^6$  y  $10^5$  trypomastigotes. Se observó un aumento no significativo con ambas cepas con respecto al control con la concentración de  $10^5$  trypomastigotes y un aumento estadísticamente significativo entre el control y el co-cultivo con las cepas Tulahuen y Lucky con  $10^6$  parásitos, Se muestra el Valor Medio  $\pm$  ESM. El análisis se realizó con el test estadístico ANAVA seguido del test post-hoc de Comparación Múltiple de Bonferroni Se consideró estadísticamente significativo un p-valor  $< 0,05$  (\*).

#### 1.4 Medición de la producción de NO por medio de la detección de nitritos en el medio sobrenadante de cultivo.

Se midieron la concentración de nitritos, que es un metabolito estable del NO, en los medios sobrenadantes de los cultivos placentarios de 24hs: Control sin infectar; con  $10^6$  parásitos de la cepa Tulahuen; con  $10^5$  parásitos de la cepa Tulahuen; con  $10^6$  parásitos de la cepa Lucky y con  $10^5$  parásitos de la cepa Lucky.



**Figura 9: Concentración relativa de nitritos en medio sobrenadante de cultivo** de explantos de placentas humanas cultivados por 24 hs sin *T. cruzi* (Control) y con cepa Lucky (Lucky)  $10^6$  y  $10^5$  parásitos y Tulahuen (Tul)  $10^6$  y  $10^5$  del *T. cruzi*. Se muestra el Valor Medio  $\pm$  ESM. El análisis se realizó con el test estadístico ANAVA seguido del test post-hoc de Comparación Múltiple de Bonferroni. Se consideró estadísticamente significativo un p-valor < 0,05 (\*) (p=0,4110).

Los valores obtenidos de las concentraciones de nitritos en los medios sobrenadantes de cultivo, se expresan como veces sobre el control, se obtuvo un valor relativo al control de cada valor experimental, se obtuvieron y graficaron las medias  $\pm$  ESM de los valores normalizados con el control, no se observó un aumento en la concentración de nitritos en los sobrenadantes de cultivo de las

placentas con  $10^5$  parásitos de las dos cepas estudiadas, respecto a la placenta sin infectar. Se observó un aumento en la producción de nitritos de los sobrenadantes de los cultivos de las placentas con  $10^6$  parásitos de ambas cepas, que no fue estadísticamente significativo, sin embargo podemos inferir que se presenta una tendencia al aumento.

## CONCLUSIÓN - Sección 1

Podemos concluir que el *Trypanosoma cruzi* estimula la expresión de la enzima NOS<sub>e</sub>, la que se localiza principalmente en el STB que es la primera barrera placentaria, también se observa un aumento en la expresión en los vasos fetales y en algunas células del estroma placentario. Esta respuesta del tejido placentario es dependiente de la cantidad de parásitos, observándose un incremento estadísticamente significativo tanto en la expresión génica como en la expresión proteica con respecto al control en presencia de  $10^6$  trypomastigotes, como ya fue descrito en publicaciones anteriores de nuestro grupo, el NO es uno de los agentes parasiticidas que produce la placenta (Díaz-Luján et al. 2004; Triquell et al. 2009). Al observar aumento en la expresión de NOS<sub>e</sub> y una tendencia al aumento en la concentración de nitritos, el siguiente objetivo que nos planteamos a partir de estos resultados es la medición de los residuos de nitrotirosina, ya que como está descrito en la bibliografía y fue planteado en la introducción el NO es un gas con una vida media muy corta que en presencia del anión superóxido se producen peroxinitritos, que es una especie reactiva más estable y más duradera.

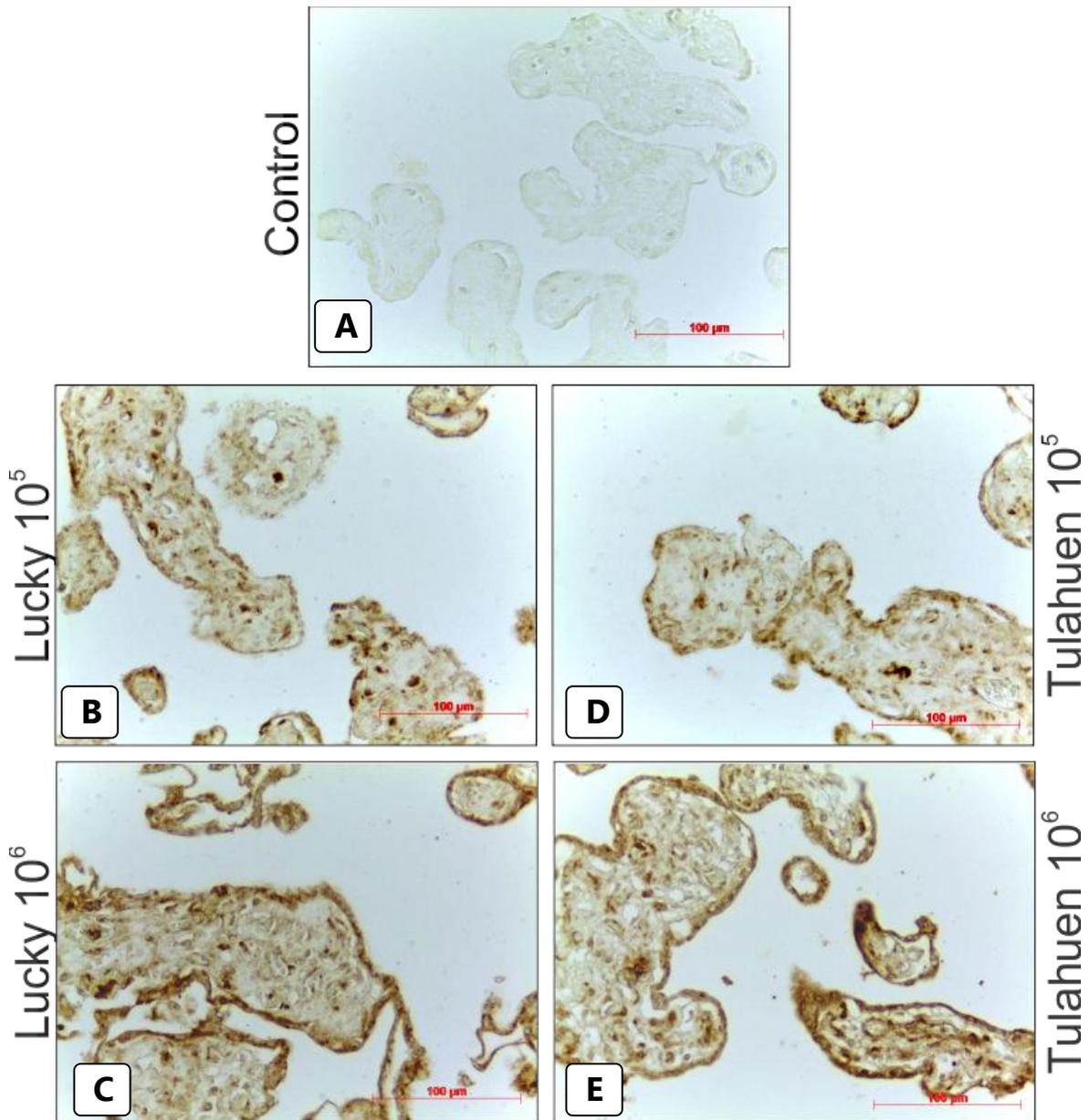
## RESULTADOS - Sección 2.

Determinar la influencia de la carga parasitaria y la cepa de *Trypanosoma cruzi* en el estado de estrés oxidativo de los explantos placentarios en los co-cultivos *in vitro*.

Teniendo en cuenta lo planteado en la introducción que el NO en presencia de anión superóxido forma peroxinitrito, lo que establece un estado de estrés nitrosativo, que en estado fisiológico en la placenta se encuentra aumentado con respecto a otros órganos (Myatt 2010), debido al alto nivel metabólico de este órgano. A continuación se analizó el estado de estrés oxidativo en presencia del *Trypanosoma cruzi* observando un aumento significativo en la nitrosilación de proteínas, con ambas cepas del parásito, esta formación de peroxinitritos produciría un efecto deletéreo para el parásito, pero produciría también daños en la estructura placentaria.

### **2.1 Análisis de la presencia de nitrotirosina en los explantos placentarios por Inmunohistoquímica**

Se realizó la inmunomarcación de la nitrotirosina como una medida del estrés oxidativo y nitrosativo al que estuvo expuesto la placenta en cada co-cultivo, sin *T. cruzi* y con las dos cepas Tulahuen y Lucky a ambas concentraciones de trypomastigotes.

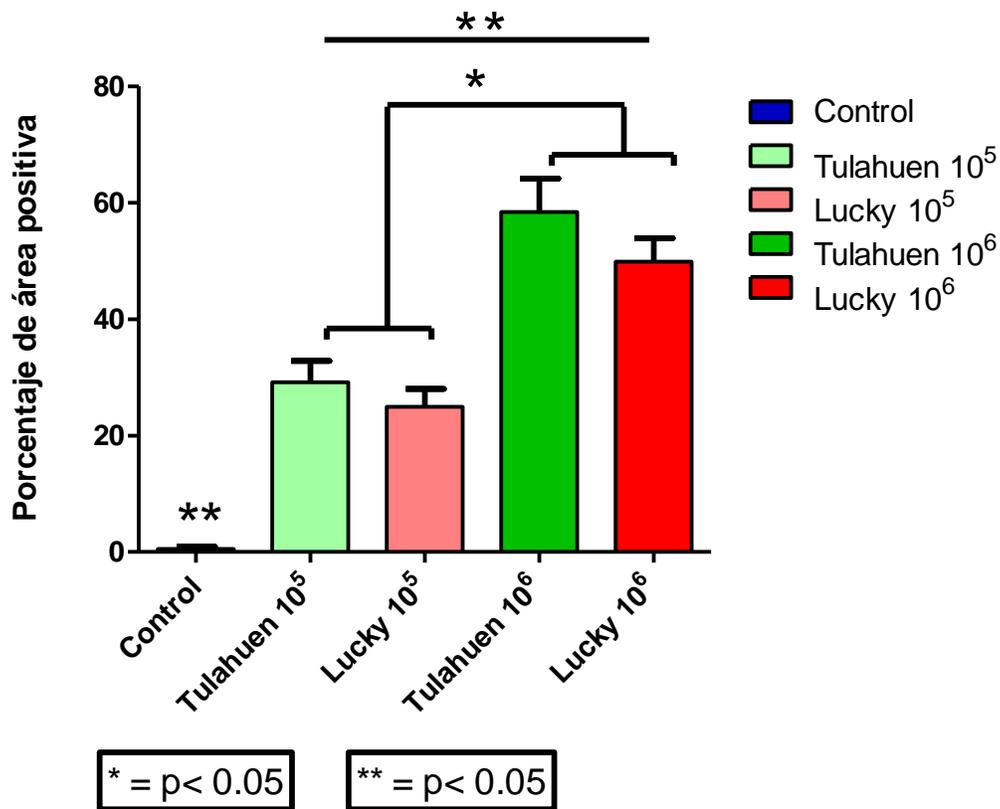


**Figura 10: Inmunohistoquímica para la detección de Nitrotirosina** en explantos placentarios cultivados por 24 hs **A)** Control sin parásitos y co-cultivados con parásitos de las cepas: **B)** Lucky  $10^6$  trypomastigotes **C)** Lucky  $10^5$  trypomastigotes **D)** Tulahuen  $10^6$  trypomastigotes **E)** Tulahuen  $10^5$  trypomastigotes. Imagen representativa de al menos tres ensayos independientes, tomada con Video Microscopio Zeiss. 400x.

En las Inmunohistoquímicas para nitrotirosina se pudo observar una marca más intensa en los explantos cultivados con *T. cruzi*, siendo proporcional a la cantidad de parásito. La localización se encontró en mayor proporción en STB, también en la zona perivascular y en algunas células del estroma, la localización de la marca fue

coincidente con la marcación positiva para NOSe, en similares condiciones de cultivo.

**Cuantificación del área positiva en porcentaje de área marcada sobre el área total**

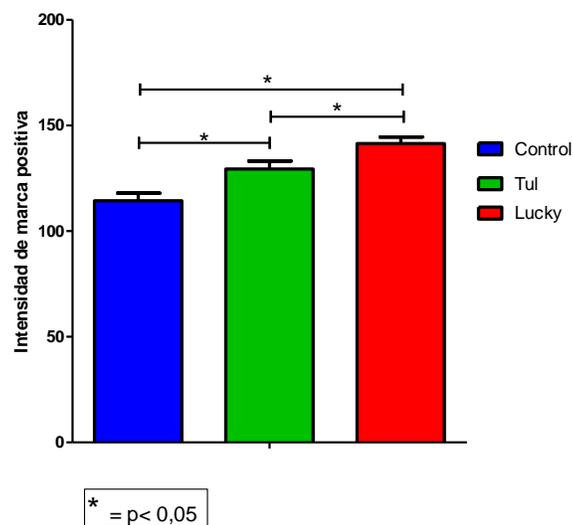


**Figura 11 Cuantificación del porcentaje de área con marca positiva para Nitrotirosina** Se observa la representación gráfica de los porcentajes de área marcados/ el área total, analizado mediante software Axiovision.3.0.6. Se analizaron los porcentajes de áreas de marca de Control de cultivos placentarios cultivados sin parásitos y las áreas de cultivos placentarios con la cepa Tulahuen 10<sup>6</sup> y 10<sup>5</sup> trypomastigotes y la cepa Lucky 10<sup>6</sup> y 10<sup>5</sup> trypomastigotes. Se observó un aumento significativo con ambas cepas con respecto al control con la concentración de 10<sup>5</sup> trypomastigotes y un aumento estadísticamente significativo entre el control y el co-cultivo con las cepas Tulahuen y Lucky, Se muestra el Valor Medio ± ESM. El análisis se realizó con el test estadístico ANAVA seguido del test post-hoc de Comparación Múltiple de Bonferroni Se consideró estadísticamente significativo un p-valor < 0,05 (\*) y (\*\*).

Se observó un incremento significativo en la cantidad de área marcada de residuos de nitrotirosina con respecto al control sin *T. cruzi*, se observó que el aumento es proporcional a la cantidad de parásitos, siendo estadísticamente significativa la diferencia entre los residuos nitrotirosina observados en presencia de  $10^5$  parásitos con respecto al control, además también se observó una diferencia significativa de la marca positiva en los cultivos con  $10^6$  parásitos con respecto al control y con respecto a la marca con  $10^5$  parásitos. No se observaron diferencias estadísticamente significativas entre las dos cepas empleadas en la cuantificación del porcentaje de área de marcada

### Nivel de intensidad de la marca de nitrotirosina

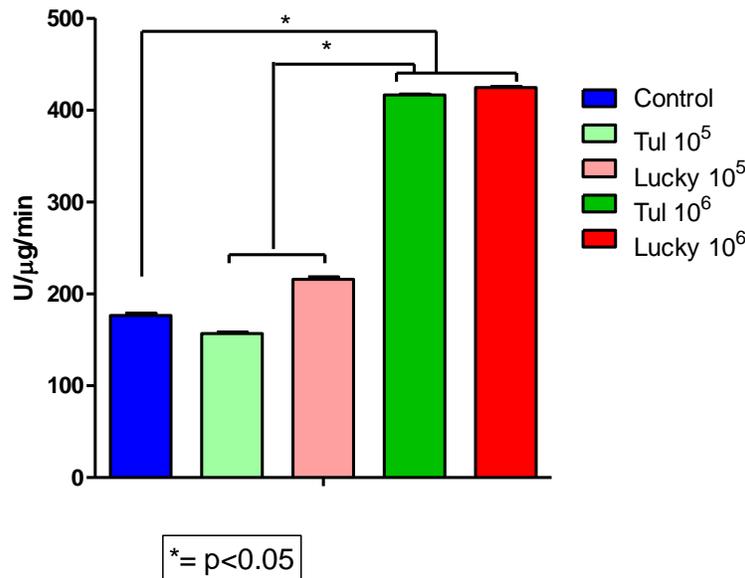
Se analizó la intensidad de la marca con cada una de las cepas para comprobar la posible diferencia entre las cepas analizadas



**Figura 12: Cuantificación de la intensidad de inmunomarcación para nitrotirosina**, en cultivos de tejido placentarios de 24 hs. con trypomastigotes de cepas Tulahuen (Tul) y congénito (Lucky) , y control de cultivo sin parásitos (Control). Las diferencias de intensidad entre las placentas infectadas y la placenta control dieron diferencias estadísticamente significativas \* ( $p \leq 0,05$ ). Las intensidades de marca entre ambas cepas también dieron diferencias estadísticamente significativas \* ( $p \leq 0,05$ ). Se muestra el Valor Medio  $\pm$  ESM. El análisis se realizó con el test estadístico ANAVA seguido del test post-hoc de Comparación Múltiple de Bonferroni Se consideró estadísticamente significativo un valor de  $p < 0,05$  (\*).

Se observó que si bien las áreas de marca no eran diferentes con las distintas cepas, cuando analizamos la intensidad de marca con cada una de ellas vemos que se observa diferencias entre las mismas y con el control, la cepa Lucky presentó mayor intensidad de marca, siendo la diferencia estadísticamente significativa ( $p < 0.05$ ), un aumento en la intensidad de marca puede reflejar una mayor concentración de proteínas nitrosiladas en una misma área de marca, en definitiva una mayor densidad de marca.

## 2.2 Cuantificación de la actividad de la enzima $\gamma$ GT como índice de estrés oxidativo generado en los co-cultivos placentarios.

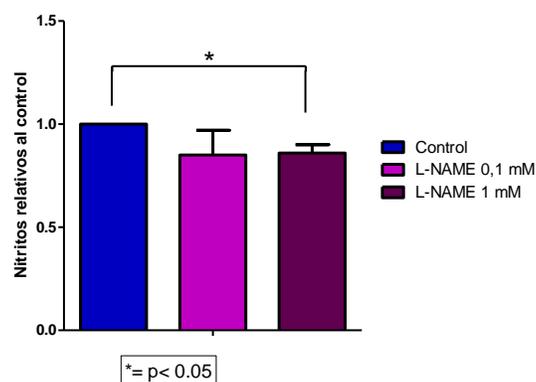


**Figura 13 Actividad enzimática de la enzima  $\gamma$ glutamyltranpeptidasa ( $\gamma$ GT)** expresado en Unidades/  $\mu$ g de proteína/minuto, en homogenatos de explantos placentarios de cultivos de 24 hs sin *T. cruzi* (Control) y con cepa Lucky (Lucky) con  $10^6$  y  $10^5$  parásitos, y Tulahuen (Tul)  $10^6$  y  $10^5$  parásitos del *T. cruzi*. Se observa una diferencia significativa entre la actividad enzimática de los homogenatos de los explantos cultivados con  $10^6$  parásitos y  $10^5$  parásitos de ambas cepas y de los primeros con el control. No se observa diferencias entre las distintas cepas a iguales concentraciones de parásitos. Se muestra el Valor Medio  $\pm$  ESM. El análisis se realizó con el test estadístico ANAVA seguido del test post-hoc de Comparación Múltiple de Bonferroni. Se consideró estadísticamente significativo un valor de  $p < 0,05$  (\*).

El análisis de la actividad de la enzima  $\gamma$ GT denota un aumento del estrés oxidativo de manera significativa y también dependiente de la concentración de trypomastigotes de ambas cepas, se puede observar que con  $10^5$  trypomastigotes, se observa un incremento en la actividad de  $\gamma$ GT en la cepa Lucky. Este aumento en el estrés oxidativo y nitrosativo podría ser el responsable de la producción de alteraciones estructurales placentarias analizadas más adelante.

