

Infección por *Trypanosoma cruzi* en modelos *in vitro* de placentas humanas: participación de moléculas del sistema inmunológico

Tesis para optar al título de Doctor en Ciencias Químicas

Lic. en Biotecnología
EVANGELINA BENIZIO

Director: Dr. Ricardo Fretes

Instituto de Biología Celular
INICSA-CONICET
Facultad de Ciencias Médicas
UNIVERSIDAD NACIONAL DE CÓRDOBA
Córdoba, Argentina - Año 2020



Director de Tesis

Dr. Ricardo Fretes

Comisión de Tesis

Dra. Susana Genti-Raimondi
Dra. Adriana Gruppi
Dra. María Rosa Mazzieri

Evaluador externo

Dr. Ricardo Corral

Este trabajo de tesis fue realizado gracias al apoyo económico del Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) con financiamiento de Beca de finalización doctoral, la Secretaría de Ciencia y Tecnología de la Universidad Nacional de Córdoba (SECyT- UNC), el Fondo para la Investigación Científica y Tecnológica (FONCYT-PICT), que incluye financiamiento de Beca asociada a PICT 2013-2017 y el Instituto de Investigaciones de la Universidad Nacional de Villa María (UNVM).

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.

En primer lugar quiero agradecer al sistema de educación pública y gratuita, en todos sus niveles, que me brindó una excelente formación académica. A FONCYT y CONICET por permitirme obtener una beca para poder dedicarme exclusivamente a la investigación y realizar la tesis.

Quiero agradecer a mi director Dr. Ricardo Fretes, por guiarme en éste camino.

A las autoridades del Instituto de Biología Celular y del INICSA, por permitirme realizar mi trabajo de tesis en sus instalaciones.

A mi comisión de tesis, Dra. Susana Genti, Dra. Adriana Gruppi y Dra. María Rosa Mazzieri que hicieron aportes invalorable en este trabajo, haciendo sugerencias, críticas constructivas, donando generosamente reactivos y haciendo cada reunión de avances amena y sobre todo productiva. Gracias también al Dr. Ricardo Corral por la lectura y evaluación de esta tesis doctoral.

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 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 Sonia por confirmar en mí como docente de la Cátedra de Embriología y Genética de la UNVM. A mis compañeras, por todo el apoyo y colaboración, sobre todo en esta última etapa.

A mis amigas del laboratorio, 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 los amigos que traía y los que me regalo Córdoba, por las inmensas alegrías que brinda la vida más allá de la ciencia.

A mi hermano, por enseñarme que existen otras formas de vivir la vida, que hay que disfrutar de cada momento y por regalarme a mi hermoso sobrino.

A mi mamá, por el esfuerzo que hizo para que pueda estudiar, por apoyarme cada vez que me daba por vencida, por enseñarme que nada es tan difícil como parece y que todo se puede lograr; por su inmenso cariño. Por ser mi ejemplo de mujer.

Agradezco a todos por cada granito de arena aportado a mi formación y a mi crecimiento personal.

ABREVIATURAS	1
RESUMEN	5
ABSTRACT	8
INTRODUCCIÓN	10
ENFERMEDAD DE CHAGAS	10
Generalidades.....	10
Agente causal: <i>Trypanosoma cruzi</i>	11
Vías de transmisión.....	15
Curso clínico de la enfermedad.....	16
Tratamiento.....	17
TRANSMISIÓN CONGÉNITA	18
Epidemiología.....	18
Vías de transmisión congénita.....	19
Factores que influyen en la transmisión congénita.....	20
Diagnóstico y consecuencias clínicas de la transmisión congénita.....	22
MECANISMO DE INFECCIÓN Y SUPERVIVENCIA DEL <i>T. cruzi</i> EN LA CÉLULA DEL HOSPEDADOR	24
Proceso de invasión y replicación de <i>T. cruzi</i> en células humanas.....	24
Evasión de la respuesta inmune y supervivencia del <i>T. cruzi</i> en células humanas.....	25
PLACENTA HUMANA	28
Características estructurales.....	28
Velloidades coriónicas.....	29
Barrera placentaria.....	30
RESPUESTA INMUNE PLACENTARIA	32
Generalidades.....	32
Infección placentaria por patógenos.....	34
Infección placentaria por <i>Trypanosoma cruzi</i>	35
Factor de transcripción NF-kB en la infección de explantos placentarios por <i>T. cruzi</i>	36
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	39
MATERIALES Y MÉTODOS	41

Tripomastigotes	41
Placentas	41
Línea celular BeWo	42
Medios de cultivo	42
Sistema de cultivo	42
Explantos placentarios.....	42
Línea celular BeWo.....	45
Cuantificación parasitaria	46
Recuento de parásitos móviles en medio de cultivo.....	46
Recuento de la carga parasitaria en explantos placentarios.....	46
Recuento de la carga parasitaria intracelular en células BeWo.....	49
Procesamiento histológico	49
Inmunohistoquímica.....	50
Cuantificación de la sincicialización por inmunofluorescencia en células BeWo	51
Determinaciones analíticas	52
Determinación de NO	52
Determinación de gonadotropina coriónica humana beta (β -hCG)	52
Cuantificación de urea	53
Producción de las especies reactivas del oxígeno (ROS).....	53
Determinación de la viabilidad por MTT.....	54
Análisis proteico	54
Cuantificación de la producción de TNF α , MIF, IL-1 β , IFN γ , IL-4, IL-6 e IL-10	54
Zimografía	55
Análisis estadístico	56
RESULTADOS	58
Moléculas efectoras de la respuesta inmune durante el proceso de invasión del <i>T. cruzi</i> en el tejido placentario y la línea celular BeWo derivada de trofoblasto	58
Análisis de la invasión del <i>T. cruzi</i> en el tejido placentario.....	58

Cuantificación de MIF, MMP-9 e IL-6 en el tejido placentario durante la infección por <i>T. cruzi</i>	59
Sincicialización de la línea celular BeWo.....	64
Análisis de la invasión parasitaria en la línea celular BeWo	66
Determinación de NO, ROS e IL-6 en la línea celular BeWo infectadas por <i>T. cruzi</i>	67
Sobrevida del parásito en medios condicionados provenientes de cultivos de células BeWo.....	70
Determinación de citoquinas y óxido nítrico durante los procesos de invasión y multiplicación del <i>T. cruzi</i> en el tejido placentario y la línea celular BeWo derivada de trofoblasto	71
Producción de citoquinas en el tejido placentario durante la infección por <i>T. cruzi</i>	71
Producción de óxido nítrico en el tejido placentario durante la infección por <i>T. cruzi</i>	76
Infección parasitaria en tejido placentario.....	77
Producción de citoquinas en la línea celular BeWo durante la infección por <i>T. cruzi</i>	79
Producción de óxido nítrico en la línea celular BeWo durante la infección por <i>T. cruzi</i>	85
Infección parasitaria en la línea celular BeWo.....	87
Cuantificación de la infección parasitaria en la línea celular BeWo	90
Efecto del tratamiento con IFNγ en la infección del tejido placentario por <i>T. cruzi</i>	92
Controles de viabilidad parasitaria y de tejido.....	93
Infección con <i>T. cruzi</i> en tejido placentario tratado con IFN γ	93
Perfil de citoquinas frente al tratamiento y la infección de <i>T. cruzi</i>	95
Metabolitos mediadores de la infección con <i>T. cruzi</i> frente al tratamiento con IFN γ	98
Efecto de la regulación de la actividad del factor de transcripción NF-κB en la infección del tejido placentario por <i>T. cruzi</i>.....	100
Controles de viabilidad parasitaria y de tejido.....	101
Infección con <i>T. cruzi</i> en tejido placentario tratado con SULF y NAC.....	102
Perfil de citoquinas frente al tratamiento con SULF o NAC y la infección de <i>T. cruzi</i>	104
DISCUSIÓN.....	111

CONCLUSIONES	125
BIBLIOGRAFÍA	128
ANEXOS	149

ADN	Ácido desoxirribonucleico
β-hCG	Gonadotrofina Coriónica humana beta
BeWo	Línea celular derivada de coriocarcinoma
BeWo ST	Células BeWo tratadas con forskolina multinucleadas similares a sincitiotrofoblasto
CCL4	CC-quimiocina ligando 4
CDC	Centros para el Control y la prevención de Enfermedades de Estados Unidos de América
MgCl₂	Cloruro de Magnesio
Ct	Ciclo crítico
CTB	Citotrofoblasto
CXCL1	Ligando de quimiocina CX 1
Cz	Cruzipaína
DAB	DiAminoBencidina
DAMP	Patrones moleculares asociados a muerte
DC	Células dendríticas
DMEM	Dulbecco modified Eagles minimal essential medium (medio de cultivo Eagles modificado Dulbecco)
DMSO	Dimetilsulfóxido
DO	Densidad Óptica
DTU	Unidad Discreta de Tipificación
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
ELISA	Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay (Enzimoimmunoensayo)
FDA	Administración de Alimentos y Medicamentos de EEUU
Fig.	Figura
FsK	Forskolina
GADPH	Gliceraldehído Fosfato Deshidrogenasa
GIPL	Glicoinositolfosfolípidos
GM-CSF	Granulocitos– factor estimulante de colonias de macrófagos
h	horas
Ham's F-12	Ham's F-12 Nutrient Mixture (medio de cultivo Ham's F-12)
H₂O	Agua
H₂O₂	Peróxido de Hidrógeno
HRP	Horseradish peroxidase (peroxidasa de rábano)
IFN_γ	Interferón gama
IκBs	Inhibidores de NF-κB
IKK	IκB quinasa
IL-1β	Interleuquina 1β
IL-4	Interleuquina 4
IL-6	Interleuquina 6
IL-8	Interleuquina 8
IL-10	Interleuquina 10
IL-12	Interleuquina 12
IL-15	Interleuquina 15
IHC	Inmunohistoquímica
JEG3	Línea celular derivada de coriocarcinoma humano
kDa	Kilodalton
L	Litros

LIF	Factor inhibidor de leucemia
LPS	Lipopolisacárido
mg	miligramos
MIF	Factor inhibidor de la migración de macrófagos
min	Minutos
mL	Mililitros
MMP-9	Metaloproteinasa 9
MMP-2	Metaloproteinasa 2
NAC	N-acetilcisteína
NaNO₂	Nitrito de Sodio
NED	Naftiletilendiamina
NF-κB	Factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas
NK	Célula NK (del inglés Natural Killer)
NLR	Receptores tipo NOD
NO	Óxido Nítrico
NOS	Óxido Nítrico Sintasa
NOSe	Óxido Nítrico Sintasa endotelial
NOSi	Óxido Nítrico Sintasa inducible
OMS (WHO)	World Health Organization (Organización Mundial de la Salud)
OXT	Oxitocina
OXTR	Receptor de oxitocina
PAGE	PolyAcrylamide Gel Electrophoresis (electroforesis en gel de poliacrilamida)
PAMP	Patrones moleculares asociados a patógenos
PAHO	Organización Panamericana de la Salud
PBS	Buffer fosfato salino
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
pg	Picogramos
PGE2	Prostaglandina E2
PKD (buffer)	Proteinasa K buffer
p/v	Peso/volumen
ROS	Especies reactivas de oxígeno
rpm	Revoluciones por minuto
RPMI 1640	Medio de cultivo comercial (creado por Moore en 1966, en el Roswell Park Memorial Institute)
s	segundos
SBF	Suero Bovino Fetal
SDS	Dodecil Sulfato Sódico
STB	Sincitiotrofoblasto
SULF	Sulfasalazina
<i>T. cruzi</i>	<i>Trypanosoma cruzi</i>
TAE (buffer)	Buffer Tris, acetato y EDTA
TBS (buffer)	Buffer Salino de Tris
TGFβ	Factor de Crecimiento Transformante β
TH1	Respuesta inmune mediada por células T helper 1
TH2	Respuesta inmune mediada por células T helper 2
TH17	Respuesta inmune mediada por linfocito T CD4+ IL-17+

TLB (buffer)	Buffer de Lisis Tris
TLR	Receptores tipo Toll
TNFα	Factor de Necrosis Tumoral alfa
Treg	Células T reguladoras
Tris-HCl	Buffer Tris – Ácido Clorhídrico
v/v	Volumen/volume
qPCR	Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real cuantitativa
μL	Microlitros
μm	Micrómetros

RESUMEN



La enfermedad de Chagas es causada por el protozoo parásito *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*). Alrededor de 9.000 bebés infectados nacen de madres infectadas con *T. cruzi* cada año, con una tasa de transmisión de madre a hijo de entre un 1 al 12%. Para que ocurra la infección congénita el *T. cruzi* debe atravesar la barrera placentaria, compuesta por capas de tejidos que conforman las vellosidades coriónicas que separan la circulación materna de la fetal. El objetivo de esta tesis doctoral fue establecer la contribución de moléculas mediadoras y efectoras del sistema inmune producidas por la placenta en el control de la infección por *T. cruzi*.

Para desarrollar nuestro objetivo se empleó un modelo experimental de infección de explantos de placentas humanas normales a término y células BeWo tratadas (BeWo ST) o no con forskolina (BeWo). Los explantos y las células se infectaron con tripomastigotes de *T. cruzi*, cepa Tulahuen y se analizaron a diferentes tiempos de cultivo. Además, se evaluó el efecto de la citoquina pro-inflamatoria IFN γ sobre los explantos placentarios infectados, los mismos se trataron previo y durante la infección *in vitro*. También, se determinó el efecto del bloqueo del perfil pro-inflamatorio sobre la infección de los explantos mediante el empleo de inhibidores de la actividad del NF-kB (SULF o NAC) previo y durante la infección.

Se demostró que *T. cruzi* tiene la capacidad de ingresar al tejido placentario, generando un aumento en la activación de MMP-9 y en la expresión de MIF, un regulador de MMP-9. Se observó que las células BeWo ST se infectaron significativamente menos que las células BeWo, debido a que las primeras producen significativamente más moléculas deletéreas para el parásito como NO y ROS, que las BeWo. El análisis de las cinéticas de invasión y replicación parasitaria indicó que tanto los explantos como las células BeWo fueron capaces de infectarse con el *T. cruzi*, pasando por procesos de invasión de la forma tripomastigotes, formación de nidos de amastigotes y liberación al sobrenadante de cultivo de las formas infectivas. Las células BeWo secretaron de un modo continuo TNF α e IL-1 β durante la invasión y la replicación del *T. cruzi*. Al comienzo de la replicación, cuando ocurre un aumento del número de amastigotes en el estroma placentario, se originó una respuesta pro-inflamatoria significativa en los explantos placentarios mediada por NO, TNF α , IFN γ , IL-1 β e IL-10 a las 48-72 h post-infección. Se observó que dentro de la barrera placentaria, el sincitiotrofoblasto y algunas células estromales, son las estructuras que participan en la secreción de estos mediadores inmunológicos.

El tratamiento de los explantos con IFN γ , produjo un aumento de la producción de TNF α independientemente de que los mismos estén o no infectados con *T. cruzi*.

La carga parasitaria se mantuvo en niveles similares a la de los explantos sin tratar con IFN γ . Los niveles de IL-10 incrementaron en el sobrenadante de cultivo, durante los procesos replicativos del parásito. Es posible que el incremento en la expresión de IL-10 pudiera favorecer un mecanismo de evasión por parte del parásito mediado por la vía de las arginasas ya que se observó, en los explantos tratados con IFN γ e infectados, una disminución de NO y aumento de urea, acompañando el incremento de IL-10. Por el contrario el bloqueo de la vía de NF-kB produjo una disminución de TNF α , IL-1 β e IL-10 durante la invasión y multiplicación parasitaria, y favoreció el aumento en la carga parasitaria.

Este trabajo de tesis permite concluir que en la infección placentaria por *T. cruzi* participan varios componentes de la barrera placentaria y ésta responde mediante la secreción de MIF, TNF α , IL-1 β , IFN γ , NO y ROS; y activación de MMP-9 limitando la infección parasitaria.

ABSTRACT



Chagas disease is caused by the protozoan parasite *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*). An estimated 9,000 babies are infected with *T. cruzi* by congenital transmission every year, with a mother-to-child transmission rate of 1 to 12%. For congenital transmission to occur, *T. cruzi* must cross the placental barrier, which is constituted by different layer that form the chorionic villi, to separate maternal and fetal circulation. The aim of this thesis was to establish the contribution of mediator and effector molecules of the immune system secreted by the placenta to control infection by *T. cruzi*.

We used two different models of infection. An experimental model of human placental explants and another with a BeWo cells line (with or without forskolin) infected with *T. cruzi* (Tulahuen strain) trypomastigotes or without parasites at different times of culture. We assess the expression of pro-inflammatory cytokines by the interaction between the tissues or cell with the parasite. Second, we assess the effect of the stimulation of treatment with IFN γ , and last the effect of NF-kB activation inhibitors (SULF or NAC) on the pro-inflammatory profile before and during infection.

We showed invasion and replication of parasite in BeWo cells and in placental explants at different times of culture. Forskolin-treated BeWo cells (BeWo ST) showed significantly less infection than not forskolin-treated BeWo cells (BeWo). NO and ROS production in supernatant increased in BeWo ST infected or not infected with *T. cruzi*. TNF α and IL-1 β were secreted during invasion and replication process in BeWo cells with or without forskolin. MMP-9 activity and MIF expression increased during invasion process of placental explants. We showed an inflammatory response at 48 - 72 h post-infection of NO, TNF α , IFN γ , IL-1 β and IL-10 when increased the number of amastigotes during replication process in placental explants. Syncytiotrophoblast and stromal cells secreted cytokines during invasion and replication process in placental explants. TNF α , IL-10 and urea increased in placental explants treatment with IFN γ . NO decreased and parasite load were not modified treatment with IFN γ in placenta explants. These results suggest that the increase of IL-10 and urea could be an evasion mechanism of the parasite mediated arginase pathway. TNF α , IL-1 β and IL-10 decreased in treatment of inhibition NF-kB pathway during invasion and replication process. This inhibition increased the parasite load in placental explants.

This data suggest that structures of human placental barrier participate in the invasion and replication process of placental infection by *T. cruzi*. Mediator and effector molecules like MIF, TNF α , IL-1 β , IFN γ , NO, ROS and MMP-9 activity could limit of the infection of human placenta.

INTRODUCCIÓN



ENFERMEDAD DE CHAGAS

Generalidades

La enfermedad de Chagas es una zoonosis producida por el parásito protozoario *Trypanosoma cruzi*. Esta infección, también llamada tripanosomiasis americana, es un importante problema de salud pública que aflige a amplios sectores de la población, predominantemente a la rural y suburbana de Latinoamérica. La enfermedad de Chagas es una infección crónica de difícil manejo y tratamiento, que plantea una importante carga de morbilidad, mortalidad y discapacidad para los países latinoamericanos (WHO, 2007, 2015). Actualmente, se ubica dentro de las enfermedades tropicales desatendidas, reconocidas como un grupo de enfermedades que no han recibido suficiente atención por parte de gobiernos e instituciones sanitarias y que suelen afectar particularmente entornos empobrecidos y lugares con climas calurosos y húmedos (WHO, 2015). Dado que no existe una vacuna eficaz para prevenir la enfermedad, las estrategias de control están focalizadas en disminuir la transmisión, principalmente vectorial, por tratarse en algunas zonas endémicas de la forma más importante de propagación (PAHO, 2010).

Se estima que 6-7 millones de personas se encuentran infectadas en todo el mundo principalmente en América Latina (Fig. 1). La enfermedad de Chagas tiene prevalencia en ciertas zonas, denominadas endémicas, de 21 países de América Latina, donde se transmite a los seres humanos principalmente por las heces u orina de insectos triatomíneos conocidos como vinchucas, chinches o con muchos otros nombres, según la zona geográfica. Durante siglos, esta enfermedad afectaba exclusivamente a las poblaciones rurales de América Latina, pero el movimiento de personas desde las zonas rurales a las ciudades y a otros continentes ha hecho que la enfermedad de Chagas pueda afectar a individuos en los Estados Unidos de América, Canadá, países europeos y algunos países del Pacífico Occidental (WHO, 2019).

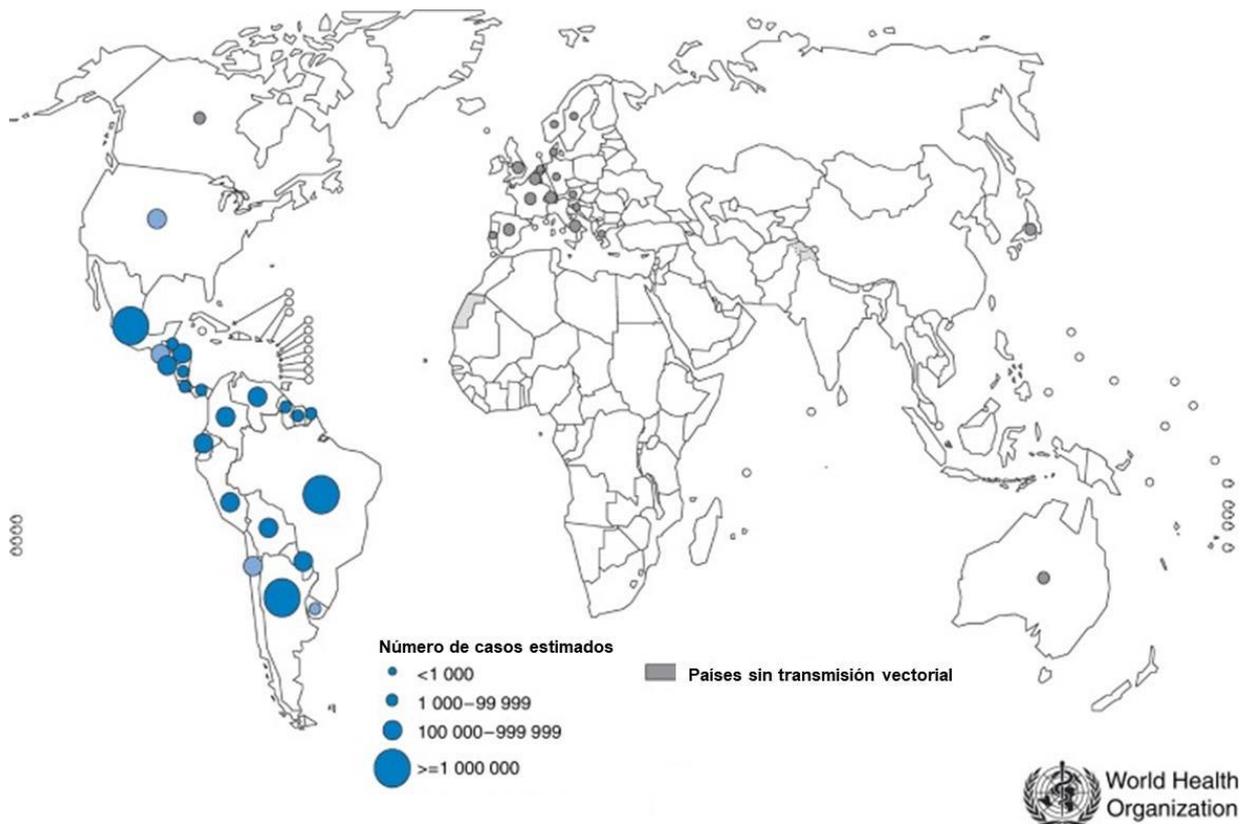


Figura 1. Distribución global de individuos con enfermedad de Chagas (modificado de Molina y col., 2016).

Aunque se han producido avances significativos en el control de los vectores, la transmisión de la enfermedad por vías no vectoriales, como las transfusiones de sangre, la transmisión congénita y los trasplantes de órganos han aumentado. La interrupción de la transmisión de *T. cruzi* de madre a hijo se convirtió en uno de los desafíos de las políticas de salud pública y el estudio de los métodos y mecanismos que operan en la misma es motivo de investigación científica. Alrededor de 9.000 bebés nacen infectados de madres infectadas con *T. cruzi* cada año, y se estima que 1,1 millones de mujeres, que viven en países ubicados entre México y Argentina y que se encuentran en edad fértil, están infectadas con el parásito (WHO, 2019).

Agente causal: *Trypanosoma cruzi*

El *T. cruzi* es un parásito intracelular obligado perteneciente al orden Kinetoplastida y a la clase Mastigophora. Es un parásito unicelular que alterna su ciclo biológico entre dos hospedadores multicelulares, uno invertebrado y otro vertebrado, presentando un ciclo de vida digenético. En función de la forma general de las células (esférica, piriforme o alargada), la posición relativa entre núcleo y kinetoplasto

(anterior, lateral o posterior), la forma en que surge el flagelo (central o lateral), se definen 3 estadios de los *T. cruzi* (Fig. 2):

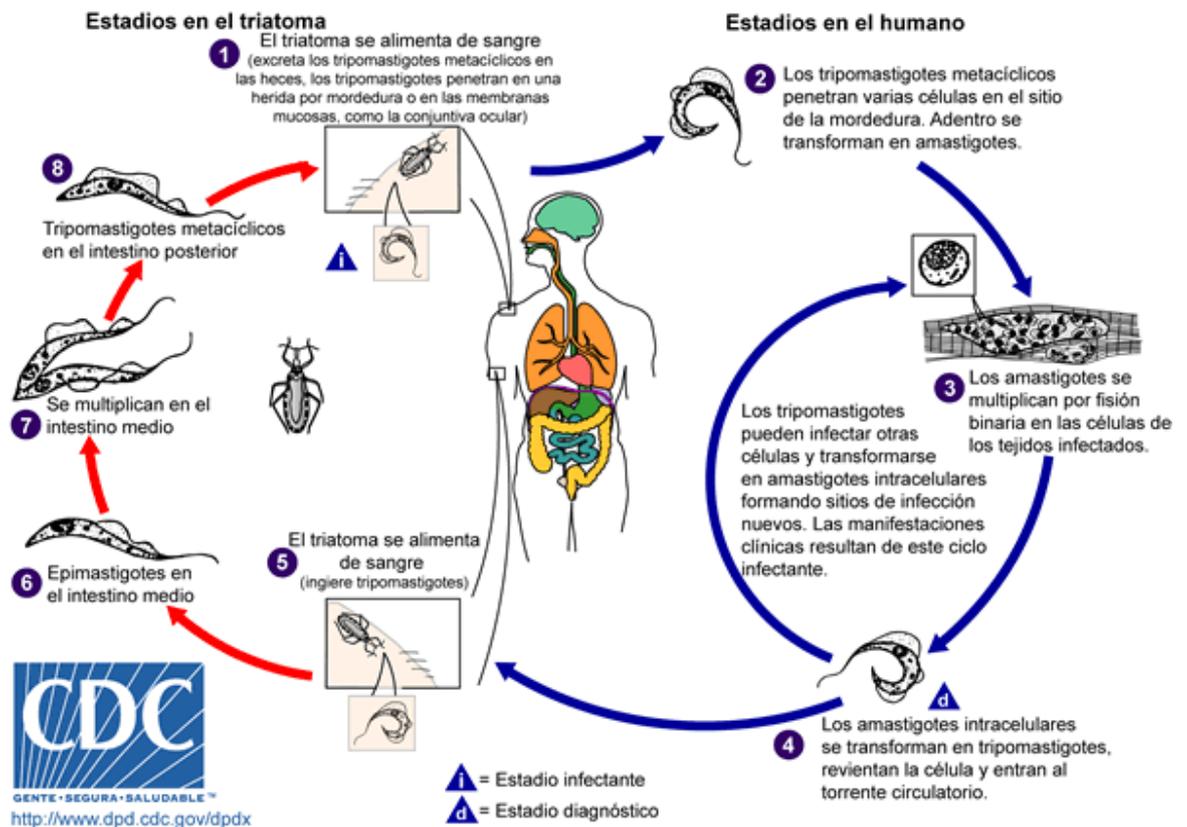


Figura 2. Ciclo biológico del *Trypanosoma cruzi*. Extraído de: <https://www.mcdinternational.org/trainings/malaria/spanish/dpdx/HTML/TrypanosomosisAmericana>

Amastigote. También conocido como esferomastigote, micromastigote, forma aflagelada o forma de leishmania. Es la forma intracelular replicativa del parásito (Fig. 3). Es un organismo pequeño de 3 a 5 μm , posee un núcleo y un kinetoplasto. Sufre división binaria cuando se encuentra en el citoplasma de la célula del hospedador vertebrado. En este trabajo de tesis, la forma amastigote del parásito es la que se cuantificó en los diferentes experimentos.

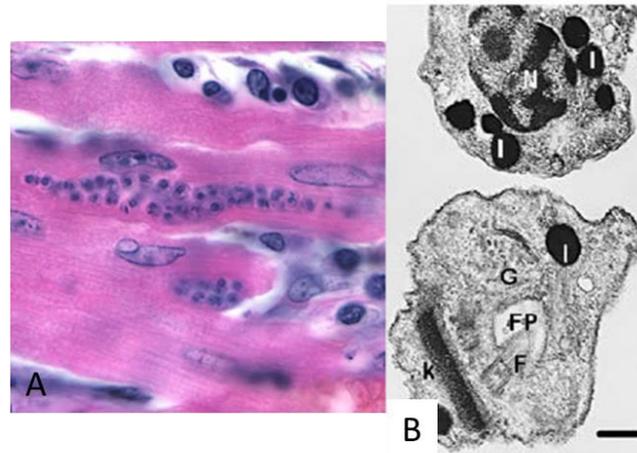


Figura 3. A) Imagen histológica de amastigotes en tejido cardíaco. Tinción con H/E. Extraído de: <https://www.cdc.gov/dpdx/trypanosomiasisamericana/index.html> B) Microscopía electrónica de transmisión de amastigotes cepa Y, obtenidos de cultivo de macrófagos J-774G-8. (F) flagelo, (FP) flagelo pequeño, (G) complejo de Golgi, (I) vacuola lipídica, (k) kinetoplasto, (N) núcleo. Barra representa 0,25 μm . (Santa-Rita y col., 2006).

Epimastigote. Tiene forma de huso y mide entre 20 a 40 μm de largo. En este estadio del parásito el kinetoplasto se ubica anterior al núcleo (Fig. 4). Esta forma del *T. cruzi* es capaz de dividirse en medios acelulares y se observa en el intestino de su hospedero invertebrado. Puede encontrarse dentro de las células de vertebrados durante el final del ciclo, cuando los amastigotes se transforman en tripomastigotes o viceversa (De Souza, 2002).



Figura 4. A) Imagen histológica de epimastigotes en cultivo axénico. Tinción con Giemsa. Extraído de: <https://www.cdc.gov/dpdx/trypanosomiasisamericana/index.html> B) Microscopía electrónica de transmisión de epimastigotes cepa Y. (F) flagelo, (k) kinetoplasto. Barra representa 1 μm . (Rocha y col., 2006).

Tripomastigotes. Esta forma tiene cerca de 25 μm de largo y 2 μm de ancho. En este estadio del parásito el kinetoplasto está ubicado posterior al núcleo (Fig. 5). Es la forma infectiva del hospedador vertebrado y es la forma empleada para infectar las células y tejidos utilizados en este trabajo de tesis. El tripomastigote no es capaz de

dividirse en la circulación sanguínea, y morfológicamente se pueden observar dos formas de tripomastigotes; uno más delgado con un núcleo más 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 depende 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 para infectar a los hospederos invertebrados (De Souza, 2002).

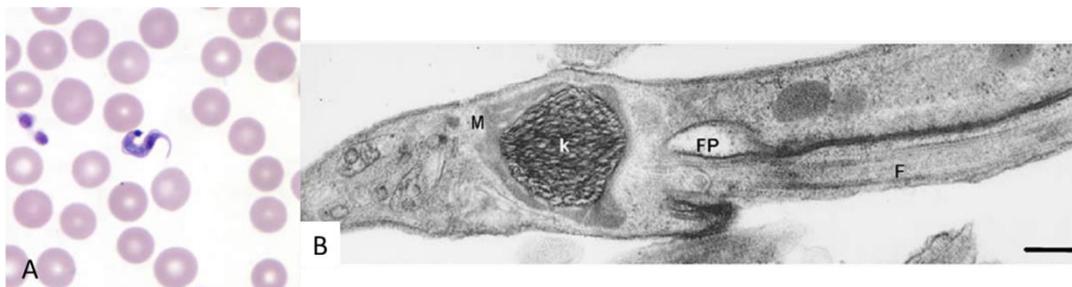


Figura 5. A) Imagen histológica de tripomastigotes en extendido de sangre periférica. Tinción con Giemsa. Extraído de: <https://www.cdc.gov/dpdx/trypanosomiasisamerican/index.html> B) Microscopía electrónica de transmisión de tripomastigote cepa Y, obtenido de sangre de ratón albino Swiss. (F) flagelo, (FP) flagelo pequeño, (k) kinetoplasto, (M) mitocondrión. Barra representa 0,25 μm . (Santa-Rita y col., 2006)

Linajes de *T. cruzi*

El *T. cruzi* es un caso paradigmático de evolución predominantemente clonal (Tibayrenc y Ayala, 1987) con evidencias de recombinación genética (Yeo y col., 2005), siendo esto relevante en las manifestaciones de la enfermedad y la resistencia a fármacos. 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 TcIIIc), TcIV (formado por TcIIa), TcV (formado por TcIIId) y TcVI (formado por TcIIe) (Brisse y col., 2001; Zingales y col., 2009). Se ha descrito, en ratones, que el polimorfismo entre las poblaciones de *T. cruzi* puede influenciar la transmisión congénita de la enfermedad y la patología fetal y/o neonatal (Solana y col., 2002), mientras que en el humano no se describió un genotipo específico que se asocie a la transmisión congénita (Schijman y col., 2007). En este trabajo de tesis, se utilizó la cepa Tulahuen que fue tipificada como perteneciente al linaje DTU VI (Triquell y col., 2018).

En *T. cruzi*, la secuencia satélite de ADN (SaTDNA) nuclear tiene un gran número de repeticiones (10.000 copias por genoma) y se caracteriza por ser una

secuencia conservada y organizada, lo cual permite que sea un blanco de amplificación para el diagnóstico por PCR (Moser y col., 1989; Sturm y col., 1989; Britto y col., 1995; Vago y col., 1996). En este trabajo de tesis se realizó la detección de *T. cruzi* intracelular en las placentas empleando un algoritmo basado en la tecnología de PCR en tiempo real utilizando simultáneamente múltiples juegos de primers y sondas Taqman para identificar los 6 Unidades Discretas de Tipificación (DTUs) en muestras biológicas (Cura y col, 2015). Esta técnica fue desarrollada en el laboratorio del Dr. Alejandro Schijman (INGEBI-CONICET) y se aplica al estudio de muestras sanguíneas, de tejido cardíaco, placentario y del SNC.

Vías de transmisión

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* es la más ampliamente distribuida en América Latina, (WHO 2007, 2015) y contra la cual se han hecho la mayoría de las campañas de erradicación, logrando en gran parte la interrupción de la transmisión vectorial, 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 tripomastigotes, fue responsable del 5 a 20% de los casos de la enfermedad de Chagas en Argentina durante 1995 a 1997 (Schmuñis y col., 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 y Torrico, 2003). Debido a la migración de personas provenientes de países endémicos a los EE.UU., en el 2007, este último implementó en los bancos de sangre la prueba diagnóstico para el Mal de Chagas, aprobada por la FDA (Administración de Alimentos y Medicamentos, por sus siglas en inglés) (Tarleton y col., 2007).

Transmisión oral. La transmisión oral 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 y col., 2002; WHO, 2015).

Transmisión por trasplante de órganos. Trasplantes de riñón, hígado, médula ósea, páncreas y corazón, de donantes infectados con *T. cruzi*, tanto vivos como muertos, pueden ser causa de transmisión del parásito (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 que manipule muestras biológicas infectadas con *T. cruzi* debe seguir normas de bioseguridad para el trabajo de laboratorio (WHO, 2015).

Transmisión congénita. La transmisión de la infección por *T. cruzi* de madre embarazada a su hijo puede llevar a la infección congénita de Chagas. Esta última 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; Schijman y col., 2007; Carlier y col., 2015).

Curso clínico de la enfermedad

La enfermedad de Chagas presenta tres períodos bien definidos: agudo, crónico indeterminado y crónico determinado o sintomático.

Período agudo. Generalmente es asintomático, y más frecuente en personas jóvenes. Se evidencia una alta parasitemia, con síntomas y signos transitorios. El período de incubación es de 4 a 10 días o de menor duración cuando la vía de transmisión es transfusional y por trasplante de órganos (PAHO, 2010). Este período se extiende por 2 a 4 meses. Alrededor del 1 a 2% de las personas infectadas se diagnostican en esta etapa de la infección. Los pacientes sintomáticos presentan: fiebre, signos clínicos de puerta de entrada, edema, adenopatías satélites, hepatomegalia y esplenomegalia. Los signos de puerta de entrada o chagomas de inoculación son lesiones cutáneas y son más frecuentes en la cara y extremidades. Característico, aunque infrecuente, es el chagoma de la región ocular llamado signo de Romaña-Mazza, que se presenta como edema bpalpebral, unilateral, de color rosado violáceo claro, indoloro y duro. Los chagomas pueden presentarse en cualquier parte de la piel y son lesiones de aspecto furunculoideo de color rosado violáceo e indurado, de duración variable. En este período, el compromiso cardíaco se presenta como una miocarditis que se expresa con taquicardia e hipotensión. Algunos casos pueden llegar a la insuficiencia cardíaca congestiva. La hepatomegalia se presenta en el 40% de los casos y el compromiso meningoencefálico, es más frecuente en niños de menor edad (PAHO, 2010).

La enfermedad de Chagas aguda es de curso habitualmente benigno en inmunocompetentes. La tasa de letalidad es de 2% a 7% (Moretti y col., 2005). El

recién nacido con transmisión congénita de Chagas representa un caso agudo de infección y es la forma más frecuente en Argentina (Programa Nacional de Chagas, 2012).

Período indeterminado. Comienza entre las 8 a 10 semanas después de la infección. Un 50 a 70% de los pacientes con enfermedad de Chagas se encuentran en este período de la infección. Se caracteriza por la ausencia de síntomas cardíacos, digestivos y otros. Los pacientes están infectados (serología y/o parasitemia positiva), pero los exámenes de laboratorio rutinarios son normales. Un 70% de estos pacientes mantiene esta forma de la enfermedad durante toda su vida. El resto puede evolucionar a una forma crónica determinada en un lapso de 10 a 30 años (PAHO, 2010).