### 2.3 Inhibición de la producción de NO en los cultivos placentarios

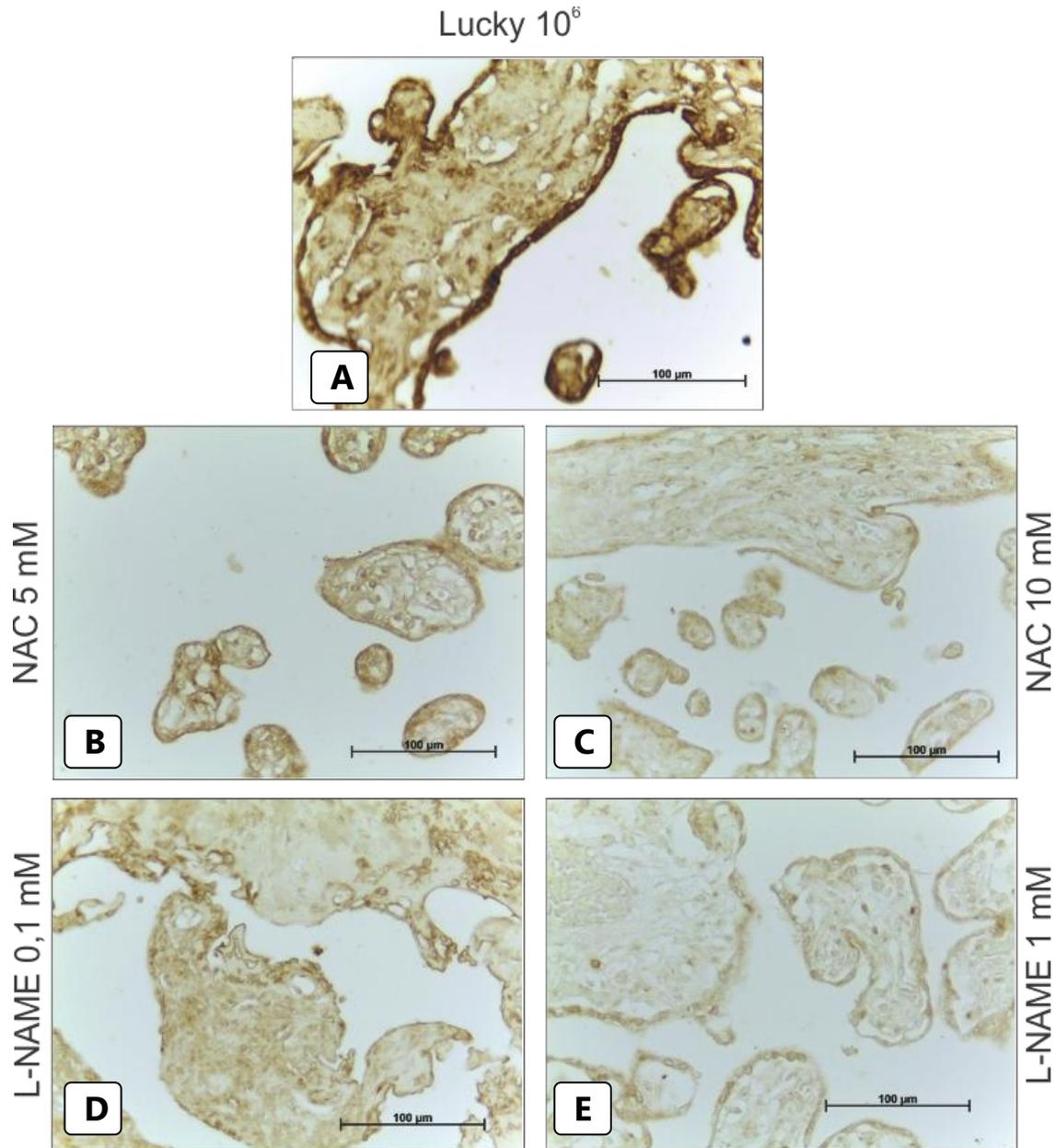
Se realizaron co-cultivos placentarios en similares condiciones a las anteriores, en presencia de un inhibidor competitivo de la NOS, el L-NAME, análogo inactivo del sustrato de la NOS la L-arginina, se utilizaron dos concentraciones, 0,1 mM y 1 mM. Se analizó la producción de nitritos en los medios sobrenadantes de cultivos, de placentas cultivadas por 24 hs sin parásitos, para verificar la inhibición de la producción de NO. Los valores obtenidos de las concentraciones de nitritos en los sobrenadantes de los cultivos con 0,1 mM y 1 mM de L-NAME se relacionaron con la concentración de nitritos de los controles sin el inhibidor, se expresan como disminución de los niveles de nitritos relativos al control.



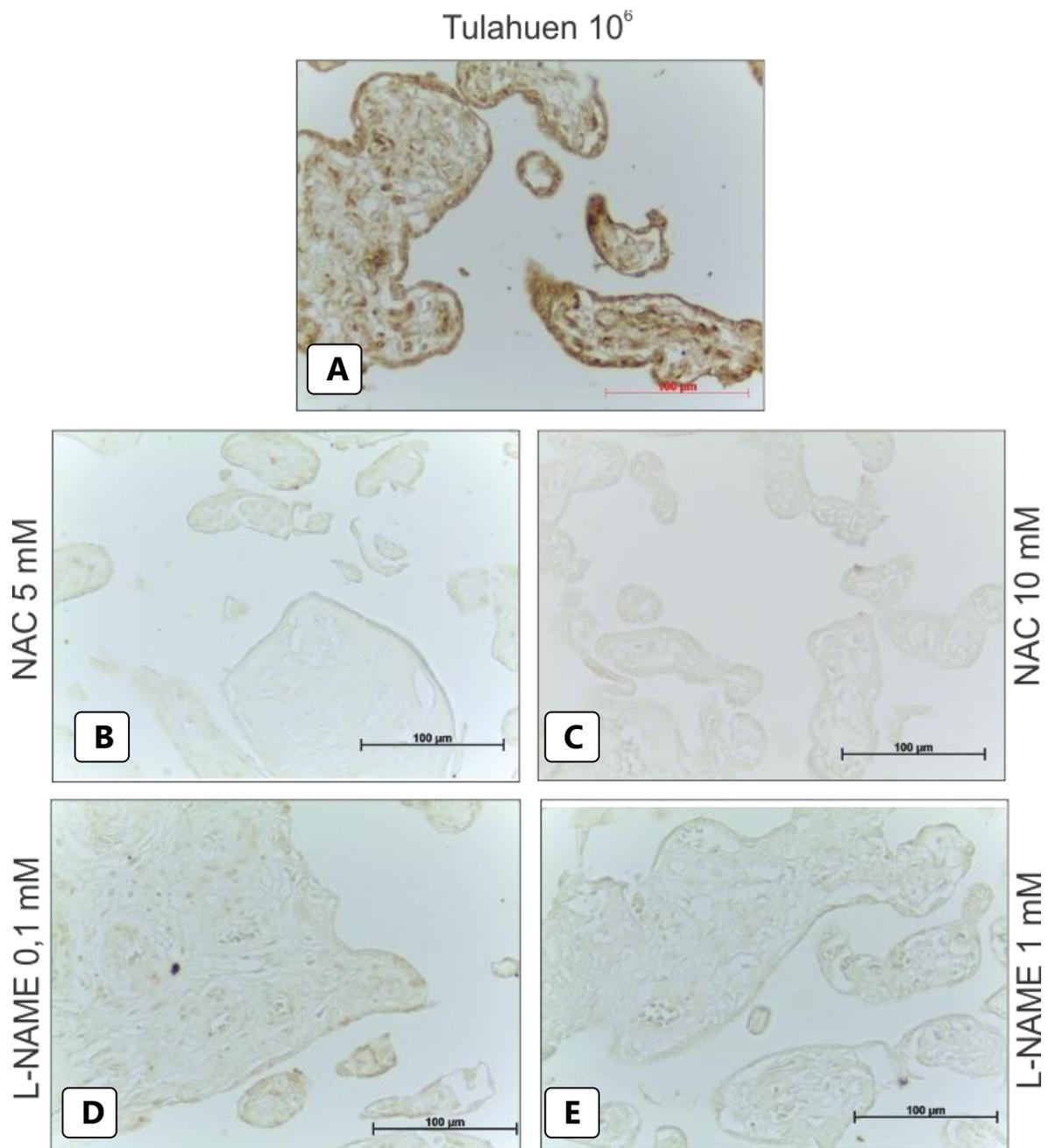
**Figura 15 Concentración relativa de nitritos en medio sobrenadante de cultivo en presencia de L-NAME** en los sobrenadantes de cultivo Control y con una concentración de 0,1 mM de L-NAME y 1 mM de L-NAME. Se observa una disminución significativa de la concentración de nitritos con la concentración de 1mM del inhibidor. Se muestra el Valor Medio  $\pm$  ESM. El análisis se realizó con el test estadístico ANAVA seguido del test post-hoc de Comparación Múltiple de Bonferroni. Se consideró estadísticamente significativo un p-valor  $< 0,05$  (\*).

No se obtuvo una inhibición completa de la formación de NO debido a que el inhibidor no es un inhibidor específico para todas las NOS, lo hace preferentemente a la NOSe y la NOSn, por otro lado, al ser un inhibidor competitivo hay que tener en cuenta las concentraciones de L-arginina que posee el medio de cultivo, el medio de cultivo utilizado en este modelo experimental es el RPMI 1640, el cual tiene una concentración de L-arginina de 0,2 g/l es un poco mayor a la concentración del inhibidor 1mM (0,174 g/l), se probaron concentraciones mayores del inhibidor, pero se descartaron ya que generaba daños en el tejido.

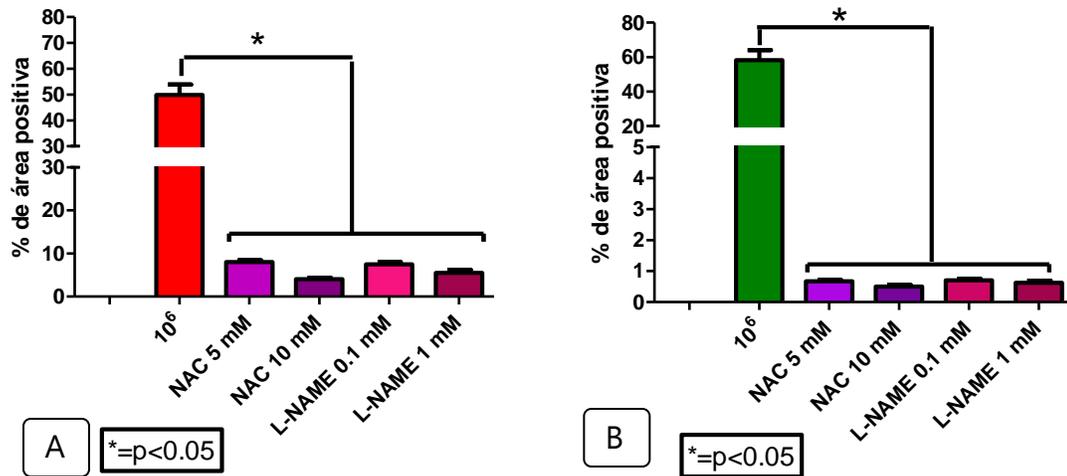
## 2.4 Detección de formación de residuos de nitrotirosina con inhibidor de NOS (L-NAME) y con NAC



**Figura 16: Inmunohistoquímica para la detección de Nitrotirosina** en explantos placentarios cultivados por 24 hs **A)** Cultivo con  $10^6$  trypanomastigotes de la cepa Lucky. **B)** Lucky  $10^6$  trypanomastigotes con NAC 5 mM **C)** Lucky  $10^6$  trypanomastigotes con NAC 10 mM Lucky **D)** Lucky  $10^6$  trypanomastigotes con L-NAME 0,1 mM **E)** Lucky  $10^6$  trypanomastigotes con L-NAME 1 mM. Imagen representativa de al menos tres ensayos independientes, tomada con Video Microscopio Zeiss. 400x.



**Figura 17: Inmunohistoquímica para la detección de Nitrotirosina** en explantos placentarios cultivados por 24 hs **A)** Cultivo con  $10^6$  trypanomastigotes de la cepa Tulahuen. **B)** Tulahuen  $10^6$  trypanomastigotes con NAC 5 mM **C)** Tulahuen  $10^6$  trypanomastigotes con NAC 10 mM **D)** Tulahuen  $10^6$  trypanomastigotes con L-NAME 0,1 mM **E)** Tulahuen  $10^6$  trypanomastigotes con L-NAME 1 mM. Imagen representativa de al menos tres ensayos independientes, tomada con Video Microscopio Zeiss. 400x.



**Figura 18. Cuantificación del porcentaje de área con marca positiva para Nitrotirosina**

Se observa la representación gráfica de los porcentajes de área marcados/ el área total, analizado mediante software Axiovision.3.0.6. Se analizaron los porcentajes de áreas de marca de **A)** cepa Lucky 10<sup>6</sup> trypanomastigotes sin inhibidores y con concentración de 5 mM de NAC y 10 mM de NAC 0,1 mM de L-NAME y 1 mM de L-NAME **B)** Tulahuen 10<sup>6</sup> trypanomastigotes sin inhibidores y con concentración de 5 mM de NAC y 10 mM de NAC 0,1 mM de L-NAME y 1 mM de L-NAME Se observó que en presencia de L-NAME y de NAC hay una disminución estadísticamente significativa en la formación de nitrotirosina. Se muestra el Valor Medio ± ESM. El análisis se realizó con el test estadístico ANAVA seguido del test post-hoc de Comparación Múltiple de Bonferroni Se consideró estadísticamente significativo un p-valor < 0,05 (\*).

Lo que pudimos observar es que si bien la inhibición de la producción de NO, por parte de la enzima NOSe, con la adición de L-NAME no fue total, se observó una disminución estadísticamente significativa en la formación de nitrotirosina en presencia del parásito, a su vez cuando realizamos los co-cultivos con el agregado de NAC, en presencia de 10<sup>6</sup> parásitos de las cepas Tulahuen y Lucky, se puede observar que hay una disminución en la formación de nitrotirosina, lo que podría indicar que la respuesta del tejido placentario, mediada por NO y peroxinitrito fue inhibida frente a ambas cepas del *T. cruzi*.

## CONCLUSIÓN - Sección 2

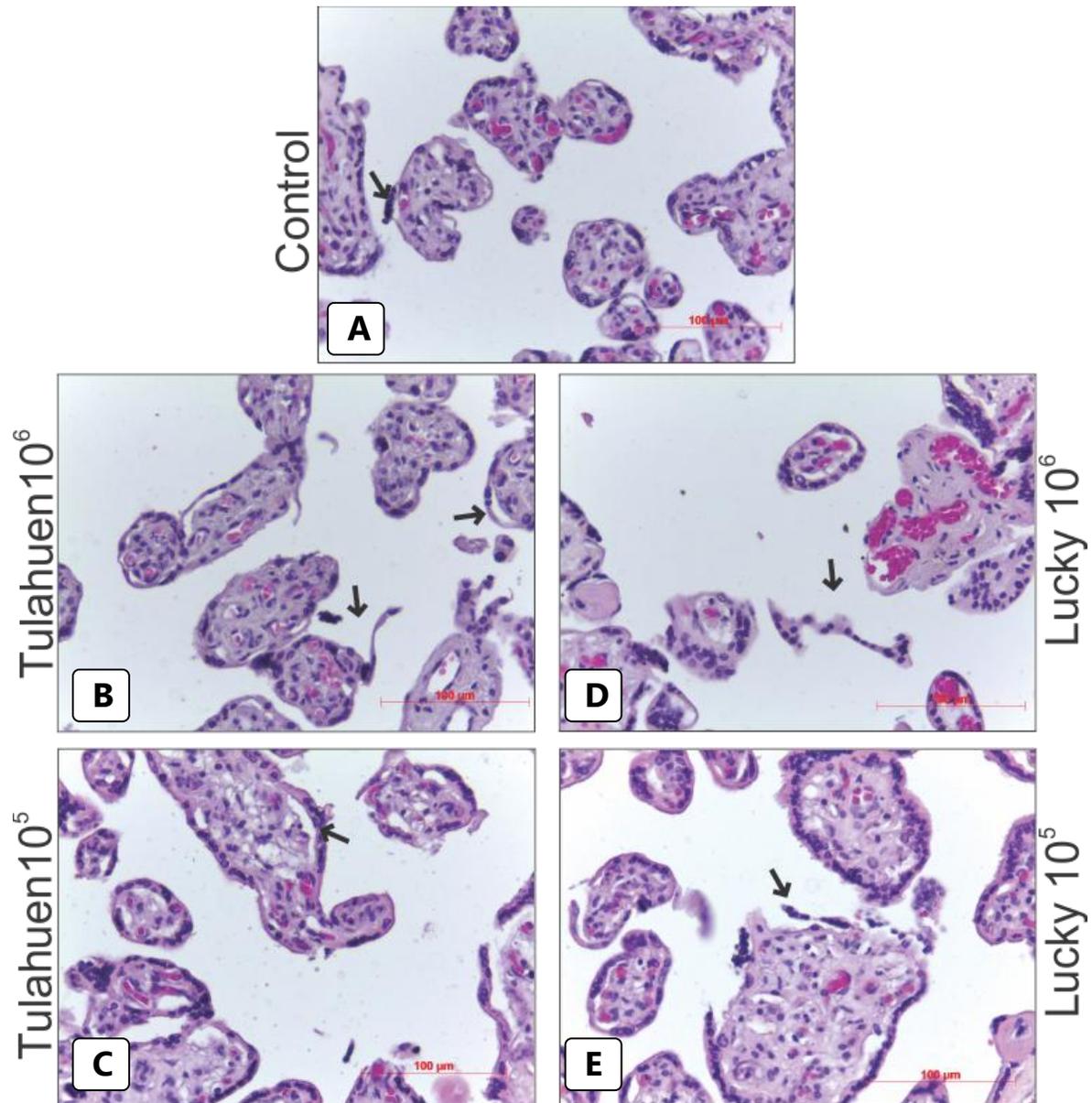
Pudimos observar que el tejido placentario in vitro exagera su estado de estrés oxidativo y nitrosativo en presencia del *Trypanosoma cruzi*, esto se puede corroborar por el aumento de los residuos de nitrotirosina en las vellosidades coriónicas y por el aumento de la actividad de la enzima  $\gamma$ glutamiltanspeptidasa, lo que pudimos observar también que es una respuesta dosis dependiente, y que se daría cuando la carga parasitaria es muy elevada, pero también se observa con las cargas parasitarias menores, a diferencia de la expresión de la NOSe y del NO que son similares al control, la respuesta con la formación de peroxinitritos se observa con concentraciones más bajas de parásitos. Luego observamos que tanto con el inhibidor de la NOS (L-NAME) y con el NAC logramos inhibir la respuesta nitrosativa, su efecto lo veremos en las secciones siguientes.

## RESULTADOS - Sección 3

Analizar posibles alteraciones estructurales vellositarias en presencia de las distintas cepas y cargas parasitarias de *Trypanosoma cruzi* y su relación con el estrés oxidativo.

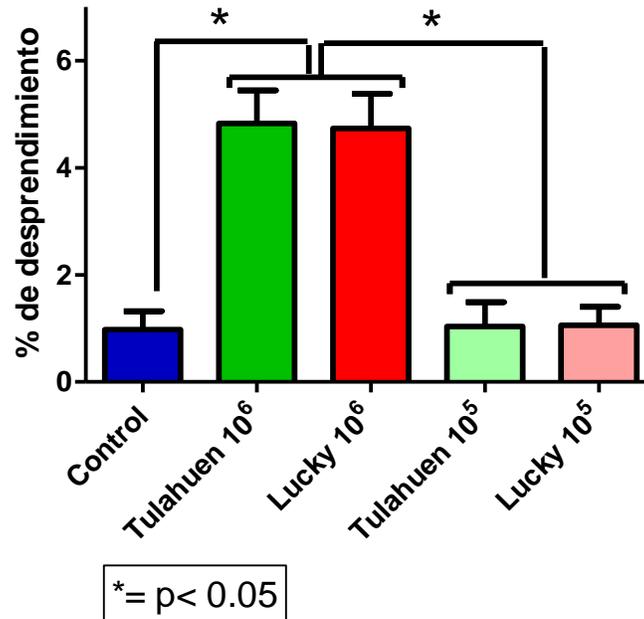
Como observamos anteriormente en presencia del *T. cruzi* se genera una respuesta de aumento en la producción de NO nítrico, de la síntesis de la enzima NOSe que lo sintetiza y se observa un aumento en la formación de residuos nitrotirosina y en la actividad de la enzima  $\gamma$  GT, el aumento tanto del NO y del estrés nitrosativo, podrían causar alteraciones estructurales si la respuesta es elevada, por lo tanto analizamos en todas las condiciones de co-cultivo, las alteraciones estructurales, de manera cuantitativa analizando el desprendimiento del STB, de manera cualitativa analizando la composición del fibrinoide formado en los sitios de lesión, y además estudiamos la viabilidad del STB, analizando la hormona que produce la  $\beta$ h-CG.

### 3.1 Análisis morfométrico de alteraciones estructurales en co-cultivos placentarios



**Figura 19 Alteraciones estructurales** en explantos placentarios cultivados por 24 hs (flecha desprendimiento del STB) **A)** Control sin parásitos y co-cultivos con parásitos de las cepas: **B)** Tulahuen 10<sup>6</sup> trypanomastigotes **C)** Tulahuen 10<sup>5</sup> trypanomastigotes **D)** Lucky 10<sup>6</sup> trypanomastigotes **E)** Lucky 10<sup>5</sup> trypanomastigotes. Imagen representativa de al menos tres ensayos independientes, tomada con Video Microscopio Zeiss. 400x.