Período crónico. Se manifiesta principalmente como cardiopatía, colopatía y esofagopatía. El compromiso de otros órganos tales como estómago, duodeno, vejiga, uréteres y otros, es infrecuente. Estas formas de presentación pueden ocurrir separadamente o coexistir en un mismo enfermo. En esta etapa existe una parasitemia baja y fluctuante, con títulos detectables de anticuerpos en pacientes inmunocompetentes. Se estima que alrededor de un 30% de las personas con Chagas tendrían manifestaciones clínicas en la etapa crónica, aunque si se dispusiera de métodos diagnósticos más sensibles este número podría incrementar (PAHO, 2010). Los problemas cardíacos 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 cardíaca (Tanowitz y col., 1992).

Tratamiento

La enfermedad de Chagas puede tratarse con benznidazol, y también con nifurtimox, dos fármacos tripanocidas. Ambos medicamentos, si se administran en la etapa aguda de la infección son eficaces casi al 100% para curar la enfermedad, incluso en los casos de transmisión congénita. Sin embargo, la eficacia del tratamiento disminuye a medida que transcurre más tiempo desde el inicio de la infección. El tratamiento con estos medicamentos también está indicado en caso de reactivación de la infección (por ejemplo, por inmunodepresión) y en los pacientes al principio de la fase crónica. Se debe ofrecer tratamiento a los adultos infectados, especialmente a los que no presentan síntomas, dado que el tratamiento antiparasitario puede evitar o frenar la progresión de la enfermedad y prevenir la transmisión congénita en las embarazadas. En otros casos, los posibles beneficios de la medicación para prevenir o

retrasar el avance de la enfermedad de Chagas deben sopesarse contra la duración prolongada del tratamiento (hasta dos meses) y las posibles reacciones adversas. El benznidazol y el nifurtimox no deben administrarse a las embarazadas ni a las personas con insuficiencia renal o hepática. El nifurtimox también está contraindicado en personas con antecedentes de enfermedades del sistema nervioso neurológicas o trastornos psiquiátricos. Además, puede ser necesario administrar un tratamiento específico para las manifestaciones cardíacas o digestivas (WHO, 2015).

TRANSMISIÓN CONGÉNITA

Teniendo en cuenta que el presente trabajo de tesis involucra la respuesta de la placenta humana a la infección con *T. cruzi*, a continuación se detalla la vía de transmisión congénita y los factores que influyen en la misma.

Este tipo de transmisión, tal como mencionamos previamente, se produce cuando el *T. cruzi* presente en circulación sanguínea materna cruza la barrera placentaria y llega al feto (Bittencourt, 1976). Este evento puede suceder en cualquier fase de la enfermedad materna (Bittencourt, 1992; 1976; Moretti y col., 2005).

Epidemiología

Se ha informado que la transmisión materno-fetal de *T. cruzi* ocurre en alrededor del 1 al 12% de los embarazos de mujeres infectadas estudiadas en áreas endémicas (Torrice y col., 2004; Salas Clavijo y col., 2012; Bua y col., 2012; Carlier y Truyens, 2015). La tasa de transmisión congénita del parásito es variable en diferentes países: 6% en Argentina, 4,1% en Bolivia, y 4,3% en Paraguay (Carlier y Truyens, 2015), de 0% a 25,1% en Brasil (Martins-Melo y col., 2014), y entre 0,8% a 4,08% en México (Cardoso y col., 2012; Montes-Rincón y col., 2016).

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 a esta vía de transmisión para explicar la presencia del *T. cruzi* en países Latinoamericanos, (Gürtler y col., 2003; Sosa-Estani, 2005) y en aquellos no endémicos. Esta importancia se incrementa más aún por la alta seroprevalencia de las embarazadas, las cuales pueden aportar enfermos chagásicos en el futuro, que a su vez, pueden contribuir a propagar la infección.

Vías de transmisión congénita

Ha sido reportado que el *T. cruzi* puede llegar al feto por vía hematológica, atravesando la barrera placentaria (Carlier y Truyens, 2015); aunque algunos autores sostienen que es necesaria la existencia de una lesión previa de la barrera placentaria para su ingreso (Díaz-Luján y col., 2012). Se han descrito otras vías por las que puede entrar el *T. cruzi* a la circulación fetal. Así, en estudios histo-patológicos se ha descrito 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. Este hallazgo, denotaría la posibilidad de transferencia de parásitos al feto por la vía coriónica sin el necesario paso a través del trofoblasto (Fernandez-Aguilar y col., 2005; Carlier y Truyens, 2015). Otra posible forma de transmisión de la enfermedad puede ocurrir en el momento del nacimiento a través del canal de parto. Este mecanismo puede ocurrir en recién nacidos parasitológicamente negativos, que se transforman en parasitológicamente positivos unas semanas posteriores al nacimiento (Moya y col., 1989; Blanco y col., 2000; Carlier y Truyens, 2015) (Fig. 6).

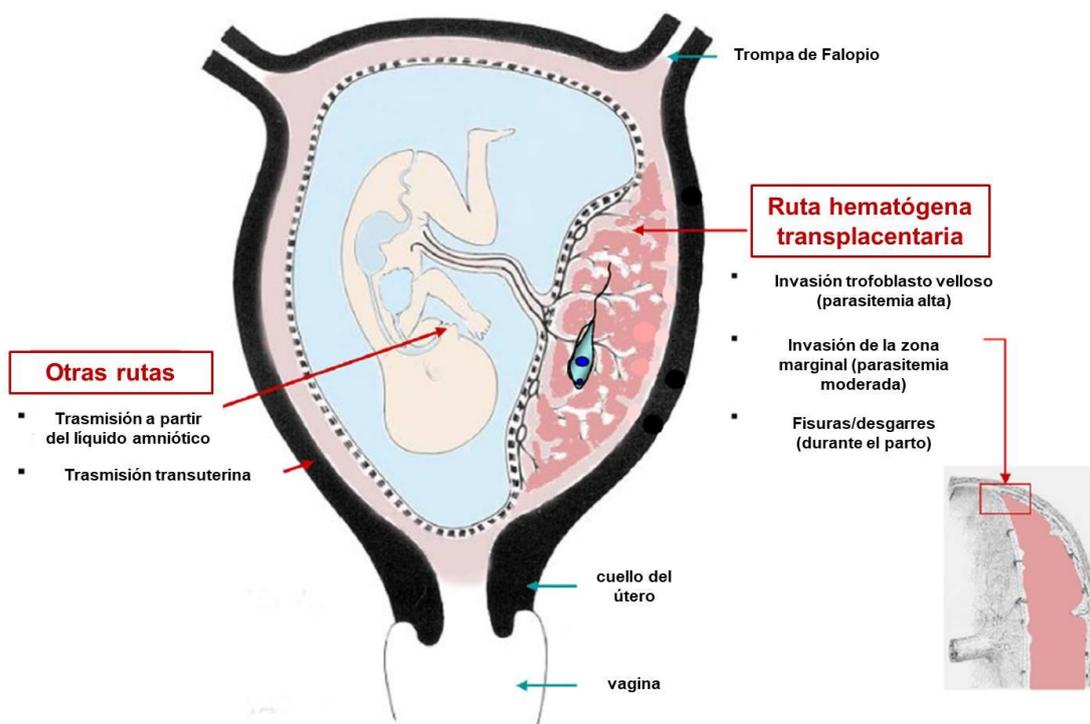


Figura 6. Posibles rutas de transmisión materno-fetal de *T. cruzi*. Esquema que representa la interacción del feto con los diferentes componentes placentarios y uterinos donde podría alojarse el parásito (modificado de Carlier y Truyens, 2015).

Factores que influyen en la transmisión congénita

Hasta el presente no se ha expuesto una explicación concreta que justifique el bajo porcentaje de niños infectados por transmisión congénita. Los factores que determinan la transmisión de *T. cruzi* de la madre al feto pueden ser múltiples (Bua y col., 2012; Carlier y Truyens, 2015; Bustos y col., 2019). Se ha observado que la mayoría de los casos congénitos se establecen en embarazadas en la etapa indeterminada o crónica de la enfermedad y de que es necesaria la persistencia del parásito para la transmisión (Carlier y Truyens, 2010). Hay evidencias de que la competencia inmunológica de la placenta, la madre y el feto juegan un rol en la transmisión congénita (Volta y col., 2016; Medina y col., 2018; Triquell y col., 2018; Kemmerling y col., 2019). Otros factores que podrían estar participando en la transmisión congénita son: la edad materna, donde se observó que la frecuencia de transmisión es mayor en madres más jóvenes que en añosas (Bittencourt, 1992), aunque otros trabajos observaron lo contrario (Salas y col., 2007).

Las diferencias filogenéticas en las cepas de *T. cruzi* infectante han sido asociadas con la frecuencia de casos de transmisión congénita (Sturm y col., 2003; Zingales y col., 2009). En la transmisión congénita de la infección con *T. cruzi*, en ratones, se observó que la cepa del parásito puede influenciar la transmisión congénita. La cepa del parásito influye tanto en la frecuencia 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 y col., 2002; Luquetti y col., 2015). En relación al genotipo, se ha informado que en el 80 a 100% de los casos congénitos en Argentina, Bolivia, sur de Brasil, Chile y Paraguay, las madres estaban infectadas con el genotipo TcV, mientras que el genotipo TcII se ha identificado en los pocos casos detectados en otros estados brasileños (Virreira y col., 2006; Virreira y col., 2007; Burgos y col., 2007; Corrales y col., 2009; Garcia y col., 2014). Otros autores postulan que la cepa que se transmite es la predominante en la población donde se produjo la infección de la madre, sin que haya un genotipo directamente asociado a la transmisión congénita (Schijman y col., 2007; Herrera y col., 2019).

La parasitemia materna y la exposición vectorial están asociadas con el riesgo de transmisión congénita (Bua y col., 2012; Hermann y col., 2004; Bustos y col., 2019). La tasa de transmisión vertical de *T. cruzi* es diferente en áreas que cuentan con o sin la presencia de insectos vectores. Regiones geográficas donde la enfermedad es endémica tienen el doble de probabilidades de tener transmisión congénita, en

comparación con los países libres de transmisión vectorial como España (5,0 vs. 2,7% respectivamente) (Howard y col., 2014). Es esperable que la carga parasitaria aumente bajo exposición continua del vector en áreas endémicas, aumentando el riesgo de transmisión congénita del parásito (Díaz y col., 2002; Torrico y col., 2006). Sin embargo, se demostró que mujeres infectadas que viven en casas bajo control de vectores tenían cargas parasitarias significativamente más altas que mujeres que viven en casas infestadas (Sánchez Negrette y col., 2005; Rendell y col., 2015). Esto probablemente se deba a que repetidas inoculaciones inducen una respuesta inmune mejorada que ayuda a controlar los niveles de los parásitos (Rendell y col., 2015). En conjunto, las investigaciones en este campo han respaldado firmemente que la parasitemia durante el embarazo es un factor clave para la transmisión de *T. cruzi* connatal, considerando que el 100% de los bebés que nacieron infectados con *T. cruzi* sus madres mostraban altas parasitemias durante el embarazo (Bustos y col., 2019). Por otro lado, el 100% de los niños nacidos de mujeres tratadas con drogas o con muy baja o sin parasitemia no estaban infectados (Murcia y col., 2013; Rendell y col., 2015). Estos estudios refuerzan la idea de que disminuir la carga del parásito podría ser beneficioso para evitar la infección congénita, y apoyan la idea de que ya sea un tratamiento tripanocida específico o una posible vacuna terapéutica pre-concepcional (Dumonteil y col., 2019) a mujeres en edad fértil podrían disminuir la transmisión a sus bebés. Sin embargo, se han reportado dos casos clínicos de madres con Chagas agudo en tercer trimestre de embarazo que no transmitieron la infección al feto (Moretti y col., 2005), lo que implicaría que existen mecanismos limitantes de la infección en la interfase materno-fetal.

El estado inmunológico de la madre juega un rol muy importante en la transmisión congénita. Se ha observado que una respuesta innata disminuida con una liberación de TNF α baja, se asocia en alguna medida a la transmisión congénita. IFN γ y TNF α son mediadores claves que controlan la infección por *T. cruzi*. IFN γ activa monocitos/macrófagos y estimula, en sinergia con TNF α , la generación de óxido nítrico (NO) con efecto deletéreo sobre el parásito (Carlier y Truyens, 2015). También se ha reportado una respuesta de linfocitos T, de tipo T helper I, disminuida en madres transmisoras (Hermann y col., 2004).

TNF α es necesario para el control de las infecciones, pero en altas cantidades, puede ser perjudicial para el hospedador debido a la fuerte respuesta pro-inflamatoria que genera (García y col., 2008). Se ha reportado un aumento de TNF α en plasma de madres no trasmisoras y en niños no infectados congénitamente por *T. cruzi*. Sin embargo, en el plasma de niños infectados congénitamente los valores de los

receptores de TNF α solubles (sTNF-R2) fueron significativamente más altos que los no infectados (García y col., 2008). Los altos niveles de sTNF-R2 podrían orientar a la tendencia de la transmisión materno infantil de la infección por *T. cruzi* (García y col., 2008). Este reporte nos permite concluir que alteraciones en el control de la respuesta inflamatoria de la madre pueden tener consecuencias directas en la transmisión congénita y sobre la respuesta inmune de los neonatos (García y col., 2008).

Análisis transcriptómico en placentas de madres chagásicas mostró una sobreexpresión de genes que participan en la inflamación y en la activación de linfocitos (Juiz y col., 2018). Teniendo en cuenta los desafíos relacionados con el diagnóstico congénito de Chagas, la identificación de mediadores inmunológicos podría ser muy útil para el desarrollo de nuevos biomarcadores de riesgo de transmisión vertical (Bustos y col., 2019). Actualmente, se han determinado algunos marcadores inmunológicos que produce la placenta frente a la infección (Castillo y col., 2017; 2018), pero se desconoce cómo esta respuesta va variando durante la invasión y posterior multiplicación del parásito en el tejido placentario.

Diagnóstico y consecuencias clínicas de la transmisión congénita

Muchas de las mujeres embarazadas y niños infectados con *T. cruzi* son asintomáticos, por ello esta infección parasitaria puede ser indetectable dificultando el **diagnóstico** rápido. Además, actualmente existe un subdiagnóstico de esta infección, debido a la pérdida de oportunidades en la atención prenatal y adecuado seguimiento infantil por parte de los programas de vigilancia de los sistema de salud (Carlier y col., 2015). El diagnóstico de niños menores de 8 a 10 meses de edad con infección congénita por *T. cruzi* se basa principalmente en la detección de parásito, generalmente parásitos vivos en sangre por métodos microscópicos, ya que los anticuerpos específicos que se pueden detectar han sido transferidos por sus madres seropositivas. Solo cuando los ensayos parasitológicos no logran detectar la infección, los bebés deben ser monitoreados durante un período más extenso para poder detectar anticuerpos específicos para *T. cruzi*, generados por el niño, posterior a la desaparición de los anticuerpos maternos (De Rissio y col., 2010). En la mayoría de los países latinoamericanos, el diagnóstico de los bebés nacidos de mujeres embarazadas infectadas con *T. cruzi* se realiza a través del examen directo de muestras de sangre fresca recogida en tubos heparinizados (microhematocrito o microtubos). La sensibilidad de este método varía mucho con el entrenamiento del operador y solo detecta el 40 a 60% de los casos congénitos. Por ello, es necesario el seguimiento del recién nacido para la detección de anticuerpos específicos para *T.*

cruzi luego de los 8 a 10 meses del nacimiento, para llegar a un diagnóstico final de la infección (De Rissio y col., 2010; Bua y col., 2012). Actualmente, se desarrolló una técnica de qPCR para la detección de *T. cruzi* en bebés, que ofrece una mayor sensibilidad y especificidad que los métodos parasitológicos que implican examen microscópico de muestras de sangre (Piron y col., 2007; Duffy y col., 2009, 2013; Ramírez y col., 2015). Este método diagnóstico puede dar lugar a algunos resultados falsos positivos como también requiere de un equipamiento complejo que generalmente no se posee en zonas endémicas. Por ello, está en etapa de prueba un examen molecular que se basa en la PCR convencional pero utiliza la amplificación isotérmica del ADN evitando el uso de equipamientos complejos (Besuschio y col., 2017; Jimenez-Coello y col., 2018). Estos nuevos enfoques moleculares necesitan la estandarización y validación frente a los tests de referencia. Bebés que no completan el período de seguimiento requerido para el diagnóstico de la infección parasitaria se verán privados del acceso inmediato a tratamientos farmacológicos y la eliminación del parásito y se convertirán en adultos infectados. Es crucial el desarrollo de técnicas diagnósticas sensibles, rápidas y simples para una detección oportuna de *T. cruzi* en la infección congénita, poco después del nacimiento y antes de que el recién nacido abandone la unidad de cuidados, especialmente en áreas rurales donde el acceso al sistema de salud puede ser limitado (Bustos y col., 2019).

Los recién nacidos pueden tener distintas **sintomatologías clínicas**, desde ser asintomáticos hasta experimentar diversos grados o tipos de sintomatologías (Freilij y Altcheh, 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 y Torrico, 2003). Los signos clínicos más frecuentes encontrados en los pacientes sintomáticos son: hepatomegalia, esplenomegalia, hepatoesplenomegalia, meningoencefalitis, insuficiencia cardíaca y anemia (Bittencourt, 1976; Moya y Moretti, 1997). Por ello, la hepatomegalia y la esplenomegalia deben ser tenidas en cuenta en zonas endémicas cuando se sospecha la enfermedad, y más aún si existen antecedentes maternos. La miocarditis ha sido observada con baja frecuencia. Cuando esta última 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 sistema nervioso central (Truyens y col., 2005). También ha sido

publicado por diversos autores, otras consecuencias como bebés nacidos prematuros, con bajo peso al nacer y abortos espontáneos (Saleme y col., 1971; Bittencourt, 1972; Luquetti y col., 2015).

MECANISMO DE INFECCIÓN Y SUPERVIVENCIA DEL *T. cruzi* EN LA CÉLULA DEL HOSPEDADOR

Proceso de invasión y replicación de *T. cruzi* en células humanas

Se ha descrito que el ciclo de infección del *T. cruzi* en células humanas comienza con una invasión a la célula dentro de los 15 min posteriores a la unión parásito-célula. Ya dentro de la célula, el parásito se encuentra encerrado por una porción de la membrana de la célula hospedadora (vacuola parasitófora). A las 4 h después de la infección, el parásito comienza a transformarse de la forma tripomastigote infecciosa a amastigote intracelular; saliendo de la vacuola parasitofórica alrededor de las 8 h post-infección. El parásito completa su transformación a amastigote en 24 h y comienza a replicarse alcanzando su mayor división a las 72 h post-infección. Alrededor de 96 h post-infección, el parásito comienza su transformación a la forma tripomastigote (Fig. 7). Luego, los tripomastigotes escapan de la célula y el proceso de infección puede comenzar de nuevo en otra célula (Houston-Ludlam y col., 2016; Li y col, 2016). Acompañando los procesos de infección, las células responden expresando en una primera etapa, hasta las 24 h, genes que regulan metabolismos como glicólisis, oxidación y síntesis de ácidos grasos (Li y col, 2016). Posteriormente a la transformación en amastigote y el aumento de la replicación, hay una mayor expresión de genes relacionados al sistema inmune del hospedero como TNF α e IL-8 (Houston-Ludlam y col., 2016).

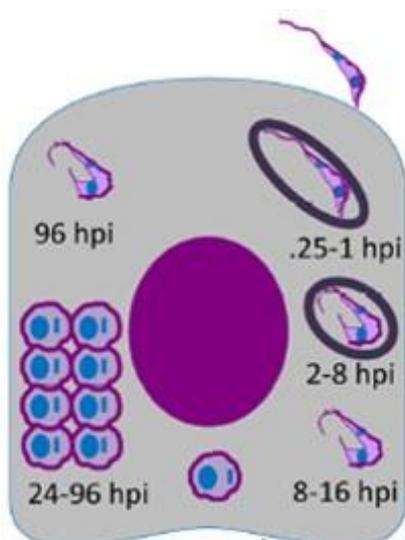


Figura 7. Representación esquemática de la infección por *T. cruzi* en células humanas. El círculo violeta muestra el núcleo de la célula humana y en gris el citoplasma celular. Las estructuras alargadas son los tripomastigotes y los círculos pequeños grises con borde violeta, representan a la forma amastigotes. hpi: horas post-infección (Houston-Ludlam y col., 2016).

Evasión de la respuesta inmune y supervivencia del *T. cruzi* en células humanas

En la literatura, hay varios términos y definiciones para describir la activación y polarización de los macrófagos (Orecchioni y col., 2019). Nathan definió la activación clásica de macrófagos mediada por IFN γ (Nathan y col., 1983) y Gordon definió la activación alternativa de macrófagos inducida por IL-4 (Stein y col., 1992). El tipo de activación determina la funcionalidad de los macrófagos (Orecchioni y col., 2019). La exposición de macrófagos a señales de activación clásicas, como el lipopolisacárido (LPS) o el IFN γ , inducen la enzima óxido nítrico sintasa inducible (NOSi) que actúa sobre L-arginina produciendo NO y citrulina. La NOSi es inducida en macrófagos a través de las citoquinas pro-inflamatorias como TNF α , IFN γ e IL-12 (Stempin y col., 2007). NO actúa como una molécula efectora del sistema inmune con función citotóxica. Ciertas acciones antimicrobianas de los macrófagos han sido atribuidas al NO y también a varios productos del metabolismo del NO, que comúnmente se denominan intermediarios reactivos del nitrógeno, como por ejemplo el peroxinitrito (Martinez y Gordon, 2014).

Los macrófagos activados alternativamente, en contraste con los clásicos, fallan en producir NO a partir de L-arginina, en virtud de su capacidad para inducir la enzima arginasa. Este tipo de macrófagos tiene comprometida su capacidad para eliminar patógenos intracelulares. A partir de L-arginina, la arginasa produce urea y ornitina, y luego poliaminas y prolina. Las citoquinas producidas por los macrófagos activados alternativamente son la IL-10, el receptor antagonista de IL-1 (IL-1RA) y TGF β (Martinez y Gordon, 2014).

Interesantemente, macrófagos con perfil de activación alternativo, han sido identificados en tejidos como pulmón y placenta en condiciones normales. Recientemente se demostró la presencia de arginasa activa en sangre periférica de mujeres embarazadas, así como, se reportó una incrementada actividad de esta enzima en placenta (Kropf y col., 2007; Liu y col., 2018). A pesar de sus funciones en la regulación del sistema inmunológico, se ha visto que este fenotipo de activación alternativa de macrófagos, puede ser aprovechado por varios microorganismos y por células tumorales para persistir y proliferar en el hospedador (Liu y col., 2018; Orecchioni y col., 2019).

Arginasa versus NOS α como mecanismo de evasión inmune para favorecer la supervivencia de *T. cruzi*

Stempin y col., han demostrado la influencia de un antígeno del *T. cruzi*, cruzipaína (Cz) sobre las vías de activación de macrófagos, y que los macrófagos activados por esta glicoproteína, muestran un perfil de activación alternativa. Los macrófagos activados por Cz producen urea (a través de la activación de arginasa), IL-10 y TGF β pero no NO e IL-12 (Stempin y col., 2002). En los macrófagos activados alternativamente por Cz y luego infectados con *T. cruzi*, se observó un incremento en el número de parásitos. Este fenómeno podría atribuirse al efecto de TGF β , ya que se ha demostrado que este factor es capaz de desplazar el metabolismo de L-arginina en macrófagos, disminuyendo NO e induciendo la producción de ornitina, con la subsiguiente biosíntesis de poliaminas. Además, TGF β también ejerce un potente efecto regulatorio sobre la función de macrófagos, incluyendo la supresión de la producción de IL-12. En este sentido, se ha descrito que las células activadas por Cz no son capaces de producir IL-12. Por otra parte, se ha demostrado que la IL-10 liberada por macrófagos activados alternativamente es capaz de inhibir la generación de macrófagos activados clásicamente. Se ha demostrado que las células peritoneales activadas con Cz son capaces de liberar grandes cantidades de IL-10, de esta manera se incrementaría la activación alternativa de macrófagos favoreciendo la replicación parasitaria (Stempin y col., 2002). Por lo tanto, el balance entre citoquinas anti-inflamatorias (IL-10 y TGF β) y pro-inflamatorias (IL-12) al comienzo de la infección con *T. cruzi* podría ser crucial para permitir la instalación del parásito. Este podría ser un mecanismo de evasión a la respuesta inmune innata usado por *T. cruzi* para favorecer su instalación en el hospedador (Fig. 8).

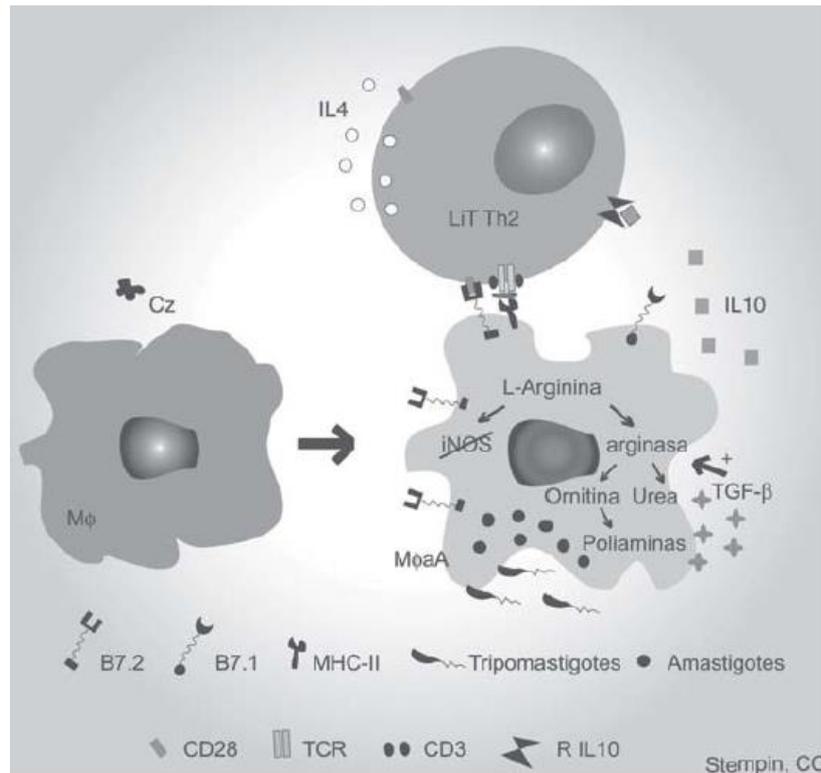


Figura 8. Modelo de activación alternativa de macrófagos inducida por cruzipaina (Cz). Diagrama resumiendo el modelo de activación alternativa de macrófagos inducido por Cz. Cz contacta con su receptor e induce la activación alternativa de macrófagos, a través de la expresión de arginasa, liberación de IL-10 y TGFβ. Los macrófagos activados alternativamente ofrecen un ambiente propicio para que los amastigotes de *T. cruzi* se repliquen descontroladamente. Además los macrófagos activados alternativamente pueden favorecer el perfil Th2 (Stempin y col., 2007).

Se ha demostrado que la manipulación indirecta del NO a través de la modulación de la actividad de arginasa representa un importante mecanismo bioquímico que regula la actividad del factor nuclear κB (NF-κB). También se ha visto, que el tratamiento con los inhibidores de TK, PKA y p38 MAPK en células estimuladas con Cz y luego infectadas con *T. cruzi* causa una disminución en el crecimiento del parásito, que se correlaciona con un desplazamiento en el balance nitritos/urea a favor de la producción de nitritos (Stempin y col., 2004). Estos resultados mostraron la existencia de señales intracelulares que regulan el balance NOSi/arginasa en macrófagos y que están implicadas en el control/persistencia de *T. cruzi* (Stempin y col., 2007; 2008). Se ha demostrado que ratones deficientes en NOSi o en los cuales se inhibió la expresión de esta enzima y posteriormente infectados con *T. cruzi* son altamente susceptibles a la infección (Hölscher y col., 1998; Panis y col., 2019) así como ratones modificados para favorecer un perfil de macrófagos con activación alternativa e infectados con *T. cruzi*, presentaron un aumento de expresión de arginasa-1 y mayor replicación del parásito (Abad Dar y Hölscher, 2018).

Estos resultados muestran la importancia que poseen moléculas del sistema inmune innato en la limitación o sostenimiento de la infección por *T. cruzi*, aspectos muy poco estudiados en la infección del tejido placentario.

PLACENTA HUMANA

La placenta (del griego Plakous = torta plana) es un órgano transitorio, el cual separa y conecta simultáneamente a la madre y el feto (Valentich y col., 2016). Durante todo el embarazo, la placenta realiza distintas funciones que intervienen tanto sobre la madre como en el feto. Entre ellas están la transferencia de gases, nutrientes y desechos, balance de agua, funciones endócrinas e inmunológicas (Benirschke, Kaufmann y Baergen, 2015).

Características estructurales

La placenta humana a término tiene una forma discoidal de unos 20 cm de diámetro, 2,5 cm de grosor y pesa alrededor de 500 gramos (Valentich y col., 2016). Este órgano tiene, un sistema de ramificaciones conocidas como árbol veloso placentario y una estructura hemocorial como barrera materno-fetal (Benirschke, Kaufmann y Baergen, 2015). En la placenta a término se distinguen tres regiones principales, con estructuras y funciones diferenciadas y específicas.

Cara fetal: también conocida como placa coriónica, orientada hacia la cavidad amniótica. En ella, se puede observar la presencia de vasos sanguíneos fetales visibles macroscópicamente (Fig. 9 A).

Cara materna: también denominada cara uterina o placa basal, la cual está en contacto con el endometrio. Esta placa, se desprende durante el alumbramiento. Se encuentra constituida por el estroma endometrial, por trofoblasto y decidua en una matriz extracelular fibrinoide. Esta cara presenta estructuras sobreelevadas, delimitadas por tabiques del endometrio, que separan de forma incompleta el espacio intervelloso denominados cotiledones (Fig. 9 B).

Árbol veloso: segmento situado entre las caras materna y fetal. En esta zona se realiza el intercambio materno-fetal y la mayoría de las funciones placentarias antes descritas. Se caracteriza porque la sangre materna llena el espacio intervelloso donde se encuentran sumergidas las vellosidades coriónicas (Valentich y col., 2016).

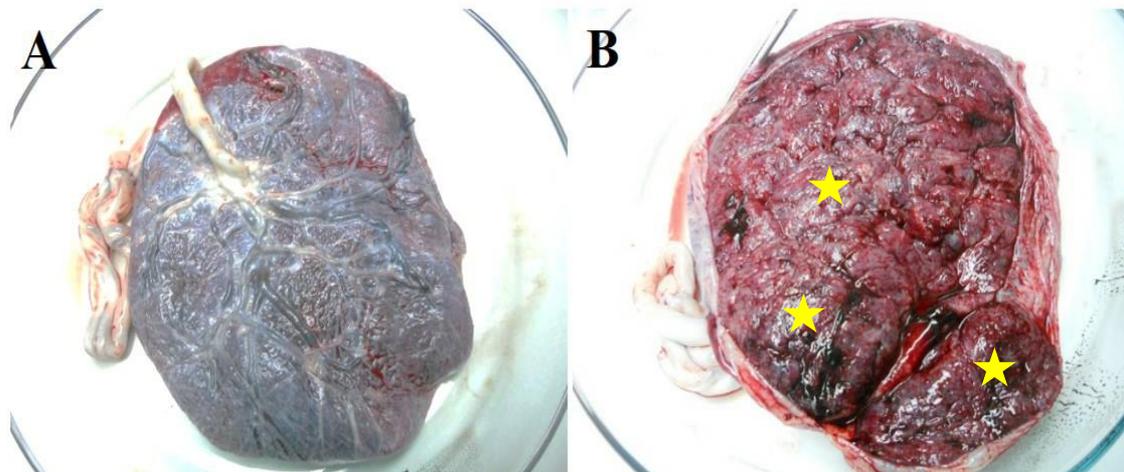


Figura 9. Aspectos macroscópicos de la placenta humana: A) Cara fetal, B) Cara materna. Los cotiledones son señalados con estrellas amarillas.

Vellosidades coriónicas

En la placenta a término podemos identificar 3 tipos de vellosidades coriónicas, las cuales tienen características estructurales y funcionales propias (Fig. 10):

Vellosidades placentarias troncales: proporcionan soporte estructural al árbol vellositario y le otorgan un armazón de distribución. Estas vellosidades están caracterizadas por un estroma fibroso denso y la presencia de arterias y venas. Algunas de las vellosidades se conectan con la placa basal por columnas celulares (vellosidades de anclaje) y permiten estabilizar la posición del árbol velloso en el espacio intervelloso (Fig. 10-3).

Vellosidades placentarias intermedias: este tipo de vellosidades son la continuación de las vellosidades troncales y están interpuestas entre éstas y las vellosidades terminales. Son ramificaciones largas, delgadas que se caracterizan por la presencia de vasos sin una media y adventicia distinguible con el microscopio de luz (Fig. 10-2).

Vellosidades placentarias terminales: se caracterizan por ser ramificaciones finales, en forma de racimo; poseen abundante capilarización, y representan el principal sitio de intercambio materno-fetal a través de la barrera placentaria (Valentich y col., 2016) (Fig. 10-1).

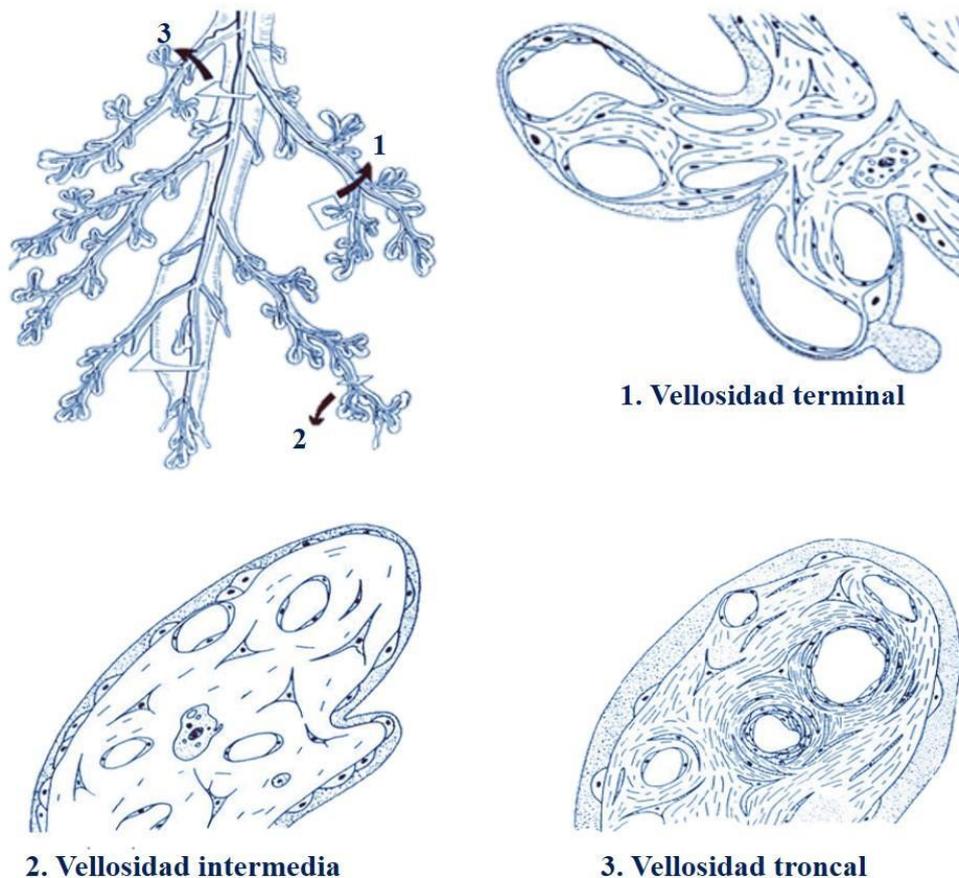


Figura 10. Esquema de los tipos de vellosidades en la placenta humana: 1) Vellosidad terminal, 2) Vellosidad intermedia y 3) Vellosidad troncal (Benirschke, Kaufmann y Baergen, 2015).

Barrera placentaria

El término barrera materno-fetal o barrera placentaria define, en la placenta, capas de tejidos en las vellosidades coriónicas que separan las circulaciones materna y fetal (Fig. 11). En su estructura se pueden distinguir las siguientes partes:

Trofoblasto: compuesto por el sincitiotrofoblasto (STB), capa celular multinucleada, con microvellosidades en su membrana apical, que se encuentra en contacto con la sangre materna. Mediante procesos de apoptosis se forman nudos sincitiales que se liberan hacia la circulación materna. También está formado por el citotrofoblasto vellosito (CTB) constituido por células mononucleadas que se dividen, diferencian y fusionan para la formación del STB. Durante el primer trimestre de gestación el CTB se puede observar como una capa continua entre el sincitio y la membrana basal. Sin embargo, a partir del segundo trimestre su estructura pasa a ser discontinua, y al final de la gestación se localizan células aisladas entre el sincitio y la membrana basal.

Estroma: posee una matriz extracelular de fibras colágenas y sustancia amorfa, en la cual se localizan células mesenquimáticas, fibroblastos, y células de Hofbauer (macrófagos residentes) de origen fetal.

Vasos sanguíneos fetales: en ellos se localizan células endoteliales con membrana basal (Valentich y col., 2016).