### Cuantificación del porcentaje de desprendimiento del sinciotrofoblasto

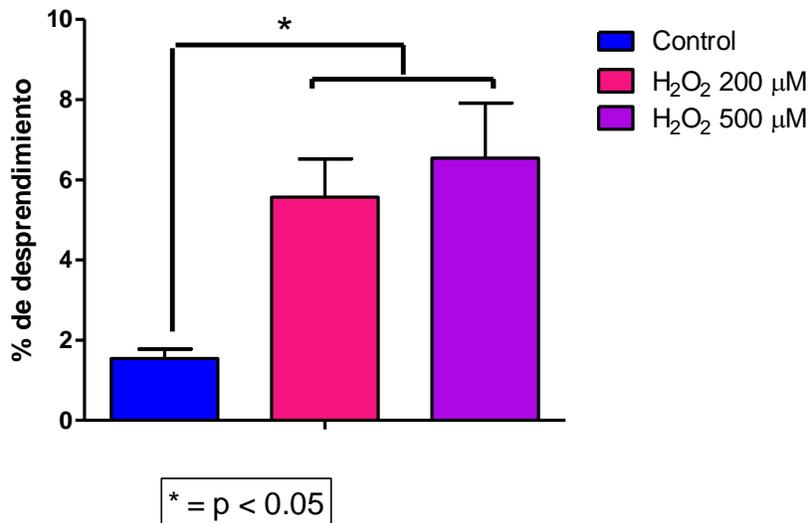


**Figura 20. Porcentaje de área de desprendimiento de STB.** Cuantificación de las áreas de desprendimiento en explantos placentarios cultivados por 24 hs. **Control** sin parásitos y co-cultivados con parásitos de las cepas **Tulahuen y Lucky**, utilizando dos cantidades de parásitos para cada cepa, **10<sup>6</sup> y 10<sup>5</sup> trypomastigotes**. Se muestra el Valor Medio ± ESM. El análisis se realizó con el test estadístico ANAVA seguido del test post-hocde Comparación Múltiple de Bonferroni. Se consideró estadísticamente significativo un p-valor < 0,05 (\*).

Se observaron alteraciones estructurales en el análisis morfológico de las placentas cultivadas con las distintas cepas de *T. cruzi*. El análisis se llevó a cabo con un software apropiado para tal fin (Axiovision 3.0.6 de Carl Zeiss), se cuantificaron las áreas de desprendimiento del sinciotrofoblasto y se observó que en presencia de 10<sup>6</sup> trypomastigotes de *T. cruzi*, las alteraciones estructurales fueron mayores con significación estadística tanto sobre el control como sobre el inóculo mas bajo (10<sup>5</sup>) de *T. cruzi* (ambas cepas).

Como ya se describió anteriormente que *T. cruzi* induce estado de estrés oxidativo en el tejido placentario que es inóculo parasitario dependiente, entonces se realizaron experimentos para determinar si las alteraciones estructurales de la

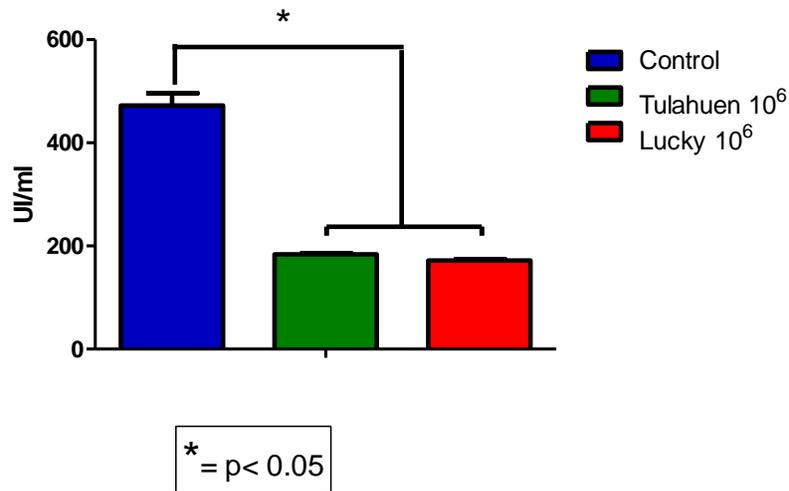
barrera placentaria eran efecto de dicho estado. Para ello se trataron explantos placentarios (sin parásitos) con  $H_2O_2$  como una especie reactiva de oxígeno, y se cuantificó el desprendimiento de STB. Observamos un efecto similar, un aumento en los desprendimientos del STB



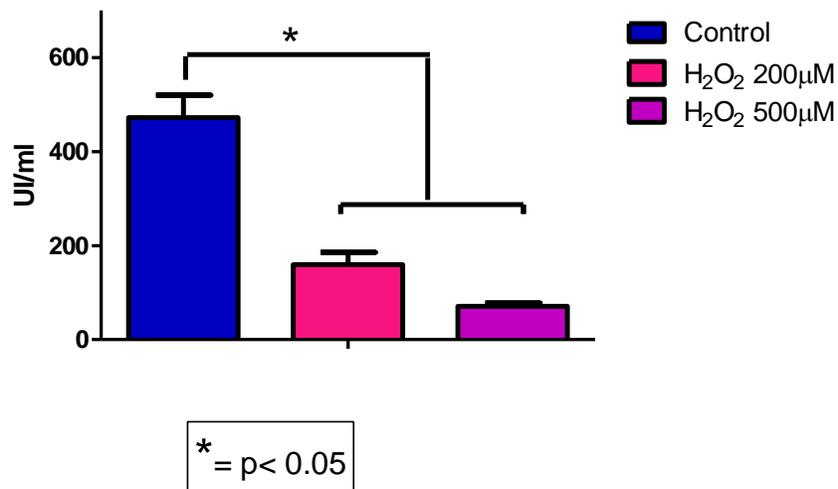
**Figura 21. Porcentaje de área de desprendimiento de STB.** Cuantificación de las áreas de desprendimiento en explantos placentarios cultivados por 24 hs **Control** sin parásitos y cultivados con concentraciones crecientes de  **$H_2O_2$  de 200  $\mu M$  y de 500  $\mu M$** . Se observa una diferencia significativa entre los explantos tratados con  $H_2O_2$  y los explantos control. Se muestra el Valor Medio  $\pm$  ESM. El análisis se realizó con el test estadístico ANAVA seguido del test post-hoc de Comparación Múltiple de Bonferroni. Se consideró estadísticamente significativo un p-valor  $< 0,05$  (\*).

### 3.2 Concentración de $\beta hCG$ en medios sobrenadantes de co-cultivo

Se cuantificó en los sobrenadantes de cultivo, los niveles de  $\beta hCG$  como una medida de la viabilidad funcional del STB placentario, que es el encargado de producirlo y liberarlo al medio, de esta manera se analizó el funcionamiento del STB no solo como barrera estructural sino funcional.



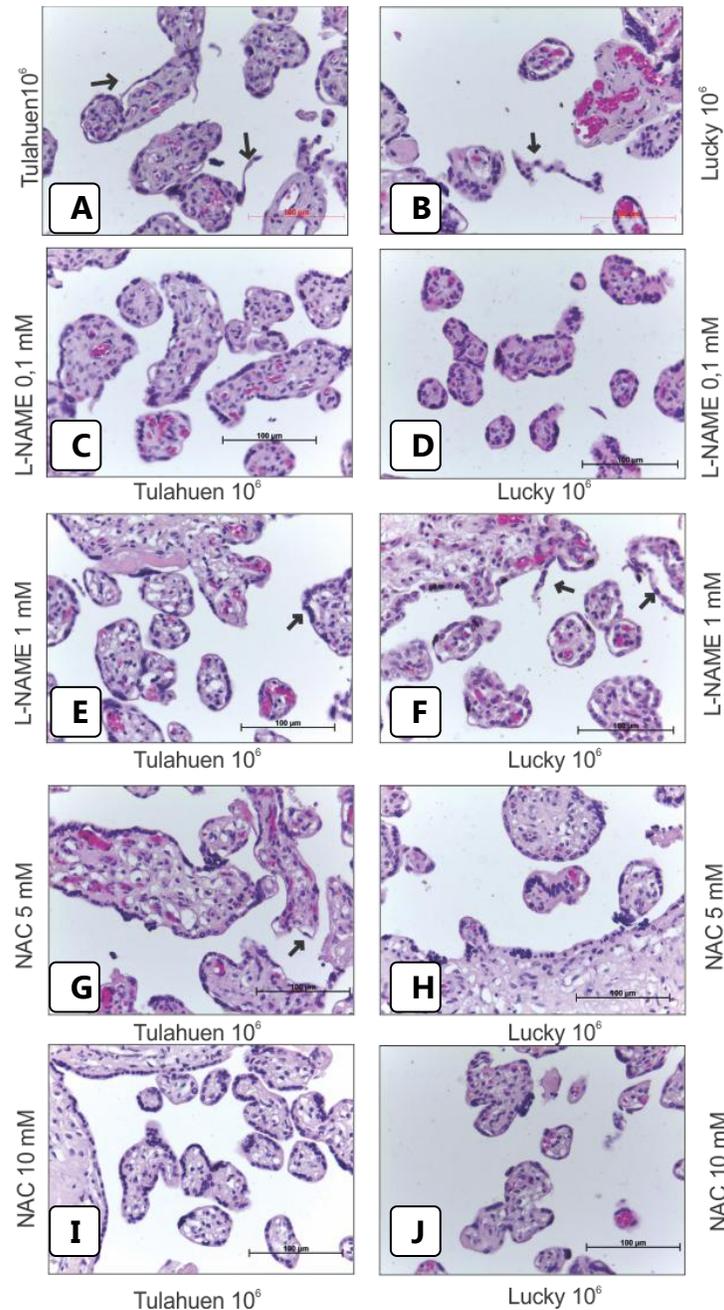
**Figura 22 Concentración de  $\beta$ hCG** en medio sobrenadante de co-cultivo de 24 hs. **Control** sin *T. cruzi* y con las cepas **Tulahuen y Lucky**. Se observó una disminución estadísticamente significativa de la secreción de  $\beta$ hCG en presencia de las dos cepas de parásito, Se muestra el Valor Medio  $\pm$  ESM. El análisis se realizó con el test estadístico ANAVA seguido del test post-hoc de Comparación Múltiple de Bonferroni Se consideró estadísticamente significativo un p-valor  $< 0,05$  (\*).



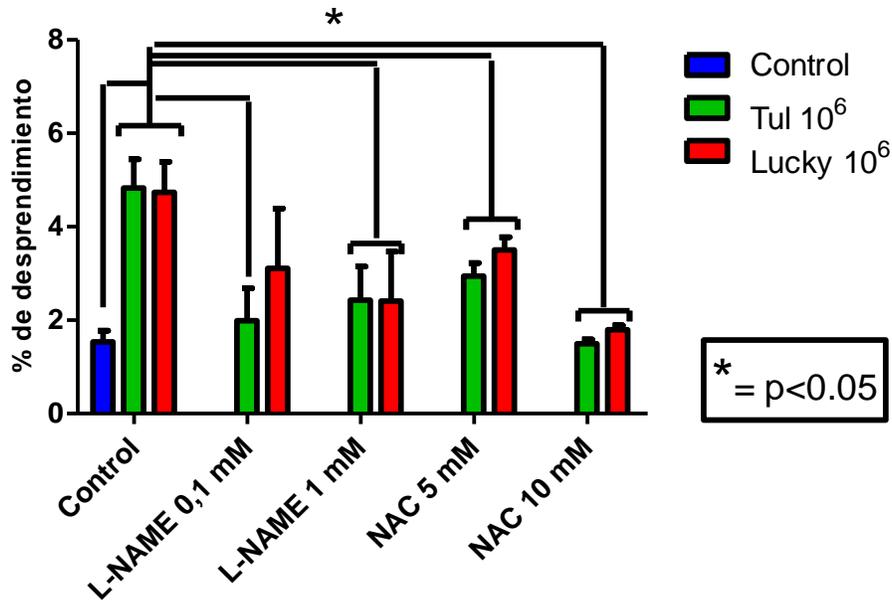
**Figura 23 Concentración de  $\beta$ hCG** en medio sobrenadante de co-cultivo de 24 hs. **Control** sin *T. cruzi* y cultivados con concentraciones crecientes de **H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> de 200 µM y de 500 µM**. Se observó una disminución estadísticamente significativa de la secreción de  $\beta$ hCG en presencia de las dos concentraciones de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, Se muestra el Valor Medio  $\pm$  ESM. El análisis se realizó con el test estadístico ANAVA seguido del test post-hoc de Comparación Múltiple de Bonferroni Se consideró estadísticamente significativo un p-valor  $< 0,05$  (\*).

Se observa una disminución en la cantidad de  $\beta$ hCG en presencia de ambas cepas del *T. cruzi*. Ésta disminución nos estaría indicando que la superficie de desprendimiento de STB, ha perdido su función secretora. La disminución que se observa es estadísticamente significativa entre los co-cultivos en presencia del parásito y los co-cultivos sin parásitos. En los cultivos incubados con  $H_2O_2$ , con el propósito de dilucidar separadamente el efecto del  $H_2O_2$  en placentas sin infectar, se observó también que hay una pérdida de funcionalidad del STB siendo la misma proporcional a la concentración de  $H_2O_2$  y esta diferencia es estadísticamente significativa.

### 3.3 Análisis morfométrico de alteraciones estructurales en cocultivos placentarios, con inhibidor de NOS (L-NAME) y con "scavenger" de especies reactivas de oxígeno (NAC)



**Figura 24. Alteraciones estructurales en explantos placentarios cultivados por 24 hs con  $10^6$  parásitos de las cepas Tulahuen y Lucky, (flecha desprendimiento del STB) A) Tulahuen  $10^6$  trypomastigotes B) Lucky  $10^6$  trypomastigotes C) Tulahuen  $10^6$  trypomastigotes con L-NAME 0,1 mM D) Lucky  $10^6$  trypomastigotes con L-NAME 0,1 mM E) Tulahuen  $10^6$  trypomastigotes con L-NAME 1 mM F) Lucky  $10^6$  trypomastigotes con L-NAME 1 mM G) Tulahuen  $10^6$  trypomastigotes con NAC 5 mM H) Lucky  $10^6$  trypomastigotes con NAC 5 mM I) Tulahuen  $10^6$  trypomastigotes con NAC 10 mM J) Lucky  $10^6$  trypomastigotes con NAC 10 mM. Imagen representativa de al menos tres ensayos independientes, tomada con Video Microscopio Zeiss. 400x.**

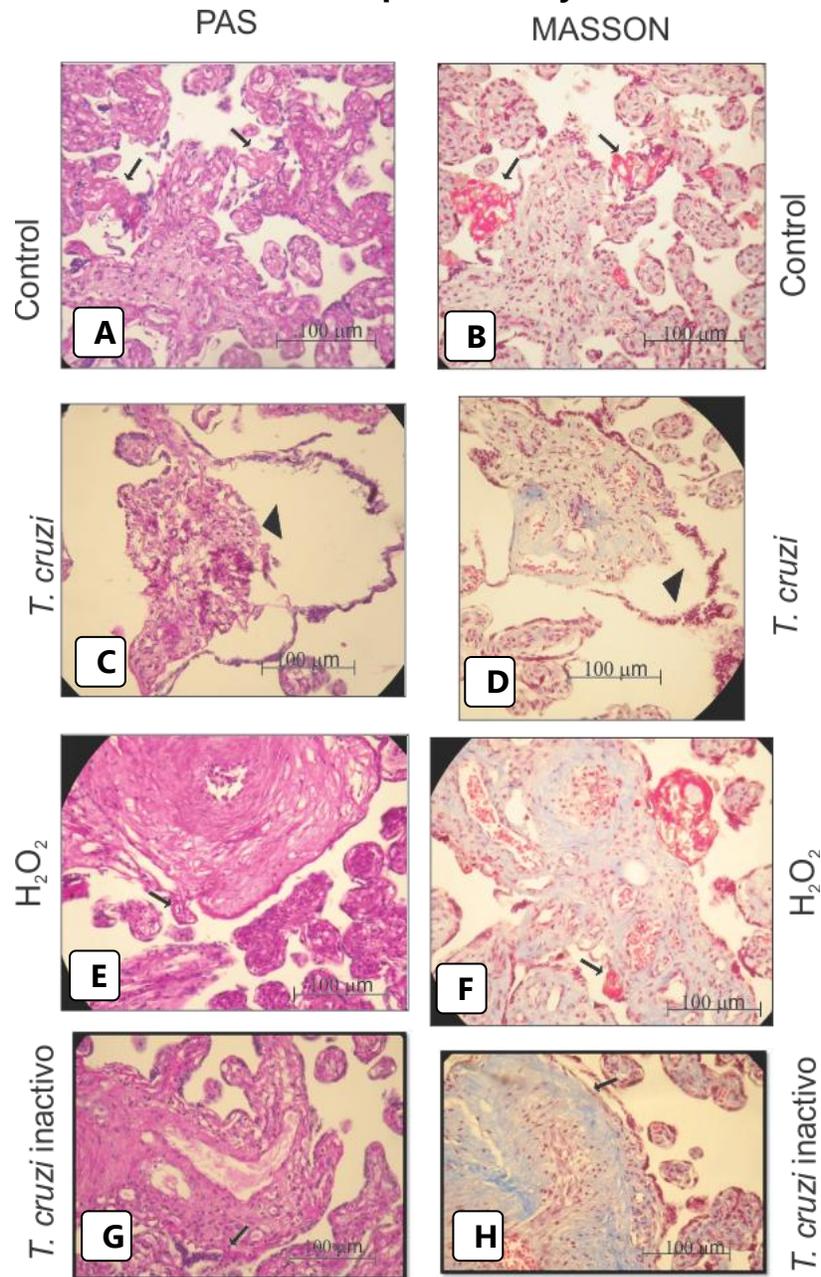


**Figura 25 Porcentaje de desprendimiento de sinciotrofoblasto (STB)** en co-cultivos placentarios con  $10^6$  trypomastigotes de las cepas Tulahuen y Lucky, en presencia de inhibidor de la NOS, L-NAME 0,1 mM y 1 mM, y en presencia de NAC 5 mM y 10 mM. Se observa disminución de las alteraciones estructurales estadísticamente significativas con L-NAME 0,1 mM para la cepa Tulahuen, y con L-NAME 1mM, NAC 5 mM y NAC 10 mM disminución en las alteraciones con ambas cepas de *T. cruzi*. Se muestra el Valor Medio  $\pm$  ESM. El análisis se realizó con el test estadístico ANAVA seguido del test post-hoc de Comparación Múltiple de Bonferroni. Se consideró estadísticamente significativo un p-valor  $< 0,05$  (\*).

Las alteraciones estructurales analizadas en los co-cultivos en presencia de L-NAME 0,1 mM presenta menor alteración estructural que el co-cultivo no tratado, con la cepa Tulahuen se observa que el daño es menor que con la cepa Lucky, que no tiene diferencias con el control no tratado, con la concentración de L-NAME 1 mM las alteraciones estructurales fueron menores que el control no tratado en ambas cepas y la diferencia fue estadísticamente significativa, la disminución en la producción de NO y formación de preoxinitritos podría ser el responsable de la disminución observada, en concordancia con éste resultado, se observó que

cuando se trató las vellosidades con NAC que, como mencionamos anteriormente, disminuye las ERO ya que es precursor del glutatión reducido, las alteraciones estructurales fueron menores a los no tratados, tanto cuando fue utilizado en una concentración de 5 mM como la de 10 mM, no encontrándose diferencias significativas entre las dos cepas utilizadas.