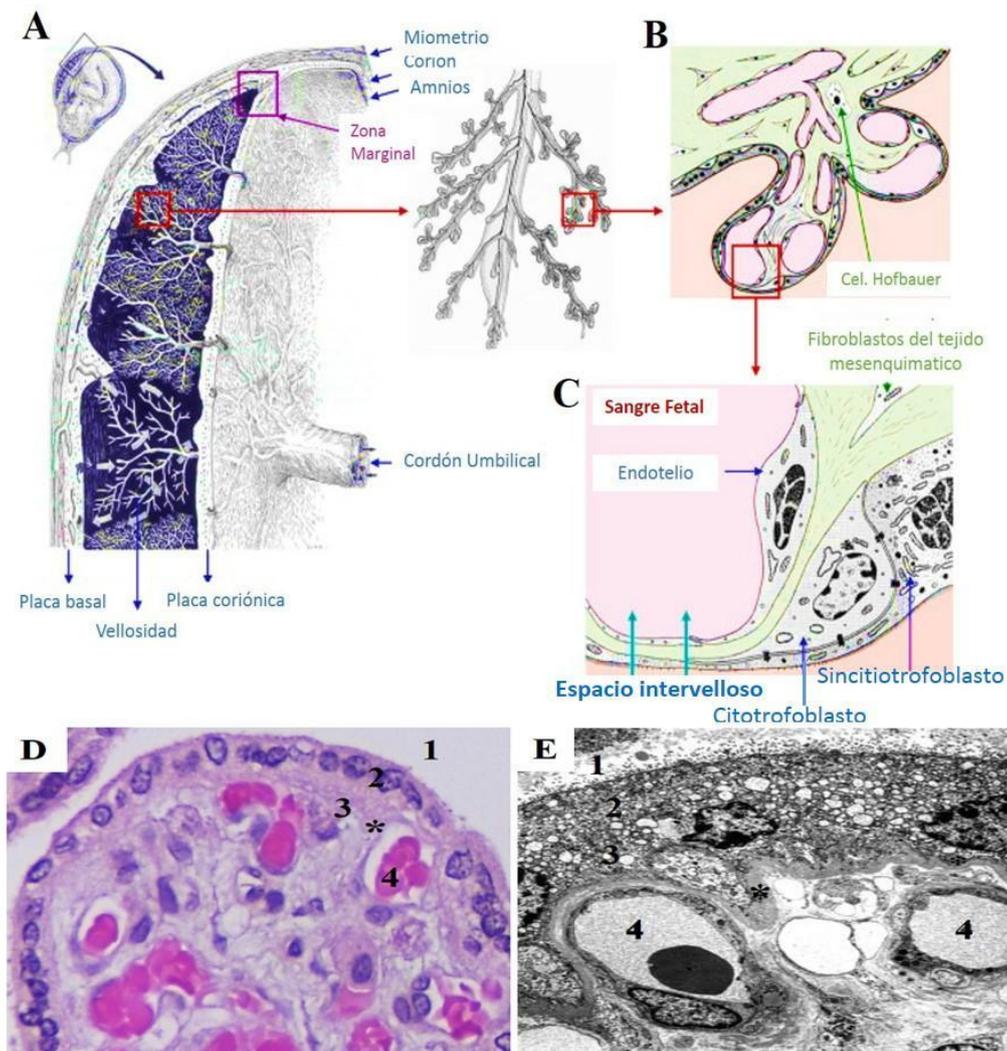


Figura 11. Estructura de la placenta humana. A) Esquema de la placenta humana a término, se observa desde cara materna, placa basal, vellosidades y placa coriónica, B) Vellosidades terminales, se muestran células Hofbauer en estroma placentario y se señala en rojo la barrera placentaria C) Barrera placentaria: esquema donde se muestra desde sangre fetal, endotelio, estroma, citotrofoblasto y sincitiotrofoblasto (Carlier y col., 2012), D) microfotografía óptica (H/E) y E) micrografía electrónica. En D y E se observa: el espacio intervelloso (1), trofoblasto formado por el sincitiotrofoblasto (2) y citotrofoblasto (3), lámina basal (asterisco), y vasos fetales (4) (Fretes y Kemmerling, 2012).

RESPUESTA INMUNE PLACENTARIA

Generalidades

El embarazo es una situación única de conexión entre la madre y el feto hemialogénico. Numerosos mecanismos fetales, maternos y placentarios funcionan en conjunto para proteger al feto del reconocimiento y el rechazo inmunológico. La placenta media el soporte hormonal, nutricional y de oxígeno al feto, a la vez que desempeña un importante papel inmunomodulador. Un embarazo exitoso implica interacciones complejas entre el trofoblasto fetal y las células inmunes deciduales maternas, que permiten que el embrión y luego el feto se desarrolle en el útero mientras el sistema inmunitario de la madre permanece en gran parte adecuado funcionalmente. Células asesinas naturales uterinas (uNK), células dendríticas inmaduras (iDC), células T y macrófagos contribuyen a la modulación del entorno uterino para mantener un embarazo a término (PrabhuDas y col., 2015).

Altas cantidades de citoquinas pro-inflamatorias (como IL-6, IL-15 y TNF) y quimioquinas (como CXCL10, CXCL8 y CCL2) se expresan en la placenta durante la implantación temprana. Estas citoquinas también pueden ser secretadas tanto por las células endometriales como por las células del sistema inmune que son reclutadas al sitio de implantación (Racicot y col., 2014). El trofoblasto y también macrófagos de la placenta producen estas citoquinas (Raghupathy, 2013). Las citoquinas anti-inflamatorias, IL-4 e IL-10, también son secretadas por el tejido placentario. Se ha demostrado, que ambos tipos de citoquinas, juegan un papel beneficioso en los procesos fisiológicos normales en la placenta. Éstos incluyen la invasión y diferenciación del trofoblasto, la proliferación placentaria y la angiogénesis (Raghupathy, 2013).

Un embarazo saludable depende de la capacidad del sistema inmune materno para cambiar y adaptarse a cada etapa específica del desarrollo (Mor y Cardenas, 2010). Existen tres estados inmunológicos distintos que corresponden a las etapas del desarrollo fetal (Fig. 12): primero, una etapa pro-inflamatoria que está asociada con la implantación y la placentación; segundo, una etapa anti-inflamatoria asociada con el crecimiento fetal; y tercero una segunda etapa pro-inflamatoria que es responsable del inicio del parto (Mor y Cardenas, 2010; 2011).

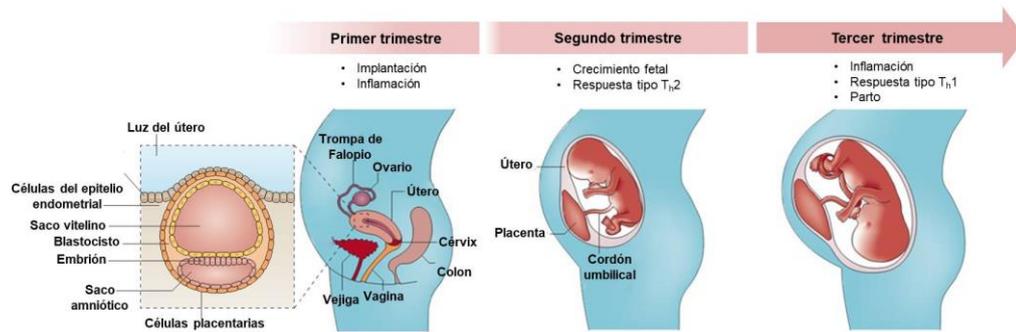


Figura 12. Las tres etapas inmunológicas del embarazo. El primer trimestre del embarazo está asociado con inflamación, la cual se requiere para la implantación del blastocistos. El segundo trimestre se caracteriza por un microambiente inmunitario anti-inflamatorio de tipo T helper 2 (TH2) necesario para el crecimiento fetal. En el tercer trimestre, hay un cambio a un estado inmune inflamatorio y de tipo TH1, que es necesario para el parto (modificado de Mor y col., 2017).

Implantación y placentación: etapa pro-inflamatoria. La unión inicial del blastocito al revestimiento epitelial del útero durante la implantación y la placentación ocurre con una reestructuración de la decidua por el trofoectodermo invasivo. La etapa de implantación y la placentación temprana se parecen al proceso de lesión tisular y posterior reparación. En el sitio de implantación, la inflamación se caracteriza por la presencia de IL-6, IL-8, IL-15, granulocitos, factor estimulante de colonias de macrófagos (GM-CSF), ligando de quimioquina CX 1 (CXCL1), CC-quimioquina ligando 4 (CCL4), osteopontina y TNF, que derivan tanto de las células del estroma endometrial como de las células inmunes infiltrantes del trofoblasto. Este proceso pro-inflamatorio favorece la receptividad uterina del feto y determina el éxito de la implantación y la placentación temprana (Mor y col., 2017). Durante el proceso de invasión del trofoblasto, éste secreta metaloproteinasas (MMP) para degradar la matriz extracelular y son controladas por factores como IFN γ y TGF β (Cartwright y col., 2010).

Crecimiento fetal: etapa anti-inflamatoria. Posterior a la implantación y formación de la placenta se genera un estado en el cual la madre, la placenta y el feto son simbióticos, y el medio predominante es del tipo TH2 o anti-inflamatorio. Este período es el más largo, por ello, muchos autores toman erróneamente al embarazo como un estado anti-inflamatorio total. Cualquier señal pro-inflamatoria en esta etapa, como una infección, puede conducir a un aborto espontáneo (Romero y col., 2007). Varios tipos de células inmunes (incluidas los macrófagos, células NK deciduales y células Treg) contribuyen al establecimiento de un microambiente anti-inflamatorio en esta etapa del embarazo. Macrófagos deciduales con fenotipo similar a macrófagos activados tipo 2, asociados con renovación tisular secretan predominantemente citoquinas anti-

inflamatorias. Debido a su alta capacidad fagocítica, los macrófagos deciduales eliminan eficientemente el trofoblasto dañado, evitando así la liberación de antígenos paternos, lo que podría desencadenar una respuesta inmune materna contra el feto (Mills y col., 2000; Abrahams y col., 2004). Las células Treg son participantes claves en el proceso de reparación de tejidos debido a su capacidad anti-inflamatoria y anti-apoptótica. Durante el embarazo, las células Treg tienen un papel central en el mantenimiento de un ambiente anti-inflamatorio al prevenir respuestas inmunes de tipo efector contra antígenos paternos. Una expansión sistémica de células Treg específicas para antígenos derivados del padre se observa al inicio del embarazo, lo que indica que su función es proteger las células fetales que expresan antígenos paternos del rechazo por el sistema inmune materno. Las células Treg están presentes en la decidua de mujeres embarazadas sanas, y persisten después del parto y se acumulan rápidamente durante embarazos posteriores. Esto indicaría una respuesta reguladora de tipo de memoria. Una población de células TH17 también está presente en el útero, y esta población se expande durante el embarazo. Como generalmente son de naturaleza pro-inflamatoria, estas células TH17 pueden ayudar a proteger la interfaz madre-feto de infecciones microbianas, mientras que las células Treg pueden servir para regular la función celular TH17 (Mor y col., 2017).

Trabajo de parto: etapa pro-inflamatoria. Luego del crecimiento fetal es necesario un cambio a un medio ambiente pro-inflamatorio para generar el parto. La ruta de señalización del NF- κ B ha sido demostrada como la iniciadora del parto. La afluencia de células inmunes en el miometrio es crucial para promover la contracción del útero, el nacimiento del bebé y la separación de la placenta (alumbramiento) (Mor y col., 2017).

Infección placentaria por patógenos

La respuesta inmune materna tiene que proteger tanto a la madre como al feto de infecciones graves, y a su vez, tolerar los tejidos fetales extraños que han invadido el útero. Las células trofoblásticas de la placenta humana, derivadas de la masa celular externa del blastocito, están en el centro de este equilibrio entre una respuesta a la infección y la tolerancia de la concepción (Heerema-McKenney, 2018).

Una infección placentaria capaz de provocar la producción de citoquinas inflamatorias, como TNF α , IFN γ , IL-12 y altos niveles de IL-6, activará el sistema inmune materno y podría provocar daño placentario y aborto o parto prematuro (Mor y Cárdenas, 2010).

El sincitiotrofoblasto es una barrera altamente efectiva que, sin embargo, no se mantiene intacto debido a la acción de los agentes patógenos presentes en el espacio interveloso (Castillo y col., 2012; Triquell y col., 2018). Durante la implantación y la placentación temprana, el trofoblasto tiene un papel activo en la configuración del medio inmunológico en el sitio de implantación atrayendo y educando las células inmunes, y dando forma a la respuesta posterior de las células inmunes a estímulos externos. Se ha demostrado, que las células del trofoblasto tienen la capacidad de sentir y responder a su microambiente expresando receptores en la superficie celular como receptores tipo Toll (TLR) y receptores tipo NOD (NLR). Estos receptores son capaces de reconocer los patrones moleculares asociados a daño (DAMP) que son liberados por células y tejidos dañados, así como patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP) tales como; bacterias, virus y otros microorganismos (Heerema-McKenney, 2018). Las células trofoblásticas responden a la invasión de microorganismos secretando IL-1 β , IL-6, IL-8 y TNF α , como así también IL-10 (Tomlinson y col., 2019). Trabajos con líneas celulares derivadas del trofoblasto, como BeWo y JEG3, han mostrado su capacidad de respuesta, con secreción de TNF α , IL-1 β , IFN γ e IL-10, frente a infecciones de *Plasmodium falciparum* y *Toxoplasma gondii* (Vásquez y col., 2013; Castro y col., 2013; Barbosa y col., 2015).

Se han descrito tres tipos de mecanismos de defensa en la inmunidad innata: barreras anatómicas, como la barrera placentaria; respuesta inmune innata celular; y respuesta inmune innata humoral. Durante la invasión al tejido, el patógeno rompe la barrera anatómica, y las células inmunes innatas se activan y secretan citoquinas y quimioquinas para controlar la replicación del patógeno. La barrera placentaria es parte de esta defensa inmune innata (Kemmerling y col., 2019).

Sin embargo, algunos microorganismos, como *T. cruzi*, pueden pasar la barrera placentaria e infectar al feto, causando la transmisión congénita de Chagas (Bittencourt y col., 1992; Carlier y col., 2012; Fretes y Kemmerling, 2012; Liempi y col., 2016).

Infección placentaria por *Trypanosoma cruzi*

Durante la transmisión congénita de Chagas, el *T. cruzi* debe atravesar la barrera placentaria para infectar al feto en desarrollo (Liempi y col., 2016).

El trofoblasto constituye una barrera potencial para evitar la penetración de *T. cruzi* (Bittencourt, 1976; Carlier y Truyens, 2010; Kemmerling y col., 2019). El estudio histopatológico de casos de Chagas congénito mostró parásitos tanto en el trofoblasto como en el estroma veloso (Bittencourt, 1976; Bittencourt y col., 1988). Alteraciones

del trofoblasto y procesos inflamatorios han sido observados en placentas provenientes de madres infectadas con *T. cruzi* con y sin transmisión congénita (Fretes y Kemmerling, 2012). Se ha demostrado que la presencia de la barrera placentaria es importante ya que la remoción del sincitiotrofoblasto de la vellosidad placentaria facilita significativamente la infección por *T. cruzi* (Díaz-Luján y col., 2016).

Un estudio transcriptómico de placentas chagásicas ha mostrado un aumento de expresión de genes relacionados a la respuesta inflamatoria y la activación linfocítica, como así también de genes asociados al metabolismo de lípidos (Juiz y col., 2018). Un estudio similar, pero en un modelo de tejido placentario humano *ex vivo* infectado con el parásito muestra que el efecto sobre la respuesta del sistema inmune es particularmente relevante. El parásito cambia drásticamente la expresión de los genes del hospedador involucrados en la respuesta inmune, incrementando la expresión de un número importante de genes de inmunidad innata (Castillo y col., 2018).

Dado que los patógenos expresan múltiples PAMP que actúan como agonistas de los TLR, el resultado de la infección placentaria es un perfil de citoquina/quimioquina TH1-TH2 único, complejo y superpuesto. En explantos, *T. cruzi* induce un aumento de los niveles de citoquinas liberadas al medio de cultivo, específicamente de IL-1 β , IL-6, TNF α , IL-8 e IL-10 en las primeras 2 h de interacción (Castillo y col., 2017).

Factor de transcripción NF-kB en la infección de explantos placentarios por *T. cruzi*

Se ha reportado que NF-kB es esencial para la inmunidad innata (Bonizzi y Karin, 2004; Perkins, 2007; Lawrence, 2009; Ghosh y Dass, 2016). Posee dos vías de activación, una clásica y una alternativa. La vía clásica de NF-kB se activa mediante una variedad de señales inflamatorias, lo que resulta en una expresión coordinada de múltiples genes que codifican a proteínas implicadas en la respuesta inmune inflamatoria e innata como TNF- α , IL-1 β , IL-6, MMP-9 y NO (Zoltan y col., 2015), las citoquinas pro-inflamatorias IL-1 β y TNF α activan NF-kB, y su expresión se induce en respuesta a la activación de NF-kB, formando así un circuito amplificador de alimentación positiva. La vía alternativa de NF-kB produce síntesis de quimiocinas y expresión de genes participante en la organogénesis (Bonizzi y Karin, 2004). Una extensa lista de bacterias y productos bacterianos activan NF-kB en macrófagos y otros tipos de células. Estas respuestas dependientes de NF-kB no se limitan a las bacterias; la invasión de células endoteliales por el parásito protozoario *T. cruzi* también activa NF-kB, y está asociada con un aumento de la expresión de moléculas

de adhesión, NO, TNF α , IL-12, IL-1 β , IL-33 e IL-18 (Petersen y col., 2006; Silva y col., 2010; Gutierrez, 2011).

Recientemente se ha descrito la participación del NF-kB en la infección de explantos placentarios por *T. cruzi*. Liempi y col. determinaron que tanto la vía canónica como la no canónica del NF-kB se activan en presencia del parásito utilizando un modelo de infección de 10 min con 10⁵ tripomastigotes de la cepa Y (Liempi y col., 2019). A su vez, observaron que al inhibir tanto la vía clásica como la alternativa, durante 2 h previo a la infección, la carga parasitaria aumentaba en relación al control sin tratamiento (Liempi y col., 2019).

En resumen, la activación de NF-kB frente a la infección por *T. cruzi* en diferentes hospederos conduce a un incremento en la expresión de citoquinas como TNF α , IL-1 β e IL-6 e IL-18 y moléculas efectoras como NO, ROS y MMPs. En placenta, NF-kB participa regulando estas citoquinas para alcanzar un embarazo exitoso y en el caso de infección patógena, responder protegiendo al feto.

HIPÓTESIS
OBJETIVOS



Hipótesis

El proceso de invasión y multiplicación de *T. cruzi* en la barrera placentaria es mediado por citoquinas y moléculas efectoras del sistema inmune.

Objetivo general

Establecer la contribución de moléculas mediadoras y efectoras del sistema inmune producidas por la placenta en el control de la infección por *T. cruzi*.

Objetivos específicos

1. Identificación de moléculas efectoras de la respuesta inmune durante el proceso de invasión del *T. cruzi* en el tejido placentario y la línea celular BeWo derivada de trofoblasto.
2. Determinación de citoquinas y óxido nítrico durante los procesos de invasión y multiplicación del *T. cruzi* en el tejido placentario y la línea celular BeWo derivada de trofoblasto.
3. Determinación del efecto del tratamiento con IFN γ en la infección de tejido placentario por *T. cruzi*.
4. Análisis del efecto regulatorio sobre la actividad del factor de transcripción NF- κ B en la infección de tejido placentario por *T. cruzi*.

MATERIALES

Y MÉTODOS



1. Tripomastigotes

Se utilizaron tripomastigotes de *Trypanosoma cruzi* de la cepa Tulahuen perteneciente al DTU VI (Diaz-Lujan y col., 2012). Los tripomastigotes se obtuvieron de ratones Albino swiss infectados, los cuales fueron sangrados en el día del pico de la parasitemia (Fretes y Fabro 1990). Estos tripomastigotes se utilizaron para infectar células Vero, en las que se mantuvo la infección *in vitro*. Los parásitos se aislaron de la sangre de los ratones mediante centrifugación a 900 rpm, se estacionaron durante 1 h a 37 °C para permitir que los parásitos se concentren en el plasma y luego el plasma se centrifugó nuevamente a 2.000 rpm, obteniendo el pellet de tripomastigotes. Además, se obtuvieron tripomastigotes de los sobrenadantes de cultivos, provenientes de células Vero infectadas con *T. cruzi*, cultivadas en frascos T (Greiner) de 75 cm³, a pH 7,35, 37 °C y con 5% de CO₂, obteniendo cantidades significativas de formas tripomastigotes para los experimentos.

2. Placentas

Se utilizaron 20 placentas obtenidas por cesárea de embarazadas normales provistas por el Sanatorio Allende, Hospital Privado y Maternidad Nacional de la ciudad de Córdoba. Se efectuó 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 la investigación se obtuvo el consentimiento informado de las embarazadas, confirmando su voluntad de donar las placentas para la investigación. Los criterios de inclusión fueron placentas provenientes de embarazadas con serologías negativas para enfermedades infecto-contagiosas y sin antecedentes clínicos de patologías del embarazo.

Las placentas, se trasladaron al Instituto de Biología Celular, inmediatamente después de la cesárea, manteniendo la esterilidad. En el laboratorio se procesaron bajo campana de flujo laminar. De la cara materna de la placenta se removieron varios cotiledones los que se limpiaron de membranas coriónicas basales, obteniéndose vellosidades coriónicas de la zona central de los cotiledones (Fretes y Fabro, 1990). Éstas se lavaron sucesivamente con solución fisiológica hasta quedar libres de sangre. Se cortaron muestras de las vellosidades con bisturí, de un tamaño de 2 a 3 mm de largo, con un peso fresco promedio aproximado de 0,030 – 0,050 g.

3. Línea celular BeWo

La línea celular BeWo derivada de coriocarcinoma de crecimiento en adherencia (Pattillo y col., 1968) fue donada por la Dra. Ulrike Kemmerling Weis del Programa de Anatomía y Biología del Desarrollo, ICBM, Facultad de Medicina, Universidad de Chile. Esta línea celular fue adquirida en ATCC (ATCC® CCL-98™). Las células se cultivaron en frascos T (Greiner) de 75 cm³, a pH 7,35, 37 °C y con 5% de CO₂.

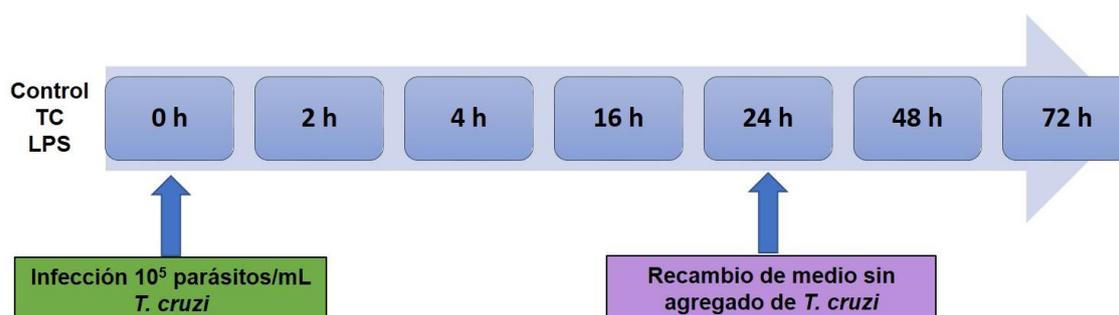
4. Medios de cultivo

Para el crecimiento de las células Vero se utilizó medio DMEM (Sigma-Aldrich, EE. UU.), suplementado al 5% (v/v) con suero bovino fetal (SBF) (Natocor). Para el cultivo de las células BeWo, se empleó medio Ham's F12 (Sigma-Aldrich) suplementado al 10% (v/v) con SBF. Los explantos placentarios se cultivaron en DMEM suplementado al 10% (v/v) con SBF.

5. Sistema de cultivo

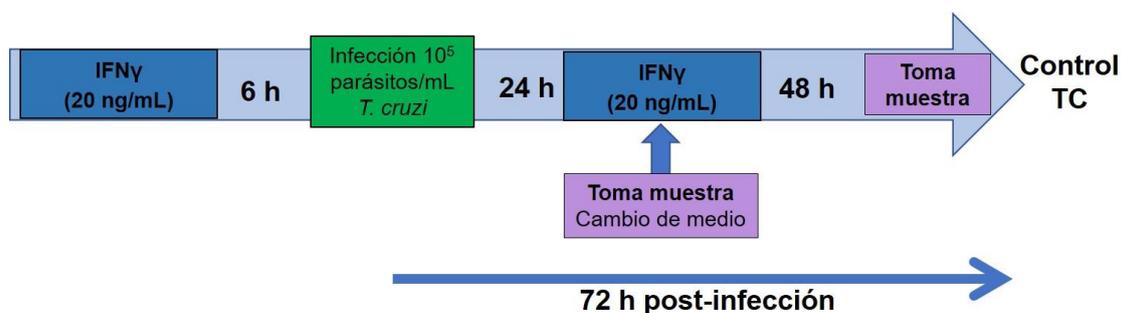
5.1 Explantos placentarios

Se efectuaron cultivos independientes de vellosidades coriónicas con 10⁵ tripomastigotes de *T. cruzi* de la cepa Tulahuen/mL, empleando medio de cultivo DMEM, pH 7,35; 10% de SBF inactivado a 56°C durante 30 min (para inactivar el sistema del Complemento), con 5% de CO₂ y humedad adecuada, en placas de cultivo (Greiner) de 24 pozos estériles en los que se colocaron 4 explantos vellositarios. Los tiempos de cultivo fueron 0, 2, 4, 16, 24, 48 y 72 h post-infección. A las 24 h de iniciado el cultivo, se llevó a cabo un cambio de medio de cultivo celular (Esquema 1).



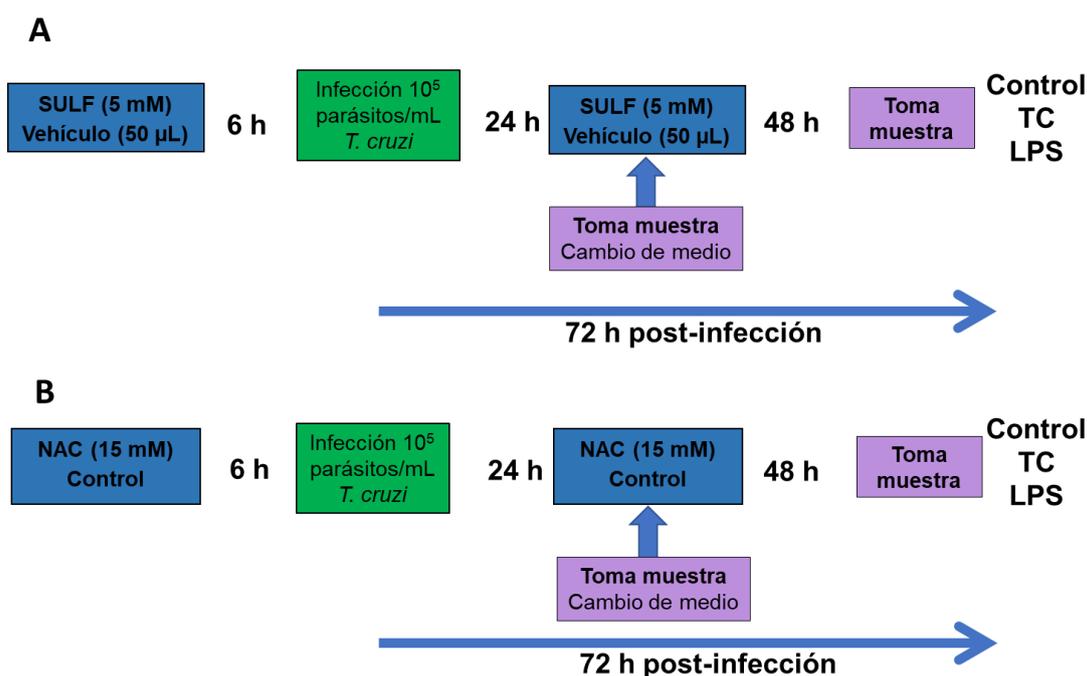
Esquema 1. Diagrama de flujo del ensayo de cinética de infección de explantos placentarios con *T. cruzi*. En celeste se muestra los distintos tiempos de toma de muestra. Se utilizaron 3 condiciones experimentales: infección con *T. cruzi* (TC), sin infección (control negativo) y cultivo con LPS (control positivo).

Se realizó otro grupo de experimentos, en los cuales los explantos fueron incubados con IFN γ humano recombinante. Los explantos se trataron con IFN γ (20 ng/mL) durante 6 h previas a la infección y, posteriormente se expusieron al parásito en las mismas concentraciones anteriormente utilizadas, con tiempos de cultivo de 24 y 72 h post-infección (Esquema 2).



Esquema 2. Diagrama de flujo del tratamiento con IFN γ en explantos placentarios infectados con *T. cruzi*. En violeta los distintos tiempos de toma de muestra (24 y 72 h). Se utilizaron 2 condiciones experimentales, infección con *T. cruzi* (TC) y sin infección (control negativo).

Otro conjunto de experimentos se llevó a cabo para disminuir la actividad del factor NF- κ B, y la producción de citoquinas pro-inflamatorias, mediante el uso de SULF o NAC en concentraciones de 5 mM y 15 mM, respectivamente. Estas concentraciones de SULF o NAC inhiben la actividad del NF- κ B en explantos placentarios cultivados en condiciones similares a las utilizadas por nosotros en los experimentos control (Lappas y col., 2002; 2004). Teniendo en cuenta que SULF debe resuspenderse en un medio no acuoso (DMSO) se realizaron ensayos similares utilizando el mismo volumen de DMSO, como vehículo control, que se utilizó para alcanzar la concentración final de SULF (50 μ L). Los explantos se trataron durante 6 h previas a la infección con SULF, NAC, vehículo o sin tratamiento y, posteriormente se expusieron al parásito en las mismas condiciones anteriormente utilizadas, con tiempos de cultivo de 24 y 72 h post-infección (Esquema 3).



Esquema 3. Diagrama de flujo del tratamiento con SULF (A) o NAC (B) en explantos placentarios infectados con *T. cruzi*. En violeta los distintos tiempos de toma de muestra. Se utilizaron 3 condiciones experimentales: infección con *T. cruzi* (TC), sin infección (control negativo) y cultivo con LPS (control positivo).

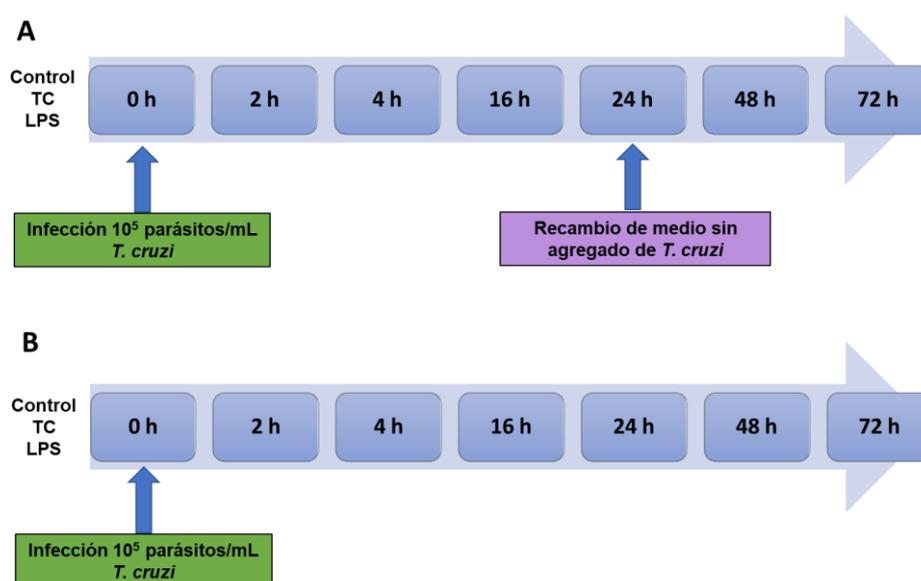
En todos los ensayos, se utilizó como control explantos placentarios cultivados sin la presencia del parásito y sin tratamiento, y como control positivo, explantos cultivados con LPS (Sigma-Aldrich, 1 µg/mL).

Se evaluó la toxicidad de SULF, NAC, DMSO e IFN γ , sobre los parásitos y el tejido placentario. Para ello, se incubaron 10⁵ tripomastigotes de *T. cruzi*/mL durante 2 h en los medios con las mismas concentraciones del fármaco y vehículo utilizados en los ensayos. Posteriormente, se realizó recuento de parásitos móviles en cámara de Neubauer con colorantes intravital (azul tripán) y determinación de viabilidad por (1-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-3,5-diphenilformazan (MTT) (punto 9.5). En los explantos se utilizó la misma técnica de viabilidad por MTT.

Al término de los tiempos establecidos de cultivo, se colectaron los explantos, se fijaron por inmersión en una solución de formol bufferado al 10% para su posterior estudio histológico o se congelaron a -80°C para realizar la extracción de ARN, ADN y proteínas. Los medios de cultivo, se centrifugaron a 3.500 rpm por 15 min y los sobrenadantes se reservaron a -80°C para la medición de citoquinas, urea, nitritos y gonadotropina coriónica humana beta (β -hCG).

5.2 Línea celular BeWo

La línea celular BeWo (ATCC® CCL-98™) es derivada de coriocarcinoma y posee la capacidad de crecer en forma de células mononucleadas (BeWo), con características de citotrofoblasto, o formando estructuras sinciciales multinucleadas (BeWo ST), con características similares a sincitiotrofoblasto, en presencia de reactivos inductores de unión intercelular como forskolina (FsK) (Al-Nasiry y col., 2006). En estos ensayos se utilizaron los dos tipos de cultivo. Se plaquearon 50.000 células/pozo, se las dejó en adherencia durante 24 h y posteriormente se las trató con FsK (Santa Cruz Biotechnology, 50 uM) durante 48 h para favorecer la formación de estructuras sincicializadas. Se realizaron cultivos independientes de células BeWo y BeWo ST en interacción con tripomastigotes de *T. cruzi* de la cepa Tulahuen en una relación (1:1), empleando medio de cultivo Ham's F12, suplementado al 10% (v/v) con SBF inactivado a 56°C durante 30 min, con 5% de CO₂ y humedad adecuada, en placas de cultivo (Greiner) de 24 pozos estériles. Los tiempos de cultivo fueron 0, 2, 4, 16, 24, 48 y 72 h post-infección. Se trabajó con un grupo experimental con cambio de medio a las 24 h y otro sin cambio. Como control negativo, se utilizaron células cultivadas sin la presencia del parásito y como control positivo, células cultivadas con LPS (1 µg/mL) (Esquema 4).



Esquema 4. Diagrama de flujo del ensayo de cinética de infección de células BeWo y BeWo ST con *T. cruzi*. En celeste los distintos tiempos de toma de muestra. Se utilizaron 3 condiciones experimentales: infección con *T. cruzi* (TC), sin infección (control negativo) y cultivo con LPS (control positivo). Se realizó un ensayo con cambio de medio a las 24 h (A) y otro sin cambio de medio (B).

En otro sistema experimental, se incubaron tripomastigotes de *T. cruzi* durante 10 h a 37° C con distintos medios de cultivos y se analizó la viabilidad del parásito por test de movilidad. Se utilizaron medios condicionados del cultivo de células BeWo y BeWo ST, y como control se utilizó medio de cultivo fresco DMEM suplementado con SBF al 10%.

6. Cuantificación parasitaria

6.1 Recuento de parásitos móviles en medio de cultivo

La viabilidad parasitaria se determinó mediante el test de motilidad y exclusión de colorantes intravitales (Giemsa o azul tripán) y recuento en cámara de Neubauer, expresados como parásitos móviles totales y como media \pm EEM.

6.2 Recuento de la carga parasitaria en explantos placentarios

6.2.1 Multiplex Taqman PCR cuantitativa absoluta

6.2.1.1 Extracción de ADN genómico de explantos placentarios

Para la cuantificación de la carga parasitaria en los explantos placentarios, se extrajo su ADN tanto en los cultivados con tripomastigotes de *T. cruzi* y como en los sin cultivo con tripomastigotes (explantos controles) usados como control negativo del procedimiento. Para las extracciones se utilizó el protocolo del Kit de High Pure PCR template Preparation (Roche Diagnostic Corp., Indianapolis, IN). Para ello, en un tubo de microcentrifuga de 1,5 mL se agregó: la muestra, 200 μ L de buffer lisis de tejido y 40 μ L de proteinasa K reconstituida; se mezcló e inmediatamente se incubó por 1 h a 55 °C o hasta que el tejido se lisó completamente. Posteriormente, se adicionó 200 μ L de buffer astringente, se mezcló e incubó por 10 min a 70 °C. Luego se adicionó 100 μ L de isopropanol y se mezcló. Seguidamente, se ensambló un tubo con filtro en un tubo de colección al cual se agregó la muestra líquida y se centrifugó 1 min a 8.000 rpm. Después de la centrifugación, se removió el tubo con filtro del tubo de colección, y se ensambló el tubo con filtro en un nuevo tubo de colección, al cual se le adicionó 500 μ L de buffer de eliminación de inhibidores y se centrifugó 1 min a 8.000 rpm. Nuevamente, se removió el tubo con filtro del tubo de colección y se ensambló un nuevo tubo de colección y se adicionó 500 μ L de buffer de lavado, el cual se centrifugó 1 min a 8.000 rpm. Después se descartó el líquido y nuevamente se centrifugó el ensamblado por 10 s a 13.000 rpm. Para la elución del ADN, se insertó el tubo con filtro en un tubo de microcentrifuga de 1,5 mL estéril, y se adicionó 200 μ L de buffer de

elución precalentado a 70 °C según protocolo. El ensamblado se centrifugó por 1 min a 8.000 rpm. El ADN eluído se cuantificó empleando un espectrofotómetro NanoDrop Thermo Scientific™ modelo 2000. Finalmente la muestra se almacenó a -80 °C hasta su análisis posterior.

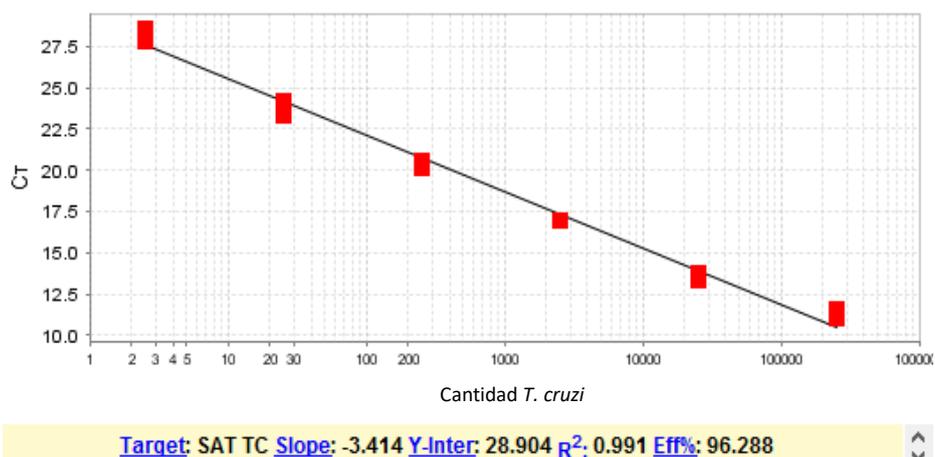
6.2.1.2 PCR en tiempo real

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

Tabla 1. Secuencias de cebadores empleados para la determinación de *T. cruzi*.