### 3.4 Análisis cualitativo del fibrinoide placentario y alteraciones estructurales



**Figura 26. Coloración con PAS y MASSON de cultivos de explantos placentarios A) y B)** Control: cultivo placentario sin infección. Flecha: fibrinoide membrana basal  $\mu\text{m}$  = 8,31 (en la zona de desprendimiento)  $\mu\text{m}$  = 1,58 (en la zona conservada). **C) y D)** cultivo con  $10^6$  *T. cruzi* cepa Tulahuen, Punta de flecha: desprendimiento, membrana basal  $\mu\text{m}$  = 5,20 (en la zona de desprendimiento)  $\mu\text{m}$  = 0,56 (en la zona conservada) Fibrinoide escaso tipo fibrina tipo matriz mayor que control. **E) y F)** cultivo placentario con  $\text{H}_2\text{O}_2$  200 $\mu\text{M}$ , flecha: fibrinoide membrana basal,  $\mu\text{m}$  = 8,02 (en la zona de desprendimiento)  $\mu\text{m}$  = 1,38 (en la zona conservada) Fibrinoide moderado tipo fibrina tipo matriz mayor que control. **G) y H)** cultivo con  $10^6$  *T. cruzi* inactivado cepa Tulahuen Flecha: desprendimiento membrana basal:  $\mu\text{m}$  = 8,20 (en la zona de desprendimiento)  $\mu\text{m}$  = 1,50 (en la zona conservada) en presencia de  $10^6$  trypomastigotes de *T. cruzi* y de 200  $\mu\text{M}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$ .

En la figura 26 se observa el análisis cualitativo de la formación del fibrinoide en las zonas de desprendimiento en las vellosidades placentarias, con la coloración de PAS se puede observar el fibrinoide positivo para ésta coloración, y con la coloración de MASSON se puede discernir entre fibrinoide tipo fibrina (rojo) y el fibrinoide tipo matriz (azul), lo que podemos observar en el Control sin infección, es que en las zonas de desprendimiento, primero se observó un fibrinoide tipo fibrina y luego en las zonas de probable regeneración se observa fibrinoide tipo matriz, en cambio cuando observamos la placenta en presencia de  $10^6 T. cruzi$  se observa una escasa formación de fibrinoide tipo fibrina en las zonas de desprendimiento, un adelgazamiento en la membrana basal en estas zonas. Por otro lado las lesiones observadas en presencia de  $H_2O_2$  200  $\mu M$  y las lesiones en presencia de los parásitos inactivados por calor, son similares (cualitativamente) al control. Por lo que podemos concluir que se observó *in vitro* una desorganización del estroma placentario, con reorganización de glicoproteínas, en presencia del *Trypanosoma cruzi*.

## CONCLUSION - Sección 3

En base a los resultados observados se puede concluir que las alteraciones estructurales observadas en los distintos cultivos se deberían a los mecanismos producidos por la misma placenta para destruir al parásito. La placenta ante un agente patógeno activa la producción de NO y de especies reactivas del nitrógeno, éste efecto depende de la concentración de parásitos en el entorno placentario, ya que se observa un aumento proporcional a la carga parasitaria empleada, cuando se reproduce el efecto del estrés oxidativo generado por el *T. cruzi*, incubando los explantos con  $H_2O_2$  se observó que el daño era similar al obtenido con las cepas del *T. cruzi*, pero al analizar cualitativamente con las coloraciones de PAS y de

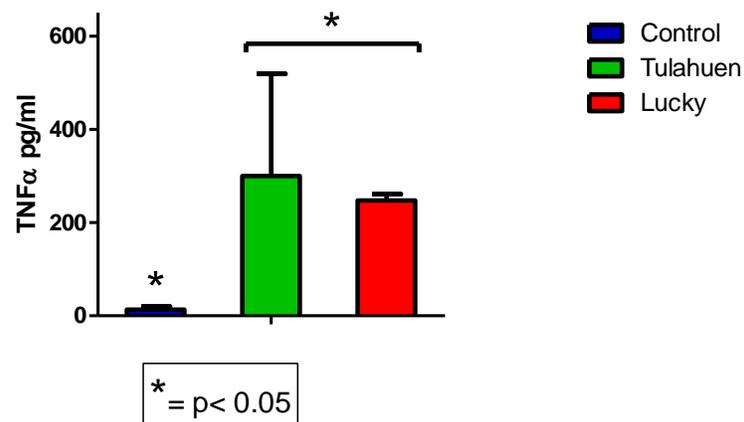
MASSON se observó que la desorganización estructural generada por el parásito era de diferentes características, siendo mayormente un fibrinoide de tipo matriz el que se observa en presencia del parásito. De acuerdo a la bibliografía está relacionado con una respuesta inmunológica, no así el fibrinoide tipo fibrina que se observa en los controles e incubados con  $H_2O_2$ , que responden al tipo de fibrina que se genera en condiciones de apoptosis y renovación del trofoblasto. Dentro de los productos responsables de los daños estructurales en la placenta en presencia de los trypomastigotes, se puede señalar al NO y sobre todo a los peroxinitritos formados en presencia de anión superóxido, ya que se observó que al disminuir la producción de los mismos con el tratamiento de L-NAME y NAC, se produjeron menor daño estructural.

## RESULTADOS - Sección 4

Analizar la modificación o la influencia de las dos cepas de *Trypanosoma cruzi* en la producción de TNF $\alpha$  y sus receptores solubles en los co-cultivos e placentarios.

Teniendo en cuenta que la respuesta inflamatoria innata es la primera que se gatilla en presencia de un agente patógeno o de una noxa, y la activación de la misma conduce a la inducción de citoquinas inflamatorias dentro de las cuales se encuentra el factor de necrosis tumoral (TNF $\alpha$ ), se midieron los niveles de TNF $\alpha$  en los medios sobrenadantes de co-cultivos de 24 hs, incubados con  $10^6$  parásitos de la cepa Tulahuen y  $10^6$  parásitos de la cepa Lucky. Se observó en la siguiente figura la cuantificación de esta citoquina, en el sobrenadante de cultivo por el método de ELISA

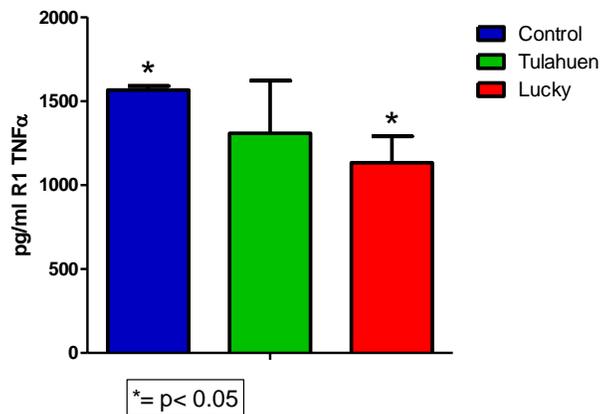
### 4.1 Niveles de TNF $\alpha$ en los medios sobrenadantes de co-cultivo



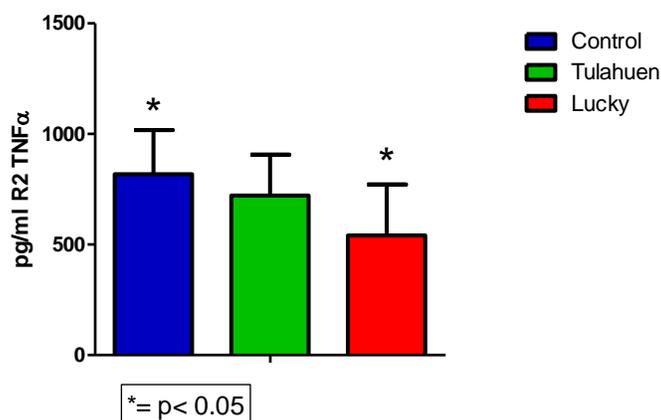
**Figura 27. Nivel de TNF $\alpha$  en medios sobrenadantes de cultivos placentarios:** Control: cultivo placentario en ausencia de parásitos. Tulahuen: co-cultivo placentario en presencia de  $10^6$  trypomastigotes de la cepa Tulahuen. Lucky: co-cultivo placentario en presencia de  $10^6$  trypomastigotes de la cepa Lucky. Se muestra el Valor Medio  $\pm$  ESM. El análisis se realizó con el test estadístico ANAVA seguido del test post-hoc de Comparación Múltiple de Bonferroni. Se consideró estadísticamente significativo un p-valor < 0,05 (\*).

Se observó un aumento de más de 200 veces el control de la secreción de TNF $\alpha$  al sobrenadante de cultivo, esta diferencia observada fue estadísticamente significativa, el aumento fue similar en ambas cepas, Tulahuen y Lucky con 10<sup>6</sup> trypomastigotes por 24 hs.

#### 4.2 Niveles de Receptores solubles 1 y 2 en medios sobrenadantes de cultivo



**Figura 28. Niveles de s/R1 TNF $\alpha$  en medio sobrenadante de cultivo placentario.** Control: cultivo placentario en ausencia de parásitos. Tulahuen: co-cultivo placentario en presencia de 10<sup>6</sup> trypomastigotes de la cepa Tulahuen o de la cepa Lucky. Se muestra el Valor Medio  $\pm$  ESM. El análisis se realizó con el test estadístico ANAVA seguido del test post-hocde Comparación Múltiple de Bonferroni Se consideró estadísticamente significativo un p-valor < 0,05 (\*).



**Figura 29. Niveles de s/R2 TNF $\alpha$  en medio sobrenadante de cultivo placentario.** Control: cultivo placentario en ausencia de parásitos. Tulahuen: co-cultivo placentario en presencia de 10<sup>6</sup> trypomastigotes de la cepa Tulahuen o de la cepa Lucky. Se muestra el Valor Medio  $\pm$  ESM. El análisis se realizó con el test estadístico ANAVA seguido del test post-hocde Comparación Múltiple de Bonferroni. Se consideró estadísticamente significativo un p-valor < 0,05 (\*).

Los niveles de Receptores solubles de TNF $\alpha$  se expresan en condiciones fisiológicas de manera elevada en la placenta, de ésta manera protege al feto de un posible rechazo inmunológico, o que un evento pro-inflamatorio desencadene la ruptura de las membranas placentarias y tenga como efecto un aborto espontáneo (Haider & Knöfler 2009). Por lo tanto en nuestro controles, como era de esperar se encontraron niveles elevados de Receptores solubles, tanto 1 como 2, mientras que en presencia de ambas cepas del *T. cruzi* los niveles de R1 y R2, tuvieron una tendencia a la disminución, siendo la disminución con la cepa congénita más marcada que Tulahuen y teniendo diferencias estadísticamente significativas con el Control.

## CONCLUSION - Sección 4

Se ha descrito que la expresión génica de TNF $\alpha$  es baja en placenta y es producido por trofoblasto y decidua. En presencia de factores como hipoxia, patógenos, se incrementa la expresión de citoquinas pro-inflamatorias entre ellas TNF $\alpha$ . En los cultivos con *T. cruzi* hay aumento de TNF $\alpha$  y disminución de los receptores, por lo que hay TNF $\alpha$  libre para producir efecto biológico. De acuerdo a bibliografía, el TNF $\alpha$  media la resistencia a *T. cruzi*, estimulando la síntesis de NO, que se observó en este estudio. Además el aumento de TNF $\alpha$  detectado en el medio de cultivo puede favorecer el "clearance" del parásito, como ya ha sido descrito en la bibliografía como una función del TNF $\alpha$ , y en la placenta, según reportes previos de nuestro laboratorio. La disminución de los receptores hallados en nuestros cultivos, permiten estos efectos del TNF $\alpha$ .

## RESULTADOS - Sección 5

Cuantificar la infección del tejido placentario modificada por la cepa del parásito y dosis del inóculo, modulada por agentes deletéreos placentarios

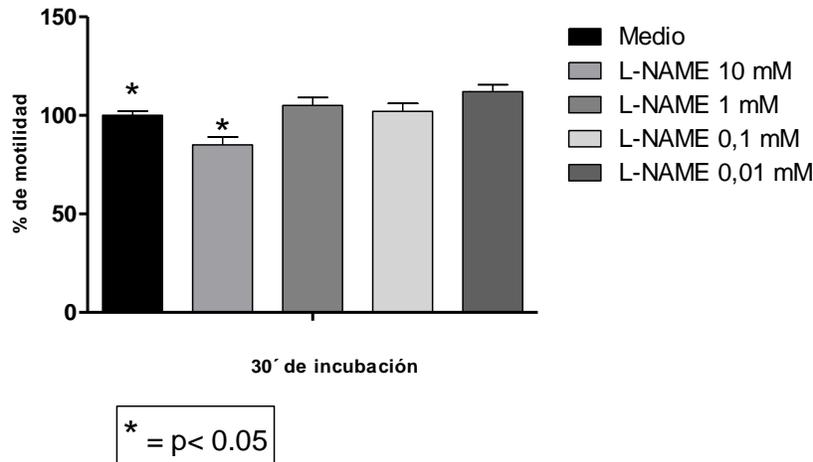
### 5.1 Tipificación de la cepa congénita Lucky

La tipificación fue realizada en el laboratorio del Dr. Gabriel Schijman (INGEBI) y el resultado de la tipificación reveló que Lucky está compuesto por una mezcla de dos linajes TcII /VI (SL-PCR II 425 bp, heminested 24s ribosomal PCR 140 bp, A10 fragment 525 bp plus 580 bp)(Burgos et al. 2007)

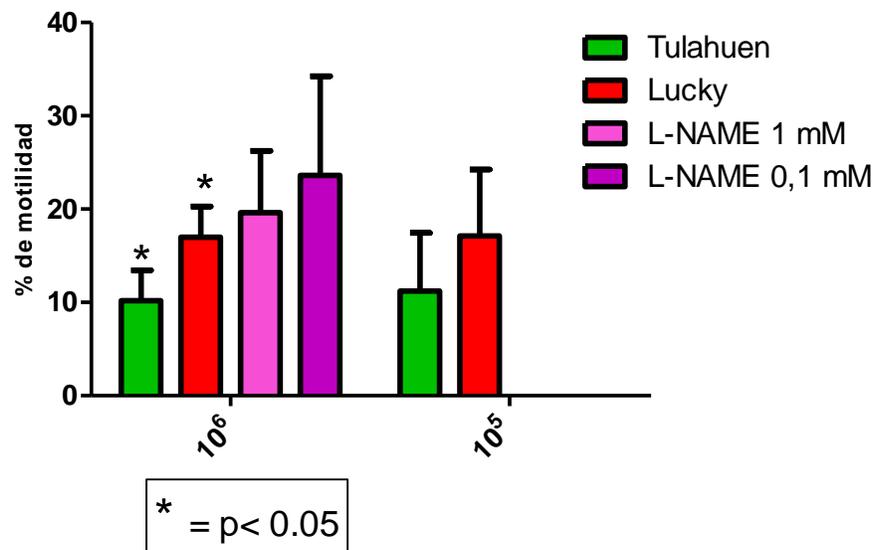
### 5.2 Cuantificación de la motilidad parasitaria, a tiempo final de cultivos

Se analizó el porcentaje de parásitos móviles al finalizar cada tiempo de co-cultivo, se contaron en cámara de Neubauer, y se expresó como porcentaje de parásitos móviles en relación al inóculo inicial, teniendo como antecedente que el medio ambiente placentario produce factores que son deletéreos para el parásito (Díaz-Luján et al. 2004; Triquell et al. 2009) el porcentaje de motilidad puede relacionarse con la susceptibilidad a estos factores, la persistencia en el mismo en un estado viable por lo tanto infectivo y probablemente una mayor posibilidad del parásito de ingresar al tejido placentario

Para descartar un efecto tóxico directo del inhibidor de NOS (L-NAME) sobre el trypomastigote, se realizaron incubaciones de  $10^5$  parásitos en medios con concentraciones crecientes de L-NAME de 0,01 mM, 0,1 mM, 1 mM y 10 mM durante 30 minutos, de esta manera se descarto un efecto toxico sobre el trypomastigote, el porcentaje de sobrevivencia se observa en la Figura 30.



**Figura 30 Ensayo de toxicidad de L-NAME. Porcentaje de motilidad de los parásitos incubados con L-NAME.** Se incubaron 30 minutos  $10^5$  trypomastigotes, en medios condicionados, con concentraciones crecientes de L-NAME: 0,01 mM, 0,1 mM, 1 mM y 10 mM, se comparó la motilidad con el control sin el inhibidor, no se observa una variación significativa en la sobrevivencia del parásito con la exposición directa del inhibidor, con las concentraciones utilizadas en nuestros ensayos. Se muestra el Valor Medio  $\pm$  ESM. El análisis se realizó con el test estadístico ANAVA seguido del test post-hocde Comparación Múltiple de Bonferroni Se consideró estadísticamente significativo un p-valor  $< 0,05$  (\*).



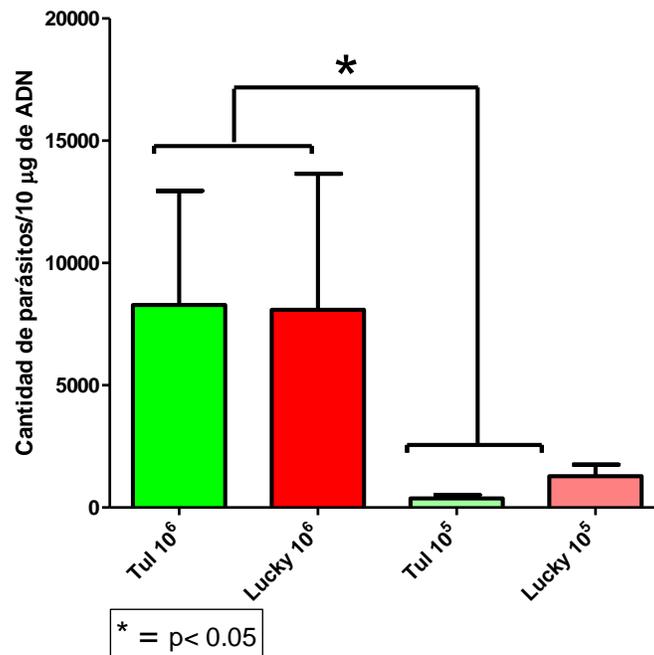
**Figura 31 Porcentaje de parásitos móviles a tiempo final de co-cultivo.** Se observa el porcentaje de parásitos móviles con respecto al inóculo inicial, al finalizar las 24 hs de co-cultivo, con las cepas Tulahuen y Lucky y con inóculos iniciales de  $10^6$  y  $10^5$  trypomastigotes, y en presencia del inhibidor de NOSe L-NAME en concentraciones de 0,1 mM y 1 mM en presencia de un inóculo inicial de  $10^6$  parásitos. Se muestra el Valor Medio  $\pm$  ESM. El análisis se realizó con el test estadístico ANAVA seguido del test post-hocde Comparación Múltiple de Bonferroni Se consideró estadísticamente significativo un p-valor  $< 0,05$  (\*).

En la Figura 31 podemos observar que la sobrevivencia en el medio es más elevada en la cepa congénita que en la cepa Tulahuen, siendo estas diferencias significativas estadísticamente, también observamos que en presencia del inhibidor de la NOS L-NAME esta sobrevivencia también presenta un aumento, aunque no es significativo.

Sobre este resultado podemos concluir, y teniendo en cuenta resultados anteriores donde se comprobó que el medio ambiente placentario es deletéreo para el parásito (Triquell et al. 2009), que el porcentaje de sobrevivencia es independiente del inóculo de parásitos, pero sí de la cepa del *T. cruzi*, siendo mayor el porcentaje de motilidad en la cepa aislada de un caso congénito (Lucky), en los medios sobrenadantes de cultivo. Por otro lado se observó que en presencia del inhibidor de NOSe, L-NAME, una tendencia al aumento en el porcentaje de motilidad en los medios sobrenadantes de cultivo.

### **5.3 Medida de la Carga parasitaria en explantos placentarios por qPCR**

Por medio del análisis por PCR en tiempo real cuantitativa, se analizó la carga parasitaria en explantos placentarios co-cultivados con  $10^6$  y  $10^5$  parásitos de las cepas de *T. cruzi*, Tulahuen y Lucky, se realizó una curva de calibración de parásitos a los fines de poder cuantificar la carga parasitaria. La misma se expresa como parásitos/10 $\mu$ g de ADN, los valores son representativos de al menos tres experimentos independientes,



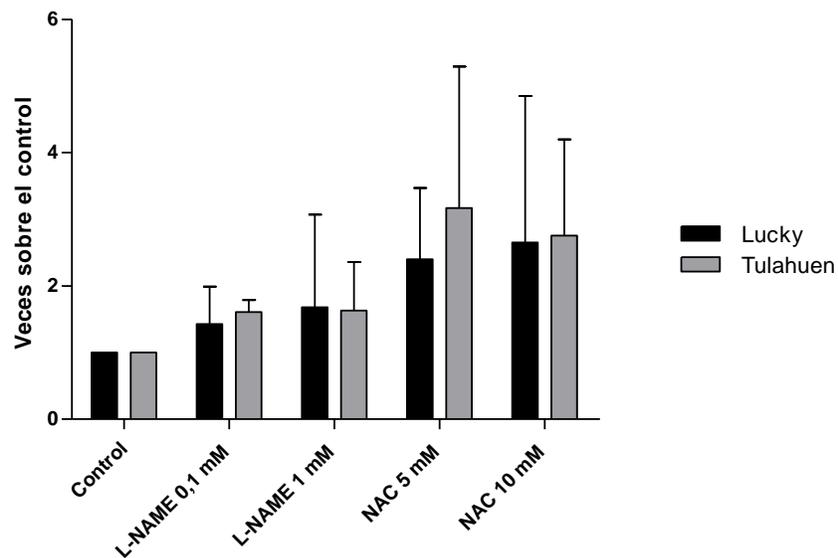
**Figura 32 Cantidad de parásitos/µg de ADN en explantos placentarios.** Cultivados con cepas Tulahuen y Lucky de *T. cruzi*, con 10<sup>6</sup> y 10<sup>5</sup> trypomastigotes cada una. Se observa diferencias significativas proporcionales a la carga inicial parasitaria con una diferencia estadísticamente significativa. Se muestra el Valor Medio ± ESM. El análisis se realizó con el test estadístico ANAVA seguido del test post-hoc de Comparación Múltiple de Bonferroni. Se consideró estadísticamente significativo un p-valor < 0,05 (\*).

En la Figura 32 se observa que la carga parasitaria fue similar con ambas cepas con una diferencia significativa en la carga parasitaria entre los explantos co-cultivados con 10<sup>6</sup> parásitos y con 10<sup>5</sup> parásitos ( $p < 0.05$ ), lo que verifica que la carga parasitaria en el medio sobrenadante de los explantos será directamente proporcional a la infección placentaria. Con respecto a las diferencias entre las distintas cepas lo que podemos observar es que con una carga inicial de 1 millón de parásitos no observamos diferencias entre ambas cepas y las desviaciones estándares son muy grandes. Cuando la carga inicial de parásitos es de 100000

observamos que si bien no hay diferencias significativas entre las cepas la placenta co-cultivada con la cepa Lucky presenta una tendencia al aumento.

#### 5.4 Carga parasitaria relativa en presencia de L-NAME y NAC

Para analizar la carga parasitaria en presencia del inhibidor de NOS, L-NAME y en presencia de NAC, se realizó también una PCR en tiempo real cuantitativa, los valores en este caso fueron expresados de manera relativa, a la carga parasitaria sin tratamiento alguno. Se expresa por lo tanto las veces sobre el Control (cultivo con  $10^6$  trypomastigotes sin ningún tratamiento)



**Figura 33. Carga parasitaria relativa en co-cultivos placentarios en presencia de L-NAME y NAC** con respecto a co-cultivos con  $10^6$  trypomastigotes de cepas Tulahuen y Lucky no tratados. L-NAME 0,1 mM y 1 mM, se observa una tendencia al aumento en la carga parasitaria relativa, con ambas concentraciones del inhibidor. NAC 5mM y 10 mM, se observa una mayor carga parasitaria que el no tratado y que con el inhibidor de NOS, la diferencia no fue estadísticamente significativa. Se muestra el Valor Medio  $\pm$  ESM. El análisis se realizó con el test estadístico ANAVA seguido del test post-hocde Comparación Múltiple de Bonferroni Se consideró estadísticamente significativo un p-valor  $< 0,05$  (\*).

Podemos comprobar que el NO y el estrés nitrosativo serían en parte responsables de limitar o impedir la infección con *T. cruzi*, ya que observamos que cuando

inhibimos estos efectos se detecta una tendencia a incrementar la carga parasitaria en placenta.

## **CONCLUSION - Sección 5**

Podemos concluir que la infección del tejido placentario es directamente proporcional a la cantidad de parásitos que se encuentran en el sobrenadante placentario, demostrando que si bien se observaron algunas diferencias biológicas, (como la sobrevida analizada como motilidad parasitaria), no se observa una diferencia estadísticamente significativa entre ambas cepas en cuanto a la infección de los explantos placentarios, por lo tanto por lo menos en período inicial de la infección (24 hs) se podría concluir que no se observan diferencias en la capacidad infectiva de ambas cepas. Si tenemos en cuenta la mayor viabilidad parasitaria de la cepa Lucky con respecto a la Tulahuen, y una tendencia al aumento con el inóculo de  $10^5$  parásitos, esto podría influir en un aumento en la chance de ingresar al tejido placentario de la primera cepa.

Por otro lado pudimos observar que cuando ocurre una disminución de NO en presencia de L-NAME se observa una tendencia de aumento en la infección con ambas cepas y un aumento de la viabilidad en los sobrenadantes de los co-cultivos placentarios, de igual manera cuando se produce una disminución en el estrés nitrosativo, en presencia de NAC, observamos la misma tendencia, por lo que se puede concluir que la infección placentaria pareciera no depender de la cepa de parásito, (por lo menos con las dos cepas analizadas en este trabajo), pero sí de la carga parasitaria y de la secreción de agentes deletéreos, como NO y ONOO<sup>-</sup>.

# DISCUSIÓN

La transmisión del *T. cruzi* a través de la placenta, que lleva a la enfermedad congénita de Chagas, ha sido bien documentada. El primero en describir un caso congénito fue Dao en Venezuela en 1949, luego fue reportada por numerosos autores revisado por (Freilij & Altcheh 1995; Schijman 2007; Carlier et al. 2012). Este tipo de transmisión ha cobrado relevancia sobre todo en los países no endémicos, que en los últimos años recibieron una importante afluencia de inmigrantes, entre ellos muchos chagásicos, con una gran cantidad de mujeres en edad fértil, que aportarían nuevos casos congénitos. (Soriano-Arandes et al. 2016). En nuestra región esta forma de transmisión es muy importante, sobre todo donde la transmisión vectorial logra ser interrumpida, los casos congénitos generan nuevos casos en esta región. Según un reciente informe de la OMS de 2015, estima que en nuestro país, las mujeres chagásicas en edad fértil son 211102 y los casos por transmisión congénita por año son 1457, siendo mayor que la transmisión vectorial que se estima en 1078 casos nuevos por años (World Health Organization 2015). Aunque esta forma de transmisión fue descrita alrededor de 100 años atrás, la ruta precisa por la cual el parásito llega al feto no ha sido dilucidada aún y es materia de estudio. El trofoblasto vellositario ha sido descrito como la primera barrera que el *T. cruzi* tiene que atravesar para poder infectar al feto, llegando a éste por vía hematogena a través de la vellosidad placentaria (Bittencourt 1992; Schijman 2007; Fretes & Kemmerling 2012). Fernández-Aguilar et al. (2005) y Moya et al. (1979) estudiando placentas de madres chagásicas, hallaron parásitos en la placa coriónica pero no en las vellosidades coriónicas. Estos autores sugirieron que el medio por el cual el *T. cruzi* llega al feto es por vía hematogena a través del seno marginal, esparciéndose por la placa coriónica en vez del trofoblasto. También se sugirió que el canal de parto puede ser otra ruta de transmisión congénita. (Moya et al. 1989; Blanco et al. 2000). En el presente trabajo se utilizaron vellosidades

coriónicas, que es una de las posibles rutas de infección fetal y presenta una muy amplia superficie de interacción con la sangre materna, se estima que el área superficial de sincitiotrofoblastos es de aproximadamente  $12\text{m}^2$  (Ellery et al. 2009), la que es bañada por la sangre materna, que en la embarazada chagásica, con la posibilidad de transmitir la infección, es donde se encuentra circulando la forma infectiva del *T. cruzi*.

La enfermedad de Chagas presenta una gran variabilidad en la morbilidad y en la presentación clínica de la misma, (cardíaca, digestiva o cardíaca y digestiva). Las cepas de *T. cruzi* han sido involucradas en distintas formas clínicas de la enfermedad de Chagas (Dutra et al. 2005; Macedo et al. 2004; Mejía & Triana 2005). Tanto la variabilidad genética del parásito como la del huésped pueden influir en la clínica de la enfermedad de Chagas (Macedo & Pena 1998).

Evidencias de la distribución diferencial de los linajes en ciclos domiciliario y salvaje en la transmisión del *T. cruzi* y la patogenicidad de la enfermedad de Chagas, por estudios de la diversidad genética del parásito, se ha demostrado una asociación precisa entre los linajes del parásito con la forma clínica de la enfermedad. (Manoel-Caetano & Silva 2007). Sin duda no puede ser solo explicado por diferencias genéticas entre la población humana que habita estas áreas. Así, se cree generalmente que es primariamente determinado por la variación genética del *T. cruzi*. Además, el posible rol del medio ambiente, nutricional y aspectos inmunológicos del huésped no pueden ser descartados (Macedo et al. 2004).

Por lo tanto ambos múltiples factores del huésped y parásito parecieran estar involucrados en la infectividad y podría constituir las bases del histotropismo (Manoel-Caetano & Silva 2007).

Con respecto a la infección congénita también diversos factores son los que podrían estar involucrados en la incidencia de la transmisión. Se podría describir como la interacción entre múltiples factores, desde un punto de vista ecológico integral, la ocurrencia o no de la enfermedad de Chagas congénita, resulta de interacciones complejas entre el parásito y dos huéspedes vertebrados, la madre y el feto, que se producen en el contexto especial del embarazo (Carlier & Truyens 2015). La condición del huésped, como las características genéticas, inmunológicas y nutricionales de la mujer, la edad, la historia obstétrica y el estadio de la enfermedad de la madre, tanto como la cepa del *T. cruzi* o la carga parasitaria, pueden participar en el riesgo en la transmisión congénita de la enfermedad de Chagas (Bittencourt 1992, Schijman 2007) .

Mientras, la participación de la cepa del *T. cruzi* es materia de estudio y de controversia. Andrade (1999) encontró que tres diferentes cepas de *T. cruzi* tenían diferente tropismo en los tejidos del ratón y más tarde en una publicación mas reciente postuló la relevancia de las diferencias genéticas del huésped en la distribución de las distintas cepas en diferentes tejidos, en una infección experimental(Andrade et al. 1999; Andrade et al. 2002).

Estudios epidemiológicos mostraron diferencias geográficas en la incidencia de la enfermedad de Chagas congénita (Bittencourt 1992; Martins-Melo et al. 2014) Andrade et al, 1982, y Solana et al 2002 describieron diferencias biológicas entre las subpoblaciones del *T. cruzi* en la transmisión vertical experimental. Estos datos pueden estar indicando que, diferentes cepas o también individualidades del huésped, como se sugiere por el agrupamiento de familias trasmisoras de la enfermedad congénita de Chagas (Sanchez Negrete et al, 2005; Schijman, 2006) participan en la transmisión vertical del *T. cruzi*. Sin embargo, Virreira et al (2006) y Burgos et al (2007) concluyeron que la transmisión congénita del *T. cruzi* no está

asociada con el polimorfismo genético del *T. cruzi*. Queda por determinar si tales características dependen de los genotipos de parásitos como se define en la actualidad. De hecho, varios genotipos de *T. cruzi* (Tc I, Tc II, TcIII, TcV y TcVI) y asociaciones de diferentes genotipos se han identificado en los casos de infección congénita. El genotipo Tc V se ha informado en el 80-100% de los casos congénitos en Argentina, Bolivia, sur de Brasil, Chile y Paraguay, mientras que TC II ha sido identificado en los pocos casos detectada en los otros estados de Brasil (Virreira et al. 2006; Virreira et al. 2007; Burgos et al. 2007; Corrales et al. 2009; Garcia et al. 2014; Carlier et al. 2015). Por lo tanto, si por ejemplo, Tc I, Tc II u otros genotipos se transmiten con menos frecuencia ya que se han detectado en menor frecuencia en la infección congénita, es un tema que queda por ser investigado. Esto podría deberse a una distribución geográfica diferencial de las cepas, siendo la más frecuente, en los países anteriormente mencionados, la cepa TcV, y las cepas TcII y TcVI (WHO 2012). En el presente trabajo, empleamos parásitos TcVI de la cepa Tulahuen y una cepa aislada de un caso congénito, que de acuerdo a nuestra tipificación realizada en colaboración en el laboratorio del Dr. Schijman (INGEBI-CONICET) es una población mixta TcII/VI, las que se comportaron biológicamente diferentes en el ambiente de las vellosidades coriónicas placentarias. Aunque TcII fue descrito previamente como no asociado específicamente a la transmisión congénita de Chagas (Burgos et al 2007; Virreira et al 2006), la controversia aparente hallada en la literatura en las diferencias en el comportamiento biológico de las distintas subpoblaciones de *T. cruzi* y de la ausencia de DTUs específicos de *T. cruzi* asociados con la transmisión congénita del Chagas, podrían ser explicadas por las posibles diferentes rutas que el *T. cruzi* emplea para llegar al feto y/o por los factores individuales específicos de cada madre chagásica embarazada (Torrico et al. 2004). Otros trabajos utilizando modelos de ratones y parásitos de las cepas II

y VI, concluyen que es muy importante el momento de la infección materna, sobre todo para el desarrollo normal del feto y el embarazo, poniendo en riesgo el embarazo cuando la infección es durante el mismo y no una infección previa, las tasas de transmisión encontradas fueron similares entre ambas cepas, descartando por lo menos en estas dos que haya uno de los genotipos que sea predisponente a la transmisión congénita. (Cencig et al. 2013)

En el presente trabajo de tesis se demuestra que dos poblaciones diferentes del *T. cruzi*, cepa Tulahuen (Tc VI) y otra cepa aislada de un recién nacido infectado congénitamente (a la que llamamos Lucky, TcII/VI), tienen similar conducta infectiva en las vellosidades coriónicas *in vitro*, demostrado por PCR cuantitativa. Resultados similares a los obtenidos previamente por la medición de área ocupada por el *T. cruzi* en el tejido placentario y por la cantidad de amastigotes por nido. En los trabajos previos se demostró que la capacidad infectiva es muy baja comparado con la infección de células VERO. (Triquell et al. 2009). Estos resultados podrían indicar una menor infección placentaria *in vitro* o una baja tasa replicativa una vez que el *T. cruzi* accede a las células placentarias. Al respecto, los resultados aquí mostrados son similares a los obtenidos con la cepa Tulahuen por (Díaz-Luján et al. 2004). Por otra parte Cencig et al (2013) utilizando un modelo experimental agudo en ratones con similares inóculos parasitarios con cepas de linajes DTU II y VI, y observaron en corazón y en músculo esquelético cargas parasitarias en el orden de  $3 \times 10^5$  parásitos/10  $\mu$ g de ADN, la carga parasitaria encontrada en el presente trabajo es considerablemente menor  $8 \times 10^3$  parásitos/10  $\mu$ g ADN, estos datos demuestran que la placenta es un órgano con una baja susceptibilidad a la infección por *T. cruzi*. En otro trabajo donde emplean perfusión de placentas con solución fisiológica conteniendo  $10^7$  trypomastigotes de *T. cruzi*, estructuras similares a amastigotes fueron detectados en el trofoblasto en forma adherida,

pero no dentro del trofoblasto o de la vellosidad coriónica (Shippey et al 2005), esto refuerza los datos aquí presentados. Se comprueba entonces que la barrera placentaria intacta es efectiva para evitar o disminuir considerablemente la infección del tejido placentario. La pobre capacidad del *T. cruzi* de infectar o reproducirse dentro de los explantos placentarios podrían reducir la posibilidad de infectar al feto y producir así la enfermedad congénita de Chagas.

Resultados previos de nuestro laboratorio demostraron que trofoblasto aislado de placentas, es susceptible infección, la cual fue significativamente distinta entre monocapa de citotrofoblasto y sinciotrofoblasto (Díaz-Luján et al. 2012). Esto indica que la capacidad de *T. cruzi* de infectar el STB, cultivado en monocapa presentó menor susceptibilidad de infección que el citotrofoblasto (CT). De este modo la baja presencia de parásitos dentro de la vellosidad placentaria podría deberse a la escasa susceptibilidad de infección que presenta el STB, como la primera barrera placentaria.

Se ha postulado que la presencia del parásito en la proximidad de las vellosidades placentarias y su viabilidad podrían modular la infección tisular, siendo éste un aspecto crucial para la infección congénita (Freilij & Altcheh 1995; Salas et al. 2007). Estos fenómenos han sido observados en las re-infecciones de mujeres embarazadas y de madres con parasitemia aumentada. Debido a que las re-infecciones aumentan la parasitemia, las madres que tienen niveles de parasitemia aumentada, tienen mayor riesgo de transmitir el parásito al feto (Bittencourt 1992). Respecto a esto, Torrico et al. (2006) describió una relación positiva entre la densidad vectorial donde las madres viven y la severidad de los casos congénitos en algunas regiones de Bolivia, sugiriendo que las re-infecciones aumentan la parasitemia materna y de esta manera empeoran la enfermedad de Chagas congénita. En otra situación en la cual el parásito persiste en la placenta es descrito

en este trabajo, donde la cepa congénita del *T. cruzi* fue menos susceptible que la cepa Tulahuen al medio ambiente deletéreo placentario. Los parásitos recuperados en el medio del co- cultivo placentario mostraron que el aislado Lucky tiene mayor porcentaje de motilidad que la cepa Tulahuen, siendo la diferencia en la tasa de motilidad estadísticamente significativa (Fig. 30). Ha sido descrito que el parasitismo placentario en ratones está relacionado con el incremento de la parasitemia materna y además trabajos recientes describen que la parasitemia al nacer es otro factor de riesgo para la transmisión congénita del Chagas entre otros factores (Mjihdi et al. 2002; Salas et al. 2007; Brutus et al. 2010). Además, se ha visto que madres infectadas que viven en un área endémica, con un alto riesgo de reinfecciones, transmitieron el *T. cruzi* a sus hijos en sucesivas gestaciones (Bittencourt 1992). Las reactivaciones de la enfermedad de Chagas, por una co- infección con HIV, aumenta el riesgo de infección fetal notablemente (Scapellato et al. 2009) Indicando por lo tanto, que la presencia del parásito, o la parasitemia materna constituye un factor muy importante para la transmisión congénita (Bua et al. 2012; Hermann et al. 2004).

En el presente trabajo se demuestra que tanto la recuperación de parásitos al final de los co-cultivos como el tratamiento de los parásitos con medio de cultivo de explantos placentarios, indican que las dos subpoblaciones analizadas poseen diferentes susceptibilidades al medio deletéreo placentario. Siendo la cepa Tulahuen significativamente más susceptible a los agentes deletéreos producidos por la placenta, el aislado de Lucky posee más chance de penetrar en el tejido placentario, por persistir mayor tiempo viable. Este fenómeno podría estar modulando la capacidad de diferentes cepas del parásito a penetrar y subsecuentemente a infectar el tejido placentario, siendo la circulación lenta de la placenta (Carter AM 1999) y el nivel de agentes líticos contra el parásito dos de los

factores que regulan la carga parasitaria en la proximidad de la vellosoidad placentaria. De acuerdo a nuestros resultados, la persistencia de subpoblaciones de *T. cruzi* en el medio ambiente placentario podría generar una mayor carga parasitaria, que pudiera semejarse a aumento de parasitemia en la embarazada chagásica (Bua et al. 2012; Hermann et al. 2004), que favorecerá la infección en presencia de alteraciones morfológicas o funcionales de la barrera placentaria.

Otra de las características observadas fue que los inóculos con concentraciones más bajas de parásito, las placentas infectadas con la cepa Lucky tuvieron una mayor carga parasitaria que con la cepa Tulahuen, aunque esta diferencia no fue estadísticamente significativa, ya que las medidas de la carga parasitaria presentaron desviaciones estándar elevadas, de todos modos esta tendencia al aumento por la cepa Lucky estaría en concordancia con la mayor sobrevivencia que tiene esta cepa al final de los co-cultivos placentarios (Fig. 31) Este efecto también fue demostrado utilizando otros medios de cultivos condicionados (Triquell et al. 2009).