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

La curva estándar se construyó determinando el ciclo crítico (Ct) en muestras testigos, preparadas a partir de diluciones 1/10 de una muestra de 200 mg de explantos a la que se le agregó 10⁶ tripomastigotes de *T. cruzi* y de la cual se purificó ADN retomándolo en un volumen total de 200 µL. Las reacciones de qPCR se realizaron por triplicado usando 5 µL de cada dilución equivalentes a 250.000; 25.000; 2.500; 250; 25 y 2,5 parásitos en cada punto de la curva estándar. En el esquema 5 se muestra la curva obtenida.



Esquema 5. Curva estándar de ADN de explantos placentarios infectados con diferentes cantidades de *T. cruzi*. Diluciones seriadas 1/10 comenzando de 250.000 a 2,5 parásitos con su respectivo Ct.

Para cada condición experimental se purificó el ADN en un volumen final de 200 μL , se cuantificó su concentración y se emplearon 5 μL de cada muestra en la reacción de qPCR. A partir del Ct obtenido, se calculó la cantidad de parásitos en los explantos por interpolación en la curva estándar. La cantidad de parásitos en toda la muestra se calculó de la siguiente manera:

$$n1 = \frac{n^{\circ} \text{ de parásitos calculados según Ct} \times 200 \text{ (volumen total de ADN extraído)}}{5 \text{ (volumen empleado en la reacción de qPCR)}}$$

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

$$\text{Parásito por ng de ADN total} = \frac{n1}{\text{ng totales de ADN}}$$

6.2.2 Tinción de nidos de amastigotes intraplacentarios

Las muestras de vellosidades placentarias luego de colectadas, se fijaron en formol 10%, se deshidrataron en una serie graduada de etanol (50°, 70°, 96°, 100°) durante 15 min en cada paso, hasta llegar a xilol. Se incluyeron en parafina y se

realizaron cortes seriados (5 μm) que se desparafinaron e hidrataron usando xilol y una serie graduada de etanol hasta buffer fosfato salino (PBS). Se tiñeron con Hematoxilina/Eosina para tinción de núcleos, posteriormente se visualizaron y fotografiaron en Video Microscopio Zeiss, empleando el software Image J.

6.3 Recuento de la carga parasitaria intracelular en células BeWo

6.3.1 Tinción Giemsa

Para la visualización de los nidos de amastigotes se utilizó el colorante Giemsa para tinción de núcleos. Las células BeWo se plaquearon sobre portaobjetos circulares en placas de 24 pozos y se trataron como se explicó anteriormente (ítem 5.2). Finalizado el experimento de infección, se lavaron 3 veces con PBS y se fijaron 10 min en metanol a -20°C . Posteriormente, las improntas se lavaron con agua y se tiñeron con una solución de Giemsa preparada a partir de 1 volumen de la solución colorante más 9 volúmenes de solución tampón (PBS, pH 6.8) durante 6-7 min. Luego, se lavaron con abundante agua para eliminar exceso del colorante, se deshidrataron con xilol y se montaron sobre un portaobjeto con líquido de montaje. Las preparaciones se observaron y fotografiaron en el microscopio Video Microscopio Zeiss.

6.3.2 Tinción con Hoechst

Luego de realizar las infecciones, las células se fijaron durante 10 min a -20°C en metanol. La autofluorescencia fue disminuida mediante la incubación de las células con NH_4Cl 10 mM durante 10 min y se realizó la tinción con el marcador nuclear Hoechst 33342 en una concentración de 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (en PBS) durante 15 min. Posteriormente, se observó la morfología nuclear en un microscopio de fluorescencia (CARL ZEISS axio scope A1). De esta manera, se identificaron y cuantificaron los nidos de amastigotes intracelulares debido a la tinción del kinetoplasto y el núcleo parasitario. Los resultados se expresan como amastigotes/núcleo de células BeWo o BeWo ST y como media \pm EEM.

7. Procesamiento histológico

Las muestras de vellosidades placentarias se procesaron como se explica en el ítem 6.2.2. Algunos cortes se tiñeron con Hematoxilina/Eosina y otros se procesaron mediante inmunohistoquímica, que se detallan en 7.1.

7.1 Inmunohistoquímica

En los tejidos placentarios se analizó la localización de la expresión proteica de MIF, TNF α , IFN γ , IL-1 β , IL-6 e IL-10 mediante inmunohistoquímica. Los cortes del material se desparafinaron con xilol y rehidrataron en una serie sucesiva de etanol (100°, 96°, 70°, 50°) hasta llegar a PBS 1X pH 7,3. La actividad peroxidasa endógena se bloqueó con peróxido de hidrógeno 3% en PBS por 15 min. Los sitios de unión inespecífica de las inmunoglobulinas se bloquearon pre-incubando las muestras durante 15 min con 5% de SBF diluido en PBS, y luego se lavaron 3 veces con PBS.

Los cortes se incubaron con los anticuerpos primarios [monoclonal hecho en ratón anti MIF humano (ab55445, Cambridge, UK), monoclonal hecho en ratón anti TNF α humano (BMS154, eBioscience, USA), monoclonal hecho en ratón anti IFN γ humano (clone MD-1, Affymetrix, USA), monoclonal hecho en ratón anti IL-1 β humana (sc-32294, Santa Cruz biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA, USA), monoclonal hecho en ratón anti IL-6 humana (ab9324, Cambridge, UK) y policlonal hecho en conejo anti IL-10 humana (ab34843, Cambridge, UK)], durante la noche a 4°C. Luego de descartar el anticuerpo primario y secar alrededor del corte, se colocó el anticuerpo secundario específico para cada anticuerpo primario usado en PBS por 30 min a temperatura ambiente. Las improntas se lavaron 3 veces con PBS y luego se secaron.

Se colocó la peroxidasa conjugada con estreptavidina por 20 min 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 (H₂O₂) 0,3% en Buffer Tris 0,05 M pH 7,6 controlando en microscopio hasta obtener coloración, aproximadamente 1 min. Todas las incubaciones se realizaron en cámara húmeda. Luego de varios lavados con agua destilada se contrastó con hematoxilina (BIOPUR) por 1 min, se deshidrató, clarificó y se montó con medio de montaje Canadax BIOPUR. Se realizó el control de la 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*. Como control positivo se utilizó un tejido donde se expresa la citoquina analizada.

La semicuantificación de la marca positiva obtenida se realizó en un Video Microscopio Zeiss. Mediante el software FIJI/Image J (https://imagej.net/Colour_Deconvolution), se realizó el análisis y cuantificación de la expresión de MIF, TNF α , IFN γ , IL-1 β , IL-6 e IL-10 humano en las vellosidades placentarias, marcadas con el vector cromogénico DAB, que colorea el tejido en color marrón. Primeramente, se seleccionó la imagen (compuesta por tres canales: rojo,

verde y azul, RGB) a analizar, mediante el plugin “Colour deconvolution”, el programa separa la imagen en tres matrices de color monocromo (RGB). Luego, se seleccionó la imagen de color marrón (correspondiente al revelado con DAB) y se le dio 8 bits de resolución. Posteriormente, mediante el comando “threshold” se generó una nueva imagen en blanco y negro. El color blanco representa un valor 0 (ausencia de marcación) y el color negro, representa el valor máximo equivalente en el umbral a 255. Una vez seleccionado el rango de área positiva para cada uno de los anticuerpos se obtiene el valor seleccionando el comando “measure”.

Los resultados se expresaron como:

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

8. Cuantificación de la sincicialización por inmunofluorescencia en células BeWo

Se realizaron inmunofluorescencias para visualizar estructuras similares a STB en células BeWo. Se colocaron portaobjetos circulares estériles en placas de cultivo, previo a la siembra de las líneas celulares BeWo. Luego de transcurrido el tiempo necesario acorde al experimento realizado, los portaobjetos se colectaron, se lavaron 3 veces con PBS y se fijaron 10 min en metanol a -20°C. Inmediatamente, las células fijadas se permeabilizaron con PBS-tritón 0,01% durante 10 min a temperatura ambiente y se hicieron 3 lavados en PBS de 5 min. Para evitar uniones inespecíficas de los anticuerpos primarios, se bloqueó con PBS 1X-albúmina 5% durante 1 h a temperatura ambiente. Los portaobjetos se incubaron en cámara húmeda con el anticuerpo primario hecho en ratón anti-desmoplaquina una dilución final 1/100 (Sigma) a temperatura ambiente durante 1-2 h. Las células se lavaron 5 veces en PBS-tween (PBS-T) por 5 min y se repitió el protocolo de bloqueo. El anticuerpo secundario anti-IgG de ratón (rojo, Alexa Fluor 647) se diluyó 1/100 final en PBS 1X-albúmina 1% y se incubó 1 h a 37°C en atmósfera húmeda. Los núcleos se tiñeron con Hoechst (5 µg/mL) durante 15 min. Por último, los vidrios se lavaron 5 veces con PBS-tritón y se colocaron invertidos sobre una gota de líquido de montaje acuoso con protector de fluoróforos (FluorSafe, Calbiochem). Las preparaciones se observaron en el microscopio de fluorescencia CARL ZEISS axioscope A1 y se tomaron fotos con dos filtros para cuantificar infección y se calculó % de sincicialización:

$$\% \text{ sincialización} = \frac{n^{\circ} \text{ núcleos en sincialización}}{n^{\circ} \text{ núcleos totales}} \times 100$$

A su vez, se determinó el índice de fusión como,

$$\text{Índice de fusión} = \frac{(n^{\circ} \text{ de núcleos en sincialización} - n^{\circ} \text{ de sincitios totales})}{n^{\circ} \text{ de núcleos totales}} \times 100$$

9. Determinaciones analíticas

9.1. Determinación de NO

En los sobrenadantes de los cultivos de explantos placentarios y células BeWo se midió la producción de NO utilizando reactivo de Griess para medir nitritos y posteriormente se procedió a la lectura del producto de reacción a 540 nm en lector de ELISA (Green y col., 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 (H₃PO₄). Una curva patrón de nitritos se realizó con soluciones de NaNO₂ en las siguientes concentraciones: 100; 50; 25; 12,5; 6,25; 3,13; 1,56 μM. Para el blanco de reacción se utilizó 50 μL de H₂O bidestilada más 50 μL de reactivo de Griess.

Cincuenta μL de muestra (tanto para el estándar como para la muestra problema) más 50 μL de reactivo de Griess (solución A + solución B, preparado en el momento de ser usado) se incubaron en oscuridad durante 10 min y el producto de la reacción se leyó en lector de placa de Elisa Glomax, a 540 nm. Las concentraciones de las muestras problemas se obtuvieron aplicando la fórmula obtenida de la línea de regresión que se realizó con los valores de la curva patrón. Los resultados se expresaron en μM y como media ± EEM.

9.2 Determinación de gonadotrofina coriónica humana beta (β-hCG)

Para determinar la capacidad de sincialización de las células BeWo incubadas con forskolina, se cuantificaron los niveles de β-hCG en los medios sobrenadantes de cultivo, empleando un inmunoensayo automatizado estándar específico para la hormona humana. Este consistió en un ensayo inmunométrico quimioluminiscente de fase sólida, con un límite de detección 1,1 mUI/mL (Immulite Siemens, Munich, Alemania). La misma se realizó en la Fundación Para el Progreso de la Medicina-Córdoba. Los resultados se expresaron como mUI/mL.célula y como media ± EEM.

9.3 Cuantificación de urea

En los sobrenadantes de los cultivos de explantos placentarios tratados con IFN γ humano recombinante previo a la infección con *T. cruzi*, se midió la producción de urea utilizando un kit comercial (Uremia, Wiener, Argentina). El sistema reactivo está basado en una reacción enzimática de descomposición específica de la urea, mediante el agregado de ureasa, produciendo dióxido de carbono y amoníaco; éste reacciona con fenol e hipoclorito, en medio alcalino, produciendo azul de indofenol que se determina colorimétricamente. La cuantificación se realizó con una solución de urea patrón de concentración conocida. Para el blanco de reacción se utilizó 20 μ L H $_2$ O bidestilada más el reactivo del kit.

Veinte μ L de muestra (tanto para el estándar como para la muestra problema) más 1 gota de ureasa (provista por el kit) se incubaron durante 5 min a 37°C, posteriormente, se agregó 1 mL de reactivo A y 1 mL de reactivo B y se incubó durante 5 min a 37°C. La reacción se frenó con 10 mL de agua bidestilada y se leyó en lector de placa de Elisa Glomax, a 540 nm. La absorbancia del blanco se restó al estándar y a las muestras. Las concentraciones de las muestras problemas se obtuvieron aplicando el factor obtenido de la absorbancia de la solución patrón y su concentración conocida. Los resultados se expresaron como g/L relativo al control y como media \pm EEM.

9.4 Producción de las especies reactivas del oxígeno (ROS)

El análisis de las ROS en las células trofoblásticas BeWo se llevó a cabo por la reacción de la DCFHDA (6-carboxy-2'-7'- diclorofluoresceína diacetato) (Sigma-Aldrich, St. Louis MO. USA). La DCFHDA es un derivado no fluorescente de la diclorofluoresceína que luego de ser incorporado en la célula se hidroliza a diclorofluorescina (DCFH), y en presencia de las ROS se oxida a diclorofluoresceína (DCF), altamente fluorescente. La intensidad de fluorescencia aumenta proporcionalmente al nivel de oxidantes celulares presentes. Para determinar la producción de ROS en nuestras muestras, 5 x 10 4 células BeWo se sembraron en placas de 24 pozos y se dejaron adherir por 24 h. Posteriormente se trataron con forskolina durante 48 h para inducir sincicialización. A continuación, se infectaron con tripomastigotes en una relación 1:1 durante 4 y 24 h. Posteriormente a la finalización de la infección, las muestras se trataron con DCFHDA (concentración final 1 μ M) por 30 min. Una vez terminada la reacción, las células se lavaron con PBS, se leyó la fluorescencia en lector Elisa Glomax (Ex: 488 nm- Em: 525 nm). Como control positivo

se trataron las células con H₂O₂. Los resultados se expresaron como intensidad fluorescencia/célula relativa al control y como media ± EEM.

9.5 Determinación de la viabilidad por MTT

La viabilidad de los explantos placentarios y parásitos, se midió mediante el ensayo de MTT (MTT, Sigma Aldrich M5655). Los explantos y parásitos se trataron con 100 µL de MTT a una concentración de 0,5 mg/mL, e incubaron durante dos horas a 37 °C. Durante este tiempo el MTT de color amarillo penetra en las células donde el anillo del tetrazolio es clivado por las deshidrogenasas de las mitocondrias produciendo formazan, un compuesto de color púrpura el cual es insoluble en agua (Berridge y col., 1996). Al cabo de las 2 h de incubación, los explantos se colocaron en un tubo de 1,5 mL, donde se agregó 150 µL de etanol para la extracción de los cristales de formazán. Posteriormente se tomó 100 µL del volumen del sobrenadante para pasarlo a una placa de 96 pozos. La reacción se leyó a una absorbancia de 590 nm. Los resultados se calcularon como la relación entre unidades arbitrarias/mg de tejido o unidades arbitrarias/parásitos totales y se expresaron como media ± EEM.

10. Análisis proteico

10.1 Cuantificación de la producción de TNFα, MIF, IL-1β, IFNγ, IL-4, IL-6 e IL-10

Los niveles de TNFα, MIF, IL-1β, IFNγ, IL-4, IL-6 e IL-10 humano presentes en sobrenadantes de los cultivos de explantos placentarios y de células BeWo, fueron determinados por ensayos de ELISA usando kits disponibles comercialmente BD OptEIA™ (BD Biosciences, Singapore) siguiendo el protocolo descrito por el fabricante. Brevemente, el anticuerpo específico para cada citoquina se absorbió en los pocillos de una placa (Costar Corp. Cambridge, MA). Las placas se lavaron con 0,05 % de PBS-tween y bloqueado con 1% de SBF en PBS-albúmina. Luego de la adición de 100 µL de la muestra, las placas se incubaron toda la noche a 4°C. Luego se lavaron e incubaron con el anticuerpo secundario de detección biotinilado y avidina-HRP conjugada. La absorción a 450 nm se determinó con corrección a 570 nm y el valor obtenido se interpoló en la curva del estándar. Las muestras se midieron por duplicado. El límite de sensibilidad del ensayo fue de 4 pg/mL. A partir de las concentraciones obtenidas de TNFα e IL-10 se calculó la relación citoquinas pro-inflamatorias/anti-inflamatorias para establecer que perfil inmunológico prevalece. La cuantificación de MIF en sobrenadantes de los cultivos de explantos placentarios se

realizó en el laboratorio del Dr. Ricardo Corral (Instituto multidisciplinario de investigaciones en patologías pediátricas-Buenos Aires).

10.2 Zimografía

10.2.1 Obtención de homogenato de tejidos provenientes de explantos placentarios

Los explantos placentarios conservados en freezer a -80°C , se homogeneizaron en 200 μL de buffer de lisis [50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl; 1% Nonidet P-40 (v/v); 25 mM NaF; 0,5% (p/v) sodio desoxicolato; 10% SDS (p/v), 1 mM EDTA; 1 mM fluoruro de fenilmetilsulfonilo; 1 mM ortovanadato, 10 mM sodio pirofosfato, suplementado con una mezcla de inhibidor de proteasas y fosfatasa (Roche, Mannheim, Germany)] con ruptura mecánica del tejido. Se determinó la cantidad de proteínas contenidas en el lisado celular, mediante el método de Lowry (Lowry y col., 1951).

10.2.2 Gel de corrida

La electroforesis en geles de poliacrilamida (PAGE) se desarrolló siguiendo esencialmente el método descrito por Laemmli (1970) (Laemmli, 1970), se utilizaron para el armado de los geles el sistema de electroforesis modular vertical Mini-Protean 3 (Bio-Rad, EUA.). Todos los geles se realizaron en condiciones desnaturizantes, agregando el detergente iónico SDS pero sin condiciones reductoras. Para ello, se utilizó un gel de apilamiento con una concentración de acrilamida/bisacrilamida del 10% (p/v) pero en lugar del agua se diluyó con gelatina en una concentración final en el gel de 0,8 mg/mL. La gelatina es el sustrato específico de las metaloproteinasas 2 y 9. Se utilizó un gel de separación con una concentración de acrilamida/bisacrilamida del 15% (p/v). Las muestras se prepararon con una solución de Tris HCl 0,125 M pH 6,8; SDS 4% (p/v), glicerol 20% (v/v), azul de bromofenol 0,05% (p/v), pH 6,8 (solución de siembra) en proporción 3:1. Las muestras se sembraron 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% (v/v)], 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.

10.2.3 Activación enzimática

Posterior a la corrida, los geles se desmontaron y se hicieron 3 lavados, de 15 min cada uno, con una solución renaturalizante de tritón 2,5% (v/v) en agua, que remueve el SDS que renaturaliza las proteínas que corrieron en el gel. Se realizó un

lavado con agua por 15 min. Luego, el gel se colocó en un tampón de incubación (Tris base 50 mM, CaCl 10 mM, pH: 7,4) a 37 °C toda la noche en el baño húmedo permitiendo que actúe la actividad gelatinasa de las metaloproteinasas. Posteriormente, el gel se fijó con tampón de fijado [metanol 50% (v/v), ácido acético 4,6% (v/v)] por 10 min en agitación. Posteriormente, se coloreó el gel con Coumasie Blue durante 15 min. El gel se coloreó de azul y la banda transparente indicó la zona donde la gelatina se digirió por las metaloproteinasas, en nuestro caso MMP-9. A continuación, se decoloró el gel con una solución de metanol 5% (v/v), ácido acético 7,5% (v/v). Se adquirió la imagen del gel utilizando un escáner y se cuantificó las bandas utilizando el programa Image J. Los resultados se calcularon como la relación entre actividad enzimática/ μ g de proteína y se expresaron como media \pm EEM.

11. Análisis estadístico

Los resultados se presentaron como la media \pm error estándar de la media (EEM) con datos de 4 experimentos independientes. Teniendo en cuenta la variabilidad que tiene el tejido placentario todos los resultados se normalizaron con el control sin infectar y sin tratar en la misma condición. Para determinar el efecto de cada grupo con respecto al otro, se hicieron comparaciones utilizando ANOVA de una y dos vías con post-test de Tukey's o Bonferroni. Para la comparación de dos variables se utilizó una prueba "t" de Student o prueba U de Mann-Whitney para muestras no paramétricas. Todos los análisis estadísticos se realizaron usando el programa Graph Pad Prism 7.0. Se consideró diferencia significativa para $p < 0,05$. En las gráficas se indican las diferencias significativas entre cada condición.

RESULTADOS



Moléculas efectoras de la respuesta inmune durante el proceso de invasión del *T. cruzi* en el tejido placentario y la línea celular BeWo derivada de trofoblasto.

Se ha descrito en diferentes tejidos y tipos celulares que la infección con *T. cruzi* genera una respuesta mediada por moléculas como NO, ROS, MIF, MMP-9 e IL-6, las cuales poseen una actividad deletérea sobre el parásito o están asociadas a ella (Castillo y col., 2012; Teixeira de Pinho y col., 2014; Cutrullis y col., 2017). En este primer objetivo se analizó la participación de las moléculas efectoras de la respuesta inmune, arriba mencionadas, frente a la invasión de *T. cruzi* en explantos placentarios, como modelo de barrera placentaria completa, y en la línea celular BeWo derivada de trofoblasto humano.

*Análisis de la invasión del *T. cruzi* en el tejido placentario*

A los fines de evaluar la expresión de moléculas involucradas en la respuesta inmune producidas por los explantos placentarios frente a la infección por *T. cruzi*, inicialmente se verificó la presencia del parásito en el tejido durante el proceso de invasión. Para ello se analizó la carga parasitaria en los explantos placentarios infectados a 4 y 24 h post-infección, mediante qPCR con sondas Taqman para detectar ADN de *T. cruzi*. El tejido placentario se observó presencia del parásito, sin detectar diferencias significativas a los diferentes tiempos analizados (Fig. 13 A). Cuando se cuantificaron los parásitos móviles en el sobrenadante de cultivo en los ensayos de explantos placentarios infectados a 4 y 24 h post-infección, mediante recuento en cámara de Neubauer, se pudo observar una disminución significativa de parásitos móviles en el sobrenadante de cultivo de 24 h post-infección con respecto al de 4 h de cultivo ($p < 0,05$) (Fig. 13 B). Esta disminución, en el número de parásitos móviles, no se reflejó en un aumento de la carga parasitaria en el tejido mostrado en la figura 13-A.

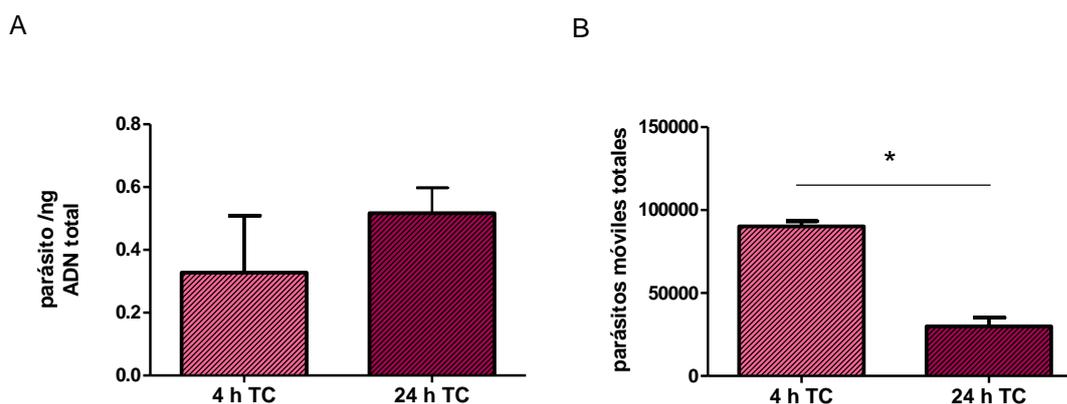
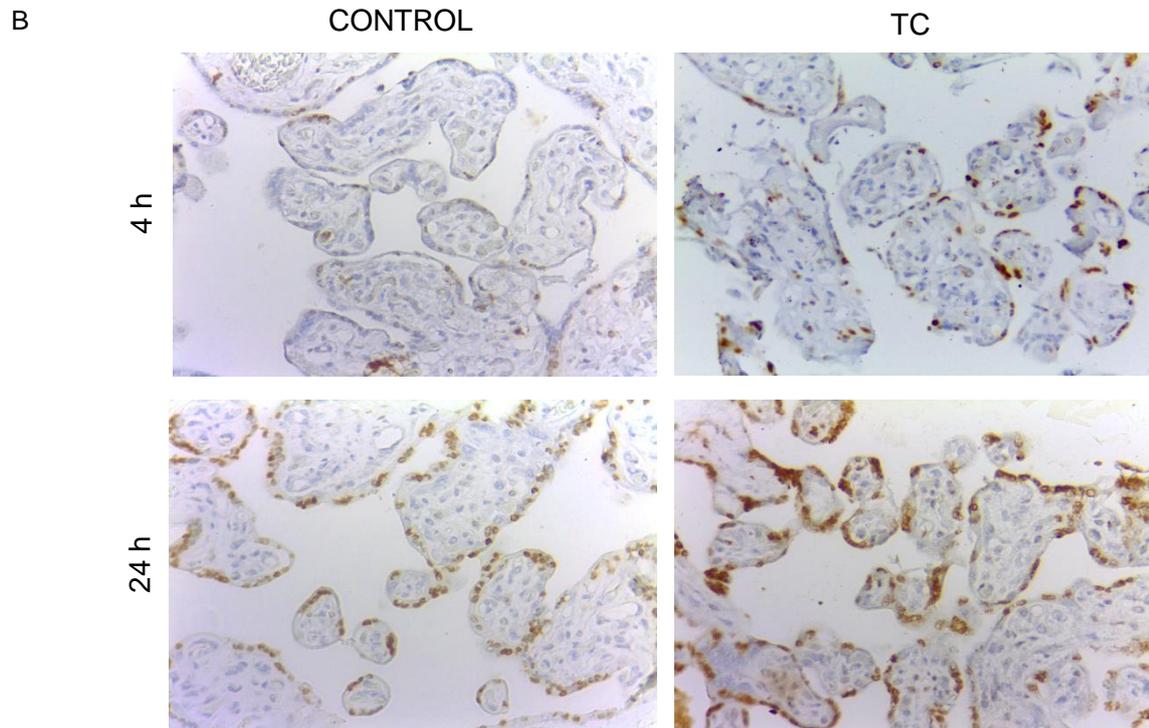
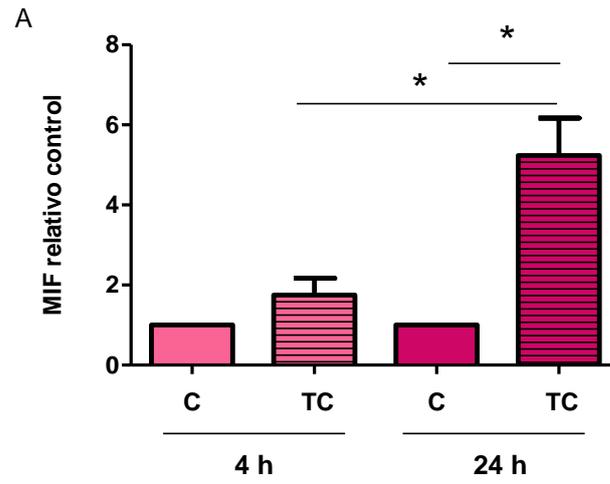


Figura 13. Invasión parasitaria A) Carga parasitaria en tejido placentario a 4 y 24 h post-infección con *T. cruzi* (TC), determinada mediante qPCR. Los resultados se muestran como parásito por ng de ADN total. B) Parásitos móviles totales en sobrenadante de cultivo a 4 y 24 h post-infección determinado mediante recuento en cámara de Neubauer. * $p < 0,05$ (prueba U de Mann-Whitney). Las gráficas representan el valor de la media \pm EEM de 4 experimentos independientes.

Cuantificación de MIF, MMP-9 e IL-6 en el tejido placentario durante la infección por *T. cruzi*

Factor inhibidor de la migración de macrófagos (MIF). MIF es un regulador de la inmunidad innata y adaptativa que promueve las funciones pro-inflamatorias de las células inmunes (Calandra y Roger, 2003). En infecciones de macrófagos por *T. cruzi* así como en modelos animales de infección, MIF ha sido considerado una molécula esencial para controlar la infección mediante la regulación de la secreción de NO, ROS y TNF α (Reyes y col., 2006; Cutrullis y col., 2017). Con el fin de establecer si la infección del tejido placentario por *T. cruzi* induce cambios en la expresión de MIF, se determinó la secreción de MIF en el sobrenadante de cultivo de explantos placentarios infectados o no, con *T. cruzi* y cultivados durante 4 y 24 h, mediante ELISA. Los resultados mostraron una mayor cantidad de MIF en el sobrenadante de cultivo de explantos infectados durante 24 h respecto a los explantos no infectados ($p < 0,05$) (Fig. 14 A); con un aumento en la secreción de MIF de 4 veces a 24 h respecto a una etapa temprana de invasión (4 h). Además, se analizó la expresión proteica de MIF en el tejido de explantos placentarios cultivados durante 4 y 24 h post-infección con *T. cruzi*, mediante IHQ. Se detectó expresión de MIF (marca marrón), principalmente en el citoplasma del STB y en menor medida en el citoplasma de las células estromales (Fig. 14 B). La semicuantificación de la expresión de MIF en el tejido indica un aumento significativo a 24 h post-infección respecto a los explantos no infectados y a los infectados durante 4 h ($p < 0,05$) (Fig. 14 C).



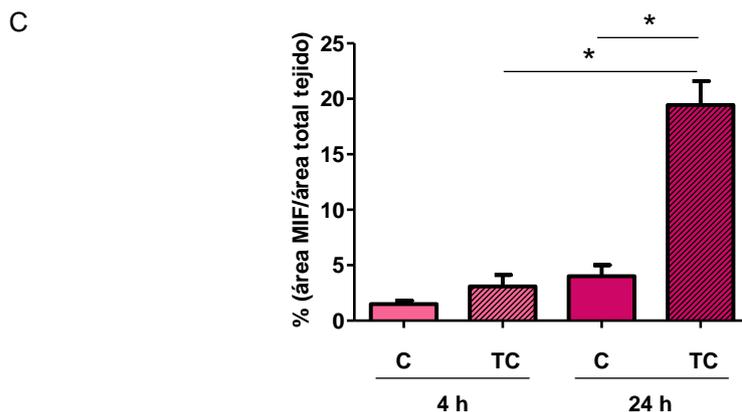


Figura 14. Expresión proteica de MIF en explantos de vellosidades coriónicas. A) Cuantificación de MIF en sobrenadante de cultivo de explantos placentarios a 4 y 24 h post-infección con *T. cruzi* (TC) respecto al control sin infección (C) determinado mediante ELISA. La gráfica representa la concentración de MIF en pg/ml.mg tejido en relación al control sin infección. B) Localización de MIF en tejidos placentarios cultivados durante 4 y 24 h post-infección con *T. cruzi* (TC) respecto al control sin infección (CONTROL) analizado mediante IHQ. Imágenes representativas de IHQ para MIF (color marrón), la tinción fue contrastada con hematoxilina (núcleos azules). Magnificación 400 X. C) Semicuantificación de MIF en tejidos placentarios cultivados durante 4 y 24 h post-infección con *T. cruzi* (TC) respecto al control sin infección (C). La gráfica representa el valor de la semicuantificación de la expresión de MIF, representada como el % de expresión de MIF en relación al tejido placentario total. * $p < 0,05$ (ANOVA de una vía, post-test de comparación múltiple Tukey's). Las gráficas representan el valor de la media \pm EEM de 4 experimentos independientes.

Metaloproteinasa 9 (MMP-9). Es una gelatinasa presente en el tejido placentario con capacidad de degradar la matriz extracelular y es responsable del daño tisular observado durante la invasión de diferentes parásitos (Castillo y col., 2012). Se ha descrito, que en macrófagos y células mononucleares la activación de MMP-9 está regulada por MIF (Yu y col., 2007; White y col., 2013). A su vez, se encuentra aumentada durante la infección por *T. cruzi* en macrófagos (Teixeira de Pinho y col., 2014). Con el propósito de examinar si MMP-9 está involucrada en la respuesta placentaria frente a la infección por *T. cruzi*, se analizó la actividad de MMP-9 medida mediante zimografía, en homogenato de explantos placentarios infectados o no con *T. cruzi* durante 4 y 24 h. Los resultados muestran que la presencia de *T. cruzi* aumentó levemente, aunque significativamente, la actividad catalítica de MMP-9 en los homogenatos de explantos placentarios infectados respecto a los controles no infectados ($p < 0,05$). Se observó un aumento a las 4 h post-infección que se mantuvo hasta las 24 h (Fig. 15).

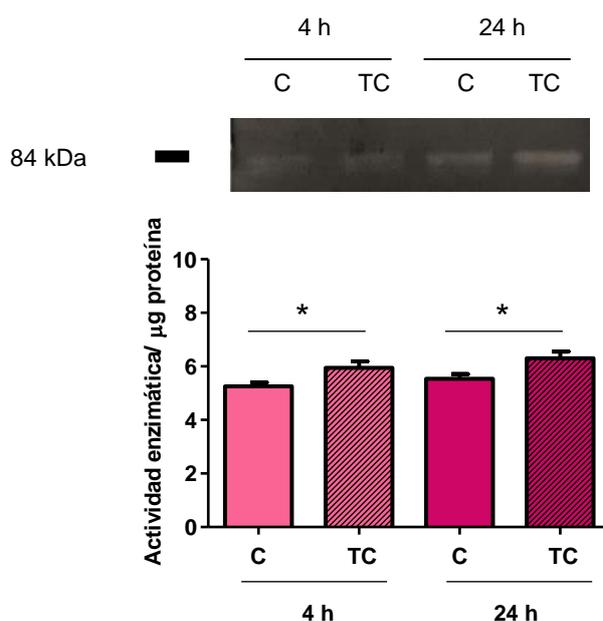
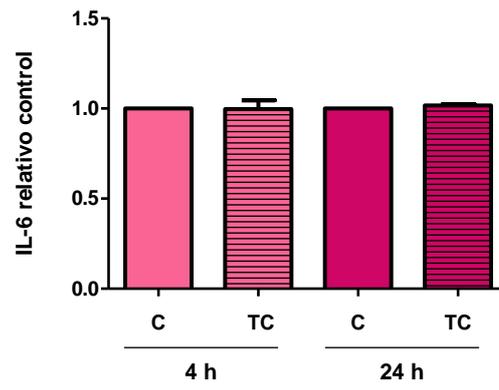


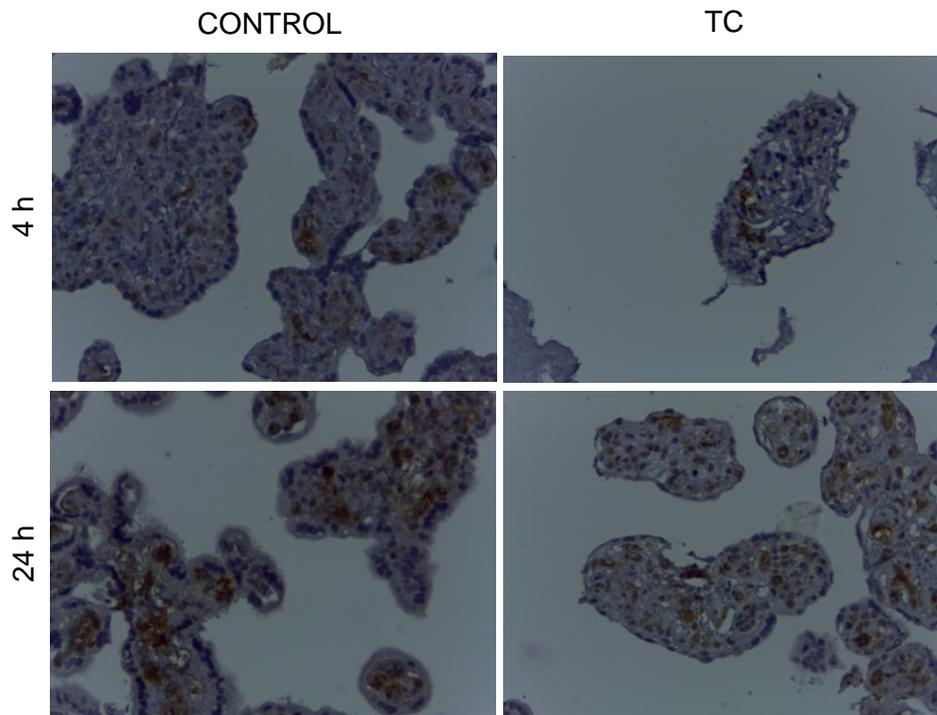
Figura 15. Actividad de MMP-9 en homogenato de explantos placentarios medida mediante zimografía a 4 y 24 h post-infección con *T. cruzi* (TC) respecto al control sin infección (C). Los resultados se muestran como la actividad enzimática de MMP-9 en relación a la masa de proteínas totales. * $p < 0,05$ (ANOVA de una vía, post-test de comparación múltiple Tukey's). La gráfica representa el valor de la media \pm EEM de 4 experimentos independientes.

Interleuquina-6 (IL-6). IL-6 es una citoquina pro-inflamatoria, asociada a la regulación de la respuesta inmune pro-inflamatoria en macrófagos infectados con *T. cruzi* junto con MMP-9 (Teixeira de Pinho y col., 2014). Se describió que MIF participa en la regulación de IL-6 en células mononucleares (White y col., 2013). A los fines de evaluar si durante el proceso de invasión del tejido placentario por *T. cruzi* se producen cambios en la expresión de IL-6, se determinó la cantidad de IL-6 en los sobrenadantes de cultivos de explantos placentarios infectados o no con *T. cruzi* a 4 y 24 h post-infección