La infección con *T. cruzi* activa en la placenta, como lo hacen otros agentes patógenos, un medioambiente pro-inflamatorio. Paralelamente se ha descrito en las embarazadas chagásicas con aumento en los niveles de TNF $\alpha$  séricos (García et al. 2008; Vekemans et al. 2000; Truyens, Hermann, et al. 2005). De manera similar, utilizando el modelo experimental *in vitro* de esta tesis, se detectaron aumentos significativos en los niveles de TNF $\alpha$  en los medios sobrenadantes de cultivo explantos placentarios infectados con *T. cruzi* (Fig. 27). En nuestros cultivos controles sin parásitos, observamos niveles elevados de Receptores solubles 1 y 2 para TNF $\alpha$  (Figs. 28 y 29), que resulta sorprendente. Sin embargo, coincide con publicaciones previas en las placentas en la que también han sido descritos niveles elevados de dichos receptores, ya que el nivel elevado de los mismos se

encarga de preservar al tejido placentario de un aumento de TNF $\alpha$  que podría dañarlo (García et al. 2008; Austgulen et al. 1993; Austgulen, Espevik, et al. 1992; Austgulen, Liabakk, et al. 1992). Sin embargo, en los co-cultivos de explantos placentarios-*T. cruzi*, se produce tanto aumento de TNF $\alpha$  como disminución de los receptores, favoreciendo de esta manera la acción del TNF $\alpha$  (Figs.27, 28 y 29). El aumento del TNF $\alpha$  se ha descrito por múltiples autores que es un factor importante en el control de la infección, aunque por otro lado un aumento exagerado está ligado al daño tisular y a la alta mortalidad en infecciones experimentales (Andrade et al. 2008; Martins et al. 1998; Mjihdi et al. 2004). Su participación en la transmisión congénita se ha descrito en hermanos gemelos con Chagas congénito, donde una disminución en respuesta Th1 se asoció con una clínica más severa que su hermano que tuvo un perfil de citoquinas proinflamatorias mas elevado (dentro de estas un aumento de TNF $\alpha$ ) (Fernández-Villegas et al. 2014)

Es importante destacar que el aumento de TNF $\alpha$  podría ser el desencadenante del aumento de NO por activación de la NOSi principalmente en macrófagos (Martins et al. 1998; Machado et al. 2008; Gutierrez et al. 2009; Guiñazú et al. 2007). Sin embargo en las placentas la isoforma NOSe se encuentra principalmente expresada (Rossmanith et al. 1999; Garvey et al. 1994; Lyall et al. 1998; Eis et al. 1995), por lo tanto TNF $\alpha$  podría activar la actividad de NOSe como ha sido previamente reportado (Barsacchi et al. 2003). El TNF $\alpha$  activa la NOSe probablemente por la activación de la vía PI3K/Akt (Bulotta et al. 2001). En contraste a esto, una respuesta prolongada del TNF $\alpha$  produce una regulación negativa en la isoforma de NOSe. En nuestro sistema experimental, se observó tanto un aumento elevado de TNF $\alpha$ , como también un aumento en la enzima NOSe tanto en la expresión de ARNm como en su traducción proteica.

El siguiente problema fue comprobar si había, por consiguiente, activación de NOSe. Para ello analizamos óxido nítrico, uno de los factores deletéreos, sino el mayor, producido por el tejido placentario. Ya que la placenta no tiene inervación, su sistema humoral es muy importante en regular el tono vascular fetal. El Oxido Nítrico (NO) es secretado por el tejido placentario de una manera constitutiva y una inducible por las isoenzimas de la Oxido Nítrico Sintasa endotelial (NOSe) y por la Oxido Nítrico Sintasa inducible (NOSi) (Orange et al., 2003; Rossmann et al., 1999; Zarlingo et al., 1997), La NOSe se localiza en el sincitiotrofoblasto y es expresado en mayor cantidad que NOSi en las vellosidades pequeñas e intermedias. Estos tipos de vellosidades son las que empleamos en nuestro trabajo y son las que ofrecen la barrera placentaria más delgada, donde ocurren los procesos de transferencia materno-fetal y la que mayor superficie de intercambio tiene con la sangre materna.

Además de participar en la regulación del tono vascular, el NO, secretado por las células del STB y células endoteliales principalmente, desempeña un papel de protección inmunológica frente a parásitos protozoarios entre otros, tanto in vivo como in vitro (James 1995). Particularmente se ha demostrado como uno de los principales agentes deletéreos contra el *T. cruzi* y otros microorganismos patógenos (Rivero 2006; Vespa et al. 1994). Xiang et al. (Xiang et al. 2005) reportó una actividad de la NOSe de  $21.69 \pm 3.84$  U/mg y una cantidad de NO de  $44.38 \pm 9.59$   $\mu\text{mol/mg}$  en la placenta normal. Ésta concentración de NO es trypanocida para formas infectivas de *T. cruzi* de acuerdo al trabajo de Villalta et al. (Villalta et al. 1998). Éste trabajo indica que niveles de 20 nmol de NO fueron suficientes para matar  $10^6$  células de *T. cruzi*. Por lo tanto, la cantidad de NO producida usualmente por la placenta en condiciones basales es trypanocida para el trypomastigote del *T.*

*cruzi*. En base a estos conceptos mencionados se analizó posibilidad que el NO haya causado el efecto observado en la primera parte del trabajo. Lo que pudimos observar en resultados previos que la secreción de NO por el tejido placentario que era deletérea para el parásito ya que estaba en el orden de 5 a 10  $\mu\text{M}$  o entre 0,5 y 1,5  $\mu\text{mol/g}$  de placenta, usamos tres explantos de 0,020 a 0,030 g, lo que nos daría una concentración aproximada de 30 nmoles de NO producido por explanto o 90 nmoles en cada pozo de los co-cultivos; por lo tanto según lo descrito por Villalta (2008) sería una cantidad trypanosida la que observamos en nuestro modelo experimental. Por otro lado se observó que si bien las diferencias no fueron significativas, se observó que la producción de NO fue directamente proporcional a la cantidad de parásitos inoculados en los cultivos placentarios (Fig. 9).

El mecanismo bioquímico o biológico por el cual el NO ejerce su efecto deletéreo sobre el parásito, es mediante la inactivación de las enzimas esenciales para el metabolismo de energía y el crecimiento (James & Hibbs 1990; James 1995) en particular se ha descrito un efecto sobre la enzima cruzipaína, que sería inactivada por el NO. El óxido nítrico inhibe eficazmente la actividad de cruzipaína (Venturini et al. 2000), un importante cisteína proteinasa se expresa en todas las etapas del ciclo de vida del parásito y que es abundante en las formas replicativas (Cazzulo et al. 1997). La cruzipaína juega un papel importante en la nutrición de parásitos e invasión celular, y en los mecanismos utilizados por el parásito para el escape de la respuesta inmune (Mottram et al. 1998). Como tal, la inactivación mediada por NO- de la cruzipaína puede representar un importante mecanismo de alteración de la estructura y crecimiento del *T. cruzi*.

El efecto deletéreo producido por el medio de cultivo placentario provoca alteraciones ultraestructurales en el parásito, lo que fue demostrado en trabajos previos de nuestro laboratorio, donde se muestran las alteraciones producidas en

los trypomastigotes de la cepa Tulahuen. (Díaz-Luján et al. 2004). El presente trabajo muestra que el medio placentario fue deletéreo para las dos subpoblaciones utilizadas en los experimentos, pero la cepa congénita fue menos susceptible que la cepa Tulahuen, resultando en diferentes tasas de supervivencia para las distintas poblaciones de *T. cruzi* en el medio sobrenadante placentario (Fig. 30), esto podría explicarse debido a que el *T. cruzi* utiliza mecanismos de escape a los procesos de defensa de la célula huésped. Uno de los posibles mecanismos utilizados por el parásito descritos en la bibliografía podría ser escapando a las concentraciones deletéreas del NO vía la arginasa parasitaria (Vincendeau et al. 2003). Sin embargo serían necesarios más estudios para dilucidar este importante aspecto de la infección placentaria por el *T. cruzi*.

Los nitritos son un metabolito estable de la degradación del NO y es la forma de medición en los medios sobrenadantes. Si bien no se observaron diferencias estadísticamente significativas en los niveles de nitritos hallados en los medios de cultivos experimentales y controles, al analizar el nivel de expresión de la NOSe por inmunohistoquímica la isoforma de NOS mas importante en la producción de NO en las vellosidades placentarias, que en presencia del parásito hubo un aumento estadísticamente significativo en su expresión (Figs 7 y 8). Del mismo modo que la transcripción del RNAm de la enzima, en los co-cultivos placentarios-*T. cruzi*, (Figs. 1 y 2). Además observamos que el aumento de la expresión de NOSe y de formación de NO fue dependiente de la cantidad de trypomastigotes presentes en el entorno placentario, ya que se observó que con cantidades de  $10^5$  parásitos, la expresión de NOSe no aumentó significativamente frente al control sin infección (Figs.5 y 6). Por otro lado con experimentos controles se observó que ante la presencia de parásitos inactivados el aumento de la transcripción de ARNm de NOSe fue de menor magnitud que con el parásito viable. Un efecto similar

observado en las placentas incubadas con 200  $\mu\text{M}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$  en las que también se observaba un incremento de ARNm de NOSe (Figs 3 y 4), menor que con parásitos viables, lo que nos indica que el aumento en la expresión de esta enzima es un evento que se desencadena frente a una agresión al tejido placentario, que puede ser un antígeno (parásito muerto) o puede ser una exposición a agentes oxidantes como lo es el  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Sin embargo, hay un efecto específico desencadenado por la célula parasitaria viva, ya que los niveles proteicos y transcripcionales de NOSe son mayores, aunque no significativos.

En patologías como la preeclampsia, la diabetes gestacional, retardo de crecimiento intrauterino entre otras, se han descrito alteraciones de la expresión de la NOSe. Estas patologías cursan con un aumento en el estrés nitrosativo, lo que lleva a daños en el tejido placentario y a alteraciones en el desarrollo normal del embarazo y del feto.(Wang et al. 2003; Krause et al. 2013; Schneider et al. 2015; Vignini et al. 2016).

El NO puede ejercer su acción a través de la nitración de proteínas, para lo cual, ocurre la formación de compuestos intermedios como los peroxinitritos (Radi 2004). Por ello el NO podría estar derivando hacia la producción de peroxinitritos los cuales poseen un efecto más potente con respecto a la nitración de moléculas de la célula huésped y también sobre el *T. cruzi*, nitrosilando proteínas como la cruzipaína, que como ya se mencionó es muy importante para el parásito en la invasión, su reproducción, crecimiento y escape del sistema inmune del huésped.

Ante esta posibilidad, se analizó la presencia de proteínas nitrosiladas, por inmunohistoquímica en el tejido placentario de los diferentes cultivos. Se observó un marcado aumento de proteínas nitrosiladas en los cultivos con *T. cruzi*, (Figs 10 y 11). El análisis del área marcada nos indicó un aumento similar en ambas cepas, y

por el análisis de la intensidad de marca se observó que la cepa congénita posee una mayor intensidad que la cepa Tulahuen (Fig 12). Además se observó que a dosis más bajas de parásitos los niveles de nitrotirosina se veían aumentados estadísticamente significativa referido al control, por lo que podemos suponer que a menores concentraciones de parásitos pudiera haber un aumento de la respuesta de NO que explique el aumento de estrés nitrosativo, aunque no hay un incremento en la síntesis de NOSe.

Se ha descrito también aumento de estrés oxidativo en otras infecciones placentarias con parásitos como *Plasmodium berghei* en modelos en ratones (Sharma et al. 2012).

Naviliat y col. (2007) observaron que en presencia de *T. cruzi* aumenta la peroxinitración, causando daño tisular, siendo este mecanismo propuesto como uno de los responsables de la patogénesis de la enfermedad de Chagas, (Machado et al 2000, Silva et al 2003, Zacks et al 2005) pudiendo ser la causa de la disfunción del miocardio en ésta enfermedad (Silva et al 2003, Zacks et al 2005) y que la presencia de proteínas nitrosiladas co-localiza con NOSi y se correlaciona con el daño tisular. De manera comparable, en el presente trabajo observamos la localización en estructuras similares de los residuos nitrotirosina con la NOSe en el tejido placentario infectado con *T. cruzi* (Figs.8 y 11). Naviliat et al (2007) también postulan que la formación de peroxinitritos tiene una directa acción tóxica sobre el *T. cruzi*, lo que ha sido descrito también por otros autores, indicando que la nitración de enzimas parasitarias tales como la cruzipaina podría ejercer un control del huésped en la infección por *T. cruzi* (Martinez et al. 2014; Naviliat et al. 2005; Alvarez et al. 2004).

En el presente trabajo se ha observado una respuesta del tipo inflamatoria con aumento de  $\text{TNF}\alpha$ , NO, peroxinitritos. Todas estas moléculas tienen un efecto directo sobre el parásito, pero además tendrán un efecto sobre las células y tejidos del huésped, provocando un daño que puede ser aun más dañino que el provocado por el microorganismo infectante. Por lo tanto nos propusimos analizar la estructura de la barrera placentaria, observando y cuantificando los desprendimientos del STB del tejido placentario; analizamos además la formación de fibrinoide de manera cualitativa con las tinciones de citoquímica de PAS y tricrómica de MASSON que nos permiten diferenciar entre fibrinoide de tipo fibrina, de fibrinoide tipo matriz, ambos PAS positivos, pero diferencialmente teñidos con MASSON, el primero de color rojo y el segundo azul. Del análisis estructural se puede concluir que en presencia del *T. cruzi*, tanto la cepa Tulahuen como Lucky, se producen alteraciones estructurales placentarias con desprendimiento del STB (Fig. 19), con formación de fibrinoide mayormente de tipo matriz (Fig. 26) que ha sido correlacionado con una respuesta inmune, a diferencia del fibrinoide tipo fibrina que es el que se produce para favorecer la regeneración del STB en las zonas de discontinuidad del mismo (Kaufmann et al. 1996). Esta alteración es dependiente de la cantidad de parásitos, ya que con  $10^5$  trypomastigotes las alteraciones no difieren estadísticamente del control. Podemos concluir que el daño placentario depende de la formación de NO y de  $\text{ONOO}^-$ , debido a que cuando inhibimos la producción de NO con L-NAME observamos que en presencia del *T. cruzi* las alteraciones estructurales disminuyen significativamente (Figs. 25 y 26), así también lo hace la marca de nitrotirosina (Figs. 16, 17 y 18), por lo que podemos concluir que el responsable final del daño en el tejido es el estrés nitrosativo. Esto último fue corroborado cuando se incubaron los explantos placentarios con NAC, que disminuye las especies reactivas de oxígeno y

por ello previene la formación de peroxinitrito. En este grupo de experimentos, se observó una disminución en las alteraciones estructurales del tejido placentario en presencia de la cepa Tulahuen como de la cepa Lucky, indicando que estrés oxidativo-nitrosativo es causal de los daños de la barrera placentaria y que es dependiente de la dosis de parásitos presente en el medio intervelloso.

Por otro lado se observó que cuando se inhibe la formación de NO por el L-NAME se produce una tendencia al aumento en la carga parasitaria tisular analizada por qPCR, como así también se observó un aumento de la carga parasitaria en el tejido placentario cuando se inhibe la producción de ERO con NAC, por lo que podemos concluir que el efecto del estrés oxidativo en el tejido placentario, puede tener un efecto dual sobre la infección congénita, ya que cuando inhibimos la producción de NO y ONOO<sup>-</sup> observamos que la estructura tisular placentaria se encuentra más conservada, pero la infección se ve favorecida por esta disminución en la respuesta oxidativa.

Ha sido descripto ampliamente en el tejido placentario, que las patologías que cursan con un aumento de estrés oxidativo y/o nitrosativo, presentan alteraciones placentarias, y estas pueden causar desde alteraciones en el normal desarrollo fetal, como retardo de crecimiento intrauterino, nacimientos pretérmino, hasta abortos espontáneos (Burton & Jauniaux 2004; Kurlak et al. 2014; Redman & Sargent 2000; Poston & Raijmakers 2004). Todas estas manifestaciones patológicas también han sido descriptas en embarazadas chagásicas ya sea que transmitan la enfermedad o no.

Por lo tanto, todo lo anteriormente planteado, evidencia que la presencia del *T. cruzi* genera un aumento en la producción de NO y un aumento en el estrés oxidativo, lo que podría tener una influencia en la infección por el *T. cruzi*. Además

el estrés oxidativo producido en presencia de altas dosis del parásito conlleva a un daño tisular en la placenta el que puede estar involucrado en la sintomatología que presentan los niños nacidos de madres chagásicas, sobre todo cuando la infección fuera aguda o con una parasitemia elevada (Altemani et al. 2000).

Con respecto de las dos cepas analizadas, se observó una mayor sobrevivencia de la cepa Lucky en el medio sobrenadante de co-cultivo, significativamente menores niveles de Receptores de TNF $\alpha$  respecto al control, área de marca de nitrotirosina, sin diferencia significativa con Tulahuen pero intensidad de marca mayor estadísticamente significativa. En cuanto a la actividad de  $\gamma$ GT se observa en presencia de Lucky  $10^5$  (Fig. 13) aumento significativo de su actividad con respecto a Tulahuen en su actividad, lo que denota un aumento en el estrés oxidativo que se genera en presencia de la cepa congénita.

Por todo lo anteriormente expuesto, podemos concluir que el Chagas congénito podría, entre otros factores, estar influenciado por las diferencias biológicas que presentan las distintas cepas o poblaciones del *T. cruzi*, siendo en nuestro caso la mayor supervivencia de una de ellas (Lucky), la cantidad de parásitos presentes en el espacio intervelloso en interacción con la barrera placentaria con efectos biológicos diferenciales según esa carga parasitaria, que generan respuestas distintas del tejido placentario, cuyos efectos biológicos más notables son los factores deletéreos producidos por la placenta y la mayor formación de proteínas nitrosiladas y por lo tanto mayor estrés oxidativo. En el presente trabajo corroboramos resultados anteriores de nuestro laboratorio, que postulan que la placenta humana no permite la infección productiva por *T. cruzi*, en ambas cepas estudiadas.

El aumento de estrés oxidativo y daño tisular generado por la infección parasitaria dosis dependiente, podría explicar los distintos signos, patologías, síntomas que padecen algunas embarazadas chagásicas, tales como aborto espontáneo, partos prematuros, retraso en el crecimiento intrauterino; sin necesariamente haberse producido la transmisión del parásito al feto. Esto lleva a una diferenciación entre el grado clínico del Chagas congénito con la incidencia de la transmisión. Este concepto abriría una ventana de futuras investigaciones diferenciando ambos estados.

Podríamos también inferir (como postula Naviliat) que para un eficiente control de la infección por *T. cruzi* se requieren niveles de NO lo suficientemente altos para ejercer su efecto lítico, probablemente debido a la formación de peroxinitrito y otras moléculas nitrantes, pero no tan altas como para producir el daño tisular, que podría estar facilitando, junto con la mayor supervivencia del parásito, a la infección congénita del *T. cruzi*, como así también a las consecuencias relacionadas con el daño de la placenta tan importante en la comunicación entre la madre y el feto, como ya se mencionó anteriormente.

Este trabajo describe los mecanismos que interactúan entre la placenta y distintas poblaciones y dosis de *T. cruzi* y que podrían explicar en parte la baja incidencia de la transmisión congénita en la mayoría de las embarazadas con Chagas crónico inaparente y la mayor incidencia de transmisión vertical en aquellos casos agudos o con altas parasitemias.

Los resultados obtenidos en este trabajo nos plantea diversos caminos a seguir, como el estudio de la regulación de la actividad de la NOSe, los mecanismos celulares y moleculares del *T. cruzi* que le confieren resistencia a los factores deletéreos placentarios en las distintas cepas, u otros mecanismos celulares y

moleculares de expresión y activación de citoquinas de la placenta con diferentes efectos biológicos que ocurren para evitar la infección congénita de Chagas, entre otros.

Sin olvidarnos que las condiciones nutricionales, inmunológicas, económicas y culturales de las madres chagásicas juegan un rol muy importante en la transmisión congénita de la enfermedad de Chagas.

# **PUBLICACIONES**

Durante el desarrollo de la presente Tesis Doctoral, parte de los resultados obtenidos fueron publicados en los siguientes trabajos científicos:

**Trabajos completos:**

**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.**

Triquell MF, Díaz Luján C, Freilij H, Paglini P, Fretes RE. Trans R Soc Trop Med Hyg. 2009; Oct;103(10):1011-8. ISSN: 00359203.

**Differential susceptibility of isolated human trophoblasts to infection by *Trypanosoma cruzi*.**

C. Díaz-Luján, M.F. Triquell, A. Schijman, P. Paglini, R.E. Fretes. Placenta. Volume 33, Issue 4, April 2012. ISSN 0143-4004.

**Capítulos de libro:**

Placental Infection by Trypanosome Cruzi, the Causal Agent of Congenital Chagas' Disease,

Cintia Diaz-Luján, Maria Fernanda Triquell, Luciana Mezzano and Ricardo E. Fretes. Recent Advances in Research on the Human Placenta, Jing Zheng (Ed.), ISBN: 978-953-51-0194-9, InTech, March 07, 2012 Available from: <http://www.intechopen.com/books/recent-advances-in-research-on-the-human-placenta/placental-infection-by-trypanosome-cruzi-the-causal-agent-of-congenital-chagas-disease->

**Colaboraciones:**

**Persistence of *Trypanosoma Cruzi* in Experimental Chagasic Cardiomyopathy**

Bazan Carolina<sup>1</sup>, Micucci Lorena, Fauro Romina, Triquel M. Fernanda, Lo Presti M. Silvina, Baez Alejandra, Strauss Mariana, Camino Gaston, Paglini-Oliva Patricia<sup>1</sup> and

Rivarola H. Walter. *Anti-Infective Agents*, 2012. Volume 10, Number 2, July 2012 , pp. 136-141(6).

**Helminth Antigens Enable CpG-Activated Dendritic Cells to Inhibit the Symptoms of Collagen-induced Arthritis through Foxp3+ Regulatory T Cells.**

Carranza F, Falcón CR, Nuñez N, Knubel C, Correa SG, Bianco I, Maccioni M, Fretes R, Triquell MF, Motrán CC, Cervi L.. *PLoS One*. 2012 ;7(7):e40356. Epub 2012 Jul 25.

**Use of clomipramine as chemotherapy of the chronic phase of Chagas disease.**

Fauro R, Lo Presti S, Bazan C, Baez A, Strauss M, Triquell F, Cremonezzi D, Negrete OS, Willhuber GC, Paglini-Oliva P, Rivarola HW. *Parasitology*. 2013. Jun; 140(7):917-27. doi: 10.1017/S0031182013000103. Epub 2013 Mar 27. PubMed PMID: 23534690.

# **BIBLIOGRAFÍA**

- Alderton, W.K., Cooper, C.E. & Knowles, R.G., 2001. Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. *The Biochemical journal*, 357(Pt 3), pp.593–615. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1221991&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Altemani, A.M., Bittencourt, A.L. & Lana, A.M.A., 2000. Immunohistochemical characterization of the inflammatory infiltrate in placental Chagas' disease: A qualitative and quantitative analysis. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 62(2), pp.319–324. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10813491>.
- Alvarez, M.N. et al., 2004. Macrophage-derived peroxynitrite diffusion and toxicity to *Trypanosoma cruzi*. *Archives of biochemistry and biophysics*, 432(2), pp.222–32. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15542061>.
- Andrade, Z.A., 1982. [Pathogenesis of Chagas' disease. New aspects]. *Arquivos brasileiros de cardiologia*, 38(4), pp.255–60. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6762865>.
- Andrade, L.O. et al., 1999. Differential tissue distribution of diverse clones of *Trypanosoma cruzi* in infected mice. *Molecular and biochemical parasitology*, 100(2), pp.163–72. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10391378>.
- Andrade, L.O. et al., 2002. *Trypanosoma cruzi*: role of host genetic background in the differential tissue distribution of parasite clonal populations. *Experimental parasitology*, 100(4), pp.269–75. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12128054>.
- Andrade, S.G., Magalhães, L.D.A. & Pessina, D.H., 2008. Importance of TNF- $\alpha$  in the course of acute infection with *Trypanosoma cruzi*: Influence of its inhibition by pentoxifylline treatment. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, 103(1), pp.21–26.
- Austgulen, R., Espevik, T., et al., 1992. Expression of receptors for tumor necrosis factor in human placenta at term. *Acta obstetricia et gynecologica Scandinavica*, 71(6), pp.417–24. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1326840>.
- Austgulen, R., Liabakk, N.B. & Espevik, T., 1992. [Secretion of soluble receptors for tumor necrosis factor. An immunologic buffer mechanism during normal pregnancy?]. *Tidsskrift for den Norske lægeforening : tidsskrift for praktisk medicin, ny række*, 112(28), pp.3545–7. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1334285>.

- Austgulen, R. et al., 1993. Soluble receptors for tumor necrosis factor: occurrence in association with normal delivery at term. *Obstetrics and gynecology*, 82(3), pp.343–7. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8395036>.
- Barsacchi, R. et al., 2003. Activation of endothelial nitric-oxide synthase by tumor necrosis factor-alpha: a novel pathway involving sequential activation of neutral sphingomyelinase, phosphatidylinositol-3' kinase, and Akt. *Molecular pharmacology*, 63(4), pp.886–95. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12644590>.
- Beard, C. et al., 2003. Chagas disease in a domestic transmission cycle in Southern Texas, USA. *Emerging Infectious Diseases*, 9(1), pp.103–105.
- Benirschke, K., Kaufmann, P. & Baergen, R., 2015. *Pathology of the human placenta*.
- Bittencourt, A.L. et al., 1972. [Incidence of congenital transmission of Chagas' disease in premature births in the Maternidade Tsylla Balbino (Salvador, Bahia)]. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, 14(2), pp.131–4.
- Bittencourt, A.L., 1976. Congenital Chagas disease. *American journal of diseases of children*, 130(1), pp.97–103. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/813519>.
- Bittencourt, A.L., 1992. Possible risk factors for vertical transmission of chagas' disease. *Rev Inst Med Trop. San Pablo*, 34(5), pp.403–408. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1342103>.
- Blanco, S.B., Segura, E.L. & Gürtler, R.E., 1999. [Control of congenital transmission of *Trypanosoma cruzi* in Argentina]. *Medicina*, 59 Suppl 2, pp.138–42. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10668256>.
- Blanco, S.B. et al., 2000. Congenital transmission of *Trypanosoma cruzi*: An operational outline for detecting and treating infected infants in northwestern Argentina. *Tropical Medicine and International Health*, 5(4), pp.293–301.
- Brisse, S., Verhoef, J. & Tibayrenc, M., 2001. Characterisation of large and small subunit rRNA and mini-exon genes further supports the distinction of six *Trypanosoma cruzi* lineages. *International journal for parasitology*, 31(11), pp.1218–26. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11513891>.
- Brutus, L. et al., 2010. Short report: Detectable *Trypanosoma cruzi* parasitemia during pregnancy and delivery as a risk factor for congenital chagas disease. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 83(5), pp.1044–1047.
- Bua, J. et al., 2012. Vertical transmission of *Trypanosoma cruzi* infection: Quantification of parasite burden in mothers and their children by parasite

- DNA amplification. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 106(10), pp.623–628. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.trstmh.2012.03.015>.
- Bulotta, S. et al., 2001. Activation of the endothelial nitric-oxide synthase by tumor necrosis factor-alpha. A novel feedback mechanism regulating cell death. *The Journal of biological chemistry*, 276(9), pp.6529–36. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11085984>.
- Burgos, J.M. et al., 2007. Direct molecular profiling of minicircle signatures and lineages of *Trypanosoma cruzi* bloodstream populations causing congenital Chagas disease. *International journal for parasitology*, 37(12), pp.1319–27. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17570369> [Accessed April 10, 2013].
- Burton, G.J. & Jauniaux, E., 2004. Placental oxidative stress: From miscarriage to preeclampsia. *Journal of the Society for Gynecologic Investigation*, 11(6), pp.342–352.
- Buttery, L.D.K. et al., 1994. Endothelial Nitric Oxide Synthase in the Human Placenta: Regional Distribution and Proposed Regulatory Role at the Feto- Maternal Interface. *Placenta*, 15(3), pp.257–265.
- Camandaroba, E.L.P., Pinheiro Lima, C.M. & Andrade, S.G., 2002. Oral transmission of Chagas disease: Importance of *Trypanosoma cruzi* biodeme in the intragastric experimental infection. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo*, 44(2), pp.97–103.
- Carlier, Y. & Torrico, F., 2003. Congenital infection with *Trypanosoma cruzi*: from mechanisms of transmission to strategies for diagnosis and control. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 36(6), pp.767–71. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15143784>.
- Carlier, Y. et al., 2012. Congenital parasitic infections: A review. *Acta Tropica*, 121(2), pp.55–70. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22085916> [Accessed November 4, 2012].
- Carlier, Y. et al., 2015. Congenital Chagas disease: an update. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 110(3), pp.363–368. Available at: [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0074-02762015000300363&lng=en&nrm=iso&tlng=en](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0074-02762015000300363&lng=en&nrm=iso&tlng=en).
- Carlier, Y. & Truyens, C., 2015. Congenital Chagas disease as an ecological model of interactions between *Trypanosoma cruzi* parasites, pregnant women, placenta and fetuses. *Acta Tropica*, 151(1), pp.103–115. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.actatropica.2015.07.016>.

- Carter AM, 1999. Regulation of Maternal Placental blood flow. *Trophoblast Research*, 13, pp.271–291.
- Cazzulo, J.J., Stoka, V. & Turk, V., 1997. Cruzipain, the major cysteine proteinase from the protozoan parasite *Trypanosoma cruzi*. *Biological Chemistry*, 378(1), pp.1–10. Available at: <http://www.degruyter.com/view/j/bchm.1997.378.issue-1/bchm.1997.378.1.1/bchm.1997.378.1.1.xml>.
- Cencig, S. et al., 2013. Fertility, Gestation Outcome and Parasite Congenital Transmissibility in Mice Infected with TcI, TcII and TcVI Genotypes of *Trypanosoma cruzi*. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 7(6).
- Centers for Disease Control and Prevention, 2007. Morbidity and Mortality Weekly Report. , 56(7), pp.2002–2006.
- Ceriello, A. et al., 2002. Acute hyperglycemia induces nitrotyrosine formation and apoptosis in perfused heart from rat. *Diabetes*, 51(4), pp.1076–1082.
- Chagas, C., 1909. Nova tripanozomíaze humana: estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi* n. gen., n. sp., agente etiolojico de nova entidade morbida do homem. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 1(2), pp.159–218. Available at: [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0074-02761909000200008&lng=en&nrm=iso&tlng=pt](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0074-02761909000200008&lng=en&nrm=iso&tlng=pt) [Accessed October 22, 2015].
- Clark, I.A. & Rockett, K.A., 1996. Nitric oxide and parasitic disease. *Advances in parasitology*, 37, pp.1–56. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0065308X08602183>.
- Corrales, R.M. et al., 2009. Congenital Chagas disease involves *Trypanosoma cruzi* sub-lineage IId in the northwestern province of Salta, Argentina. *Infection, genetics and evolution : journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases*, 9(2), pp.278–82. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19162237> [Accessed May 17, 2012].
- Coura, J.R., 2007. Chagas disease: what is known and what is needed--a background article. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 102 Suppl (August), pp.113–22. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17992371>.
- Cura, C.I. et al., 2012. *Trypanosoma cruzi* Discrete Typing Units in Chagas disease patients from endemic and non-endemic regions of Argentina. *Parasitology*, 139(04), pp.516–521.
- Demir, R., 1979. Scanning electron-microscopic observations on the surfaces of chorionic villi of young and mature placentas. *Acta Anat.*, 105(2), pp.226–232.
- 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.176–181. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15582515>.
- Díaz-Luján, C. et al., 2012. Placental Infection by Trypanosome Cruzi, the Causal Agent of Congenital Chagas' Disease. In U. S. of A. Zheng, Dr. Jing (University of Wisconsin - Madison, ed. *Recent Advances in Research on the Human Placenta*. InTech, pp. 1–22. Available at: [http://cdn.intechopen.com/pdfs/31276/InTech-Placental\\_infection\\_by\\_trypanosome\\_cruzi\\_the\\_causal\\_agent\\_of\\_congenital\\_chagas\\_disease.pdf](http://cdn.intechopen.com/pdfs/31276/InTech-Placental_infection_by_trypanosome_cruzi_the_causal_agent_of_congenital_chagas_disease.pdf) [Accessed May 9, 2013].
- Díaz-Luján, C. et al., 2012. Differential susceptibility of isolated human trophoblasts to infection by Trypanosoma cruzi. *Placenta*, 33(4), pp.264–270. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.placenta.2012.01.005>.
- Dorn, P.L. et al., 2007. Autochthonous transmission of Trypanosoma cruzi, Louisiana. *Emerging Infectious Diseases*, 13(4), pp.605–607.
- Duschak, V.G. & Couto, A.S., 2009. Cruzipain, the major cysteine protease of Trypanosoma cruzi: a sulfated glycoprotein antigen as relevant candidate for vaccine development and drug target. A review. *Current medicinal chemistry*, 16(24), pp.3174–202. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19689291>.
- Dutra, W.O., Rocha, M.O.C. & Teixeira, M.M., 2005. The clinical immunology of human Chagas disease. *Trends in parasitology*, 21(12), pp.581–7. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16236550> [Accessed March 26, 2013].
- Eis, A.L. et al., 1995. Immunohistochemical localization of endothelial nitric oxide synthase in human villous and extravillous trophoblast populations and expression during syncytiotrophoblast formation in vitro. *Placenta*, 16(2), pp.113–26. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7540756>.
- Ellery, P.M. et al., 2009. Evidence for Transcriptional Activity in the Syncytiotrophoblast of the Human Placenta. *Placenta*, 30(4), pp.329–334. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.placenta.2009.01.002>.
- Fernandez-Aguilar, S. et al., 2005. Las lesiones placentarias en la infección humana por Trypanosoma cruzi. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 38 Suppl 2(S II), pp.84–86.
- Fernández-Villegas, A. et al., 2014. The innate immune response status correlates with a divergent clinical course in congenital Chagas disease of twins born in a non-endemic country. *Acta Tropica*, 140, pp.84–90.

- Fleming, I., 2003. Molecular mechanisms involved in the regulation of the endothelial nitric oxide synthase. *American Journal of Physiology*, 284, pp.R1–R12. Available at: <http://ajpregu.physiology.org/content/284/1/R1.short> [Accessed May 17, 2012].
- Frank, F. et al., 2000. The effect of placental subfractions on *Trypanosoma cruzi*. *Experimental and molecular pathology*, 69(2), pp.144–51. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11001862>.
- Freilij, H. & Altcheh, J., 1995. Congenital Chagas' disease: diagnostic and clinical aspects. *Clinical infectious diseases: an official publication of the Infectious Diseases Society of America*, 21(3), pp.551–5. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8527542>.
- Fretes, R.E. & de Fabro, S.P., 1990. *Trypanosoma cruzi*: modification of alkaline phosphatase activity induced by trypomastigotes in cultured human placental villi. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, 32(6), pp.403–8. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2135485>.
- Fretes, R.E. & De Fabro, S.P., 1995. In vivo and in vitro analysis of lysosomes and acid phosphatase activity in human chagasic placentas. *Experimental and molecular pathology*, 63(3), pp.153–60. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9062549>.
- Fretes, R.E. & Kemmerling, U., 2012. Mechanism of *Trypanosoma cruzi* Placenta Invasion and Infection: The Use of Human Chorionic Villi Explants. *Journal of tropical medicine*, 2012, p.614820. Available at: <http://www.hindawi.com/journals/jtm/2012/614820/> [Accessed June 14, 2012].
- Garcia, A. et al., 2014. Congenital co-infection with different *Trypanosoma cruzi* lineages. *Parasitology International*, 63(1), pp.138–139.
- García, M.M. et al., 2008. Soluble tumor necrosis factor (TNF) receptors (sTNF-R1 and -R2) in pregnant women chronically infected with *Trypanosoma cruzi* and their children. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 78(3), pp.499–503. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18337349>.
- Garvey, E.P. et al., 1994. Purification and characterization of the constitutive nitric oxide synthase from human placenta. *Archives of biochemistry and biophysics*, 311(2), pp.235–41. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7515611>.
- Gea, S. et al., 2006. Cruzipain, a major *Trypanosoma cruzi* cystein protease in the host-parasite interplay. *Inmunología*, 25(4), pp.225–238. Available at: <http://revista.inmunologia.org/Upload/Articles/6/9/698.pdf>.
- Geneser, F., 2000. *Histología*,

- Giordanengo, L. et al., 2002. Cruzipain, a major *Trypanosoma cruzi* antigen, conditions the host immune response in favor of parasite. *European journal of immunology*, 32(4), pp.1003–11. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11920566>.
- Giugliano, D., Ceriello, A. & Paolisso, G., 1996. Oxidative Stress and Diabetic Vascular Complications. *Diabetes Care*, 19(3), pp.257–267.
- Guiñazú, N. et al., 2007. Immunisation with a major *Trypanosoma cruzi* antigen promotes pro-inflammatory cytokines, nitric oxide production and increases TLR2 expression. *International journal for parasitology*, 37(11), pp.1243–54. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17512528>.
- Gürtler, R.E., Segura, E.L. & Cohen, J.E., 2003. Congenital transmission of *Trypanosoma cruzi* infection in Argentina. *Emerging infectious diseases*, 9(1), pp.29–32. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2873757&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Gutierrez, F.R.S. et al., 2009. The effects of nitric oxide on the immune system during *Trypanosoma cruzi* infection. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 104 Suppl (Gilroy 2005), pp.236–45. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19753479>.
- Haider, S. & Knöfler, M., 2009. Human tumour necrosis factor: physiological and pathological roles in placenta and endometrium. *Placenta*, 30(2), pp.111–23. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2974215&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed March 20, 2013].
- Handwerger, S. & Freemark, M., 2000. The roles of placental growth hormone and placental lactogen in the regulation of human fetal growth and development. *Journal of Pediatric Endocrinology and Metabolism*, 13(4), pp.343–356.
- Hermann, E. et al., 2004. Congenital transmission of *Trypanosoma cruzi* is associated with maternal enhanced parasitemia and decreased production of interferon- gamma in response to parasite antigens. *The Journal of infectious diseases*, 189(7), pp.1274–81. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15031797>.
- Higo, H. et al., 1997. Genetic structure of *Trypanosoma cruzi* in Central America and its comparison with South American Strains. *International Journal for Parasitology*, 27(11), pp.1369–1374.
- Hotez, P.J. et al., 2006. Incorporating a rapid-impact package for neglected tropical diseases with programs for HIV/AIDS, tuberculosis, and malaria. *PLoS*

- medicine*, 3(5), p.e102. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16435908>.
- Howard, E.J. et al., 2014. Frequency of the congenital transmission of *Trypanosoma cruzi*: A systematic review and meta-analysis. *BJOG: An International Journal of Obstetrics and Gynaecology*, 121(1), pp.22–33. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23924273>.
- INCOSUR Report, 2001. *Congenital transmission should be included in the Southern Cone Initiative? IX Reunion de la Comisión Intergubernamental del Cono Sur contra la enfermedad de Chagas. Rev Patol Trop 2001; 30: 57.*
- Jackson, M.R., Mayhew, T.M. & Boyd, P.A., 1992. Quantitative description of the elaboration and maturation of villi from 10 weeks of gestation to term. *Placenta*, 13(4), pp.357–370.
- James, S.L. & Hibbs, J.B., 1990. The Role of Nitrogen Oxides as Effector Molecules of Parasite Killing. , 6(9), pp.303–305.
- James, S.L., 1995. Role of nitric oxide in parasitic infections. *Microbiological reviews*, 59(4), pp.533–47. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=239385&tool=pmc-entrez&rendertype=abstract>.
- Kam, E.P.Y. et al., 1999. The role of trophoblast in the physiological change in decidual spiral arteries. *Human Reproduction*, 14(8), pp.2131–2138.
- Kaufmann, P., Huppertz, B. & Frank, H.-G., 1996. The fibrinoids of the human placenta: origin, composition and functional relevance. *Annals of Anatomy - Anatomischer Anzeiger*, 178(6), pp.485–501. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0940960296801026> [Accessed August 7, 2012].
- Kierszenbaum, F., 2007. Mechanisms of pathogenesis in Chagas disease. *Acta Parasitologica*, 52(1), pp.1–12. Available at: <http://www.springerlink.com/index/10.2478/s11686-006-0048-y> [Accessed March 17, 2013].
- Krause, B.J., Hanson, M. a. & Casanello, P., 2011. Role of nitric oxide in placental vascular development and function. *Placenta*.
- Krause, B.J. et al., 2013. Endothelial eNOS/arginase imbalance contributes to vascular dysfunction in IUGR umbilical and placental vessels. *Placenta*, 34(1), pp.20–8. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.placenta.2012.09.015>.
- Kurlak, L.O. et al., 2014. Oxidative stress markers in hypertensive states of pregnancy: Preterm and term disease. *Frontiers in Physiology*, 5 JUL(August),

pp.1–8.

- Laemmli, U.K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227(5259), pp.680–5. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5432063>.
- Liew, F.Y., Cox, F.E.G. & F, C., 1997. Nonspecific Defence Mechanism: the Role of Nitric Oxide. *Immunology Today*, 12(3), pp.17–21.
- Lowenstein, C.J., Dinerman, J.L. & Snyder, S.H., 1994. Nitric oxide: a physiologic messenger. *Annals of internal medicine*, 120(3), pp.227–37. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8273987>.
- Luquetti, A.O. et al., 2015. Congenital transmission of *Trypanosoma cruzi* in central Brazil. A study of 1,211 individuals born to infected mothers. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, 110(3), pp.369–376.
- Lyall, F. et al., 1998. Gene expression of nitric oxide synthase in cultured human term placental trophoblast during in vitro differentiation. *Placenta*, 19(4), pp.253–60. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S014340049890056X> [Accessed June 7, 2012].
- Macedo, a M. & Pena, S.D., 1998. Genetic Variability of *Trypanosoma cruzi*: Implications for the Pathogenesis of Chagas Disease. *Parasitology today (Personal ed.)*, 14(3), pp.119–24. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17040719>.
- Macedo, A.M. et al., 2004. *Trypanosoma cruzi* : Genetic Structure of Populations and Relevance of Genetic Variability to the Pathogenesis of Chagas Disease. , 99(February), pp.1–12.
- Machado, F.S. et al., 2008. Nitric oxide synthase-2 modulates chemokine production by *Trypanosoma cruzi*-infected cardiac myocytes. *Microbes and infection / Institut Pasteur*, 10(14-15), pp.1558–66. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2643379&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed March 14, 2012].
- Manoel-Caetano, F.D.S. & Silva, A.E., 2007. Implications of genetic variability of *Trypanosoma cruzi* for the pathogenesis of Chagas disease. *Cadernos de saúde pública*, 23(10), pp.2263–74. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17891288>.
- Markvardsen, P. et al., 1995. A polymerase chain reaction-based method for the semiquantitative study of interleukin-8 mRNA in human basophil leukocytes. *Scandinavian journal of clinical and laboratory investigation*, 55(6), pp.487–93.

- Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8571078>.
- Martinez, A. et al., 2014. Structural and molecular basis of the peroxynitrite-mediated nitration and inactivation of trypanosoma cruzi iron-superoxide dismutases (fe-sods) a and b: Disparate susceptibilities due to the repair of tyr35 radical by cys83 in fe-sodb through intramole. *Journal of Biological Chemistry*, 289(18), pp.12760–12778.
- Martins, G. a et al., 1998. Nitric oxide-induced apoptotic cell death in the acute phase of Trypanosoma cruzi infection in mice. *Immunology letters*, 63(2), pp.113–20. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9761373>.
- Martins-Melo, F.R. et al., 2014. Systematic review: Prevalence of Chagas disease in pregnant women and congenital transmission of Trypanosoma cruzi in Brazil: A systematic review and meta-analysis. *Tropical Medicine and International Health*, 19(8), pp.943–957.
- Mayhew, T.M. et al., 1999. Proliferation, differentiation and apoptosis in villous trophoblast at 13-41 weeks of gestation (including observations on annulate lamellae and nuclear pore complexes). *Placenta*, 20(5-6), pp.407–422.
- McParland, P. & Pearce, J.M., 1988. Review article: Doppler blood flow in pregnancy. *Placenta*, 9(4), pp.427–450.
- Mejía, A.M. & Triana, O., 2005. [Genetic variability of Trypanosoma cruzi in blood and organs of infected mice determined by LSSP-PCR]. *Biomédica: revista del Instituto Nacional de Salud*, 25(1), pp.76–86. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15962904>.
- Mjihdi, A. et al., 2002. Acute Trypanosoma cruzi infection in mouse induces infertility or placental parasite invasion and ischemic necrosis associated with massive fetal loss. *The American journal of pathology*, 161(2), pp.673–80. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1850751&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Mjihdi, A. et al., 2004. Systemic and placental productions of tumor necrosis factor contribute to induce fetal mortality in mice acutely infected with Trypanosoma cruzi. *Experimental parasitology*, 107(1-2), pp.58–64. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15208038> [Accessed May 17, 2012].
- Moncada, S. & Higgs, A., 1992. The L-Arginine-Nitric Oxide pathway. *The New England Journal of Medicine*, 329(27), pp.2002–2012.
- Moore, K.L., Persaud, T.V.N. & Torchia, M.G., 2013. *Embriología Clínica*,
- 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.
- Morris, J.M. et al., 1998. Circulating markers of oxidative stress are raised in normal pregnancy and pre-eclampsia. *British journal of obstetrics and gynaecology*, 105(11), pp.1195–1199.
- Mottram, J.C., Brooks, D.R. & Coombs, G.H., 1998. Roles of cysteine proteinases of trypanosomes and Leishmania in host-parasite interactions. *Current Opinion in Microbiology*, 1(4), pp.455–460. Available at: ISI:000075765300014.
- Moya, P.R., Villagra, L. & Risco, J., 1979. [Congenital Chagas disease: anatomopathological findings in the placenta and umbilical cord]. *Revista de la Facultad de Ciencias Médicas (Córdoba, Argentina)*, 37(1-4), pp.21–7. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/122217>.
- Moya, P. et al., 1989. Neonatal Chagas disease: laboratory diagnosis during the first year of life. *Medicina*, 49(6), pp.595–9.
- Moya, P. & Moretti, E., 1997. Doença de Chagas congênita. In J. Pinto Dias & J. Rodrigues Coura, eds. *Clínica e terapêutica da doença de Chagas: uma abordagem prática para o clínico geral*. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz, pp. 383–410.
- Myatt, L. et al., 1996. Nitrotyrosine residues in placenta. Evidence of peroxynitrite formation and action. *Hypertension*, 28(3), pp.488–93. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8794838>.
- Myatt, L., 2010. Review: Reactive oxygen and nitrogen species and functional adaptation of the placenta. *Placenta*, 31, pp.S66–S69. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2832707&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed July 16, 2012].
- Naviliat, M. et al., 2005. Protein 3-nitrotyrosine formation during Trypanosoma cruzi infection in mice. *Brazilian journal of medical and biological research*, 38(12), pp.1825–34. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16302097>.
- Neira, I., Ferreira, A.T. & Yoshida, N., 2002. Activation of distinct signal transduction pathways in Trypanosoma cruzi isolates with differential capacity to invade host cells. *International Journal for Parasitology*, 32(4), pp.405–414.
- Nelson, D.M. et al., 1990. Trophoblast interaction with fibrin matrix. Epithelialization of perivillous fibrin deposits as a mechanism for villous repair in the human placenta. *The American journal of pathology*, 136(4), pp.855–65. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1877640&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Petray, P. et al., 1994. Release of nitric oxide during the experimental infection with

- Trypanosoma cruzi. *Parasite immunology*, 16(4), pp.193–199. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7520151>.
- Pijnenborg, R. et al., 1981. Review article: trophoblast invasion and the establishment of haemochorial placentation in man and laboratory animals. *Placenta*, 2(1), pp.71–91.
- Pohanka, M., 2013. Role of oxidative stress in infectious diseases. A review. *Folia Microbiologica*, 58(6), pp.503–513.
- Poston, L. & Rajmakers, M.T.M., 2004. Trophoblast oxidative stress, antioxidants and pregnancy outcome--a review. *Placenta*, 25 Suppl A, pp.S72–8. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15033311> [Accessed February 29, 2012].
- Radi, R., 2004. Nitric oxide, oxidants, and protein tyrosine nitration. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(12), pp.4003–8. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=384685&tool=pmc-entrez&rendertype=abstract>.
- Redman, C.W. & Sargent, I.L., 2000. Placental debris, oxidative stress and pre-eclampsia. *Placenta*, 21(7), pp.597–602. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10985960> [Accessed March 16, 2012].
- Rees, D.D. et al., 1990. Characterization of three inhibitors of endothelial nitric oxide synthase in vitro and in vivo. *British journal of pharmacology*, 101(3), pp.746–52. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1706208>.
- Riera, C. et al., 2006. Congenital transmission of Trypanosoma cruzi in Europe (Spain): a case report. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 75(6), pp.1078–81. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17172369>.
- Rivero, A., 2006. Nitric oxide: an antiparasitic molecule of invertebrates. *Trends in parasitology*, 22(5), pp.219–25. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16545612>.
- Ross, M.H., 2008. *Histología, texto y atlas color con Biología Celular y Molecular*,
- Rossmann, W.G. et al., 1999. Expression and functional analysis of endothelial nitric oxide synthase (eNOS) in human placenta. *Molecular human reproduction*, 5(5), pp.487–94. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10338373>.
- Ruiz, R.C. et al., 1998. Infectivity of Trypanosoma cruzi strains is associated with differential expression of surface glycoproteins with differential Ca<sup>2+</sup>

- signalling activity. *The Biochemical journal*, 330 ( Pt 1, pp.505–11. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1219166&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Sadler, T., 2016. *Langman - Embriología Medica*, Lippincott.
- Salas, N. a et al., 2007. Risk factors and consequences of congenital Chagas disease in Yacuiba, south Bolivia. *Tropical Medicine and International Health*, 12(12), pp.1498–1505. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18076558> [Accessed April 9, 2012].
- Saleme, A.E. et al., 1971. [Congenital Chagas-Mazza disease in Tucuman. Concerning 8 doubtful and 2 probable cases diagnosed in the Dept. of Pediatrics of the S. M. Institute of Maternity during the period October 1967--September 1968]. *Archivos argentinos de pediatría*, 69(4), pp.162–9.
- Sartori, M.J. et al., 1997. Alkaline phosphatase activity in plasma of pregnant chagasic patients. *Revista de la Facultad de Ciencias Médicas (Córdoba, Argentina)*, 55(1-2), pp.5–8. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10436610>.
- Sartori, M.J. et al., 2002. Role of placental alkaline phosphatase in the interaction between human placental trophoblast and *Trypanosoma cruzi*. *Experimental and molecular pathology*, 72(1), pp.84–90. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11784127> [Accessed May 18, 2012].
- Scapellato, P.G., Bottaro, E.G. & Rodríguez-Brieschke, M.T., 2009. Mother-child transmission of Chagas disease: could coinfection with human immunodeficiency virus increase the risk? *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 42(2), pp.107–9. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19448923>.
- Schijman, A.G., 2007. Congenital Chagas Disease. In A. Zuckerman & I. Mushahwar, eds. *Congenital and Other Related Infectious Disease of the Newborn*. pp. 223–258. Available at: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/cbdv.200490137/abstract> [Accessed May 10, 2013].
- Schmuñis, G.A. et al., 2000. Transfusion-transmitted infectious diseases in Argentina, 1995 through 1997. *Transfusion*, 40(9), pp.1048–53. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10988304>.
- Schneider, D. et al., 2015. Oxidative stress as common trait of endothelial dysfunction in chorionic arteries from fetuses with IUGR and LGA. *Placenta*, 36(5), pp.552–558. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25747728>.

- Sharma, L., Kaur, J. & Shukla, G., 2012. Role of oxidative stress and apoptosis in the placental pathology of Plasmodium berghei infected mice. *PLoS one*, 7(3), p.e32694. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3291651&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed October 4, 2012].
- Solana, M.E. et al., 2002. Trypanosoma cruzi: effect of parasite subpopulation on murine pregnancy outcome. *The Journal of parasitology*, 88(1), pp.102–6. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12053948>.
- Soriano-Arandes, A. et al., 2016. Control and Management of Congenital Chagas Disease in Europe and Other Non-Endemic Countries: Current Policies and Practices. *Tropical medicine & international health: TM & IH*, 21(5), pp.590–596.
- Sosa-Estani, S., 2005. [Congenital transmission of Trypanosoma cruzi infection in Argentina]. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 38 Suppl 2, pp.29–32. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16482810>.
- De Souza, W., 2002. Basic cell biology of Trypanosoma cruzi. *Current pharmaceutical design*, 8(4), pp.269–85. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11860366>.
- Stecconi-silva, R.B., Andreoli, W.K. & Mortara, R.A., 2003. Parameters Affecting Cellular Invasion and Escape from the Parasitophorous Vacuole by Different Infective Forms of Trypanosoma cruzi. , 98(October), pp.953–958.
- Sturm, N.R. et al., 2003. Evidence for multiple hybrid groups in Trypanosoma cruzi. *International Journal for Parasitology*, 33(3), pp.269–279.
- Sugino, N. et al., 2007. Oxidative Stress and Pregnancy Outcome: A Workshop Report. *Placenta*, 28, pp.S48–S50. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0143400407000173> [Accessed May 5, 2012].
- T.W. Sadler, P.D., 2010. *Langman - Embriología médica*,
- Tanowitz, H.B. et al., 1992. Chagas ' Disease. *Clinical Microbiology Reviews*, 5(4), pp.400–419.
- Tarleton, R.L. et al., 2007. The challenges of Chagas disease - Grim outlook or glimmer of hope? *PLoS Medicine*, 4(12), pp.1852–1857. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2222930&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed March 9, 2013].
- Tarrade, A. et al., 2014. Analysis of placental vascularization in a pharmacological rabbit model of IUGR induced by L-NAME, a nitric oxide synthase inhibitor.

- Placenta*, 35(4), pp.254–9. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.placenta.2014.01.013>.
- Telleria, J. & Tibayrenc, M. eds., 2010. *American Trypanosomiasis: Chagas Disease One Hundred Years of Research*, Elsevier.
- Thaete, L.G. et al., 2005. Endothelin and the regulation of uteroplacental perfusion in nitric oxide synthase inhibition-induced fetal growth restriction. *Placenta*, 26(2-3), pp.242–50. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15708126> [Accessed May 18, 2012].
- Tibayrenc, M. & Ayala, F.J., 1987. [High correlation between isoenzyme classification and kinetoplast DNA variability in *Trypanosoma cruzi*]. *Comptes rendus de l'Académie des sciences. Série III, Sciences de la vie*, 304(4), pp.89–92. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3030516>.
- Toescu, V. et al., 2002. Oxidative stress and normal pregnancy. *Clinical Endocrinology*, 57(5), pp.609–613. Available at: <http://doi.wiley.com/10.1046/j.1365-2265.2002.01638.x>.
- Torrice, F. et al., 2004. Maternal *Trypanosoma cruzi* infection, pregnancy outcome, morbidity, and mortality of congenitally infected and non-infected newborns in Bolivia. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 70(2), pp.201–9. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14993634>.
- Torrice, F. et al., 2006. Are maternal re-infections with *Trypanosoma cruzi* associated with higher morbidity and mortality of congenital Chagas disease? *Tropical medicine & international health: TM & IH*, 11(5), pp.628–35. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16640615> [Accessed March 6, 2012].
- 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. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19339029> [Accessed June 7, 2012].
- Truyens, C., Mjihdi, K., et al., 2005. Efecto infección aguda y crónicas por *Trypanosoma cruzi* en la gestación de los ratones. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 38(II), pp.68–72.
- Truyens, C., Hermann, E., et al., 2005. Respuesta inmune en neonatos no infectados nacidos de madres infectadas por *Trypanosoma cruzi*. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*.
- U.S. Food and Drug Administration, 2006. FDA Approves First Test to Screen Blood

- Donors for Chagas Disease. *FDA News*. Available at: <http://www.fda.gov/bbs/topics/NEWS/2006/NEW01524.html>.
- Vaughn, M.W., Kuo, L. & Liao, J.C., 1998. Effective diffusion distance of nitric oxide in the microcirculation. *The American journal of physiology*, 274, pp.H1705–H1714.
- Vekemans, J. et al., 2000. Maternal *Trypanosoma cruzi* infection upregulates capacity of uninfected neonate cells to produce pro- and anti-inflammatory cytokines. *Infection and immunity*, 68(9), pp.5430–4. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=101811&tool=pmc-entrez&rendertype=abstract>.
- Venturini, G. et al., 2000. Nitric oxide inhibits cruzipain, the major papain-like cysteine proteinase from *Trypanosoma cruzi*. *Biochemical and biophysical research communications*, 270(2), pp.437–41. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10753643> [Accessed March 9, 2012].
- Vespa, G.N.R., Cunha, F.Q. & Silva, J.S., 1994. Nitric oxide is involved in control of *Trypanosoma cruzi*-induced parasitemia and directly kills the parasite in vitro. *Infection and Immunity*, 62(11), pp.5177–5182.
- Vignini, A. et al., 2016. Placental expression of endothelial and inducible nitric oxide synthase and NO metabolism in gestational hypertension: a case-control study. *The journal of maternal-fetal & neonatal medicine: the official journal of the European Association of Perinatal Medicine, the Federation of Asia and Oceania Perinatal Societies, the International Society of Perinatal Obstetricians*, 29(4), pp.576–81. Available at: <http://informahealthcare.com/doi/abs/10.3109/14767058.2015.1011615>.
- Villalta, F. et al., 1998. The cysteine-cysteine family of chemokines RANTES, MIP-1alpha, and MIP-1beta induce trypanocidal activity in human macrophages via nitric oxide. *Infection and immunity*, 66(10), pp.4690–5. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9746565>.
- Vincendeau, P. et al., 2003. Arginases in parasitic diseases. *Trends in parasitology*, 19(1), pp.9–12. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12488215>.
- Virreira, M. et al., 2006. Congenital Chagas disease in Bolivia is not associated with DNA polymorphism of *Trypanosoma cruzi*. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 75(5), pp.871–9. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17123980>.
- Virreira, M. et al., 2007. Comparison of *Trypanosoma cruzi* lineages and levels of parasitic DNA in infected mothers and their newborns. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 77(1), pp.102–6. Available at:

- <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17620638>.
- Wang, X., Wang, J. & Trudinger, B., 2003. Gene expression of nitric oxide synthase by human umbilical vein endothelial cells: the effect of fetal plasma from pregnancy with umbilical placental vascular disease. *BJOG: an international journal of obstetrics and gynaecology*, 110(1), pp.53–8. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12504936>.
- Wang, Y. & Walsh, S.W., 2001. Increased superoxide generation is associated with decreased superoxide dismutase activity and mRNA expression in placental trophoblast cells in pre-eclampsia. *Placenta*, 22(2-3), pp.206–212.
- WHO, 2005. *Tropical disease research: progress 2003-2004 Seventeenth Programme Report of the UNICEF/UNDP/World Bank/WHO Special Programme for Research & Training in Tropical Diseases*,
- WHO, Guhl, F. & Lazdins-Helds, J., 2007. *Reporte sobre la enfermedad de Chagas*, Available at: <http://scholar.google.com/scholar?hl=en&btnG=Search&q=intitle:Reporte+sobre+la+enfermedad+de+Chagas#0>.
- WHO, 2010. First WHO report on neglected tropical diseases: working to overcome the global impact of neglected tropical diseases. *World Health Organization*, pp.1–184.
- WHO, 2012. Research priorities for Chagas disease, human African trypanosomiasis and leishmaniasis. *World Health Organization Technical Report Series*, (975), pp.v–xii, 1–100. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23484340>.
- WHO, 2015. *Chagas disease (American trypanosomiasis)*, Available at: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs340/en/>.
- World Health Organization, 2015. Chagas disease in Latin America: an epidemiological update based on 2010 estimates. *Weekly Epidemiological Record*, (6), pp.33–44.
- Wilson, L.S., Strosberg, A.M. & Barrio, K., 2005. Cost-effectiveness of Chagas disease interventions in latin america and the Caribbean: Markov models. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 73(5), pp.901–10. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16282301>.
- Wisdom, S.J. et al., 1991. Antioxidant systems in normal pregnancy and in pregnancy-induced hypertension. *American journal of obstetrics and gynecology*, 165(6 Pt 1), pp.1701–4. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1750463>.
- Xiang, W. et al., 2005. Expression of endothelial nitric oxide synthase traffic inducer

- in the placentas of women with pre-eclampsia. *International journal of gynaecology and obstetrics: the official organ of the International Federation of Gynaecology and Obstetrics*, 89(2), pp.103–7. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15847871>.
- Yeo, M. et al., 2005. Origins of Chagas disease: Didelphis species are natural hosts of Trypanosoma cruzi I and armadillos hosts of Trypanosoma cruzi II, including hybrids. *International Journal for Parasitology*, 35(2), pp.225–233. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15710443> [Accessed April 3, 2013].
- Yu, J. et al., 2012. Effects of SAC on oxidative stress and NO availability in placenta: Potential benefits to preeclampsia. *Placenta*, 33(6), pp.487–494.
- Zingales, B. et al., 1998. Molecular epidemiology of American trypanosomiasis in Brazil based on dimorphisms of rRNA and mini-exon gene sequences. *International Journal for Parasitology*, 28(1), pp.105–112.
- Zingales, B. et al., 2009. A new consensus for Trypanosoma cruzi intraspecific nomenclature: second revision meeting recommends TcI to TcVI. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 104(7), pp.1051–4. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20027478>.
- Zusterzeel, P.L.M. et al., 2001. Protein carbonyls in decidua and placenta of pre-eclamptic women as markers for oxidative stress. *Placenta*, 22(2-3), pp.213–219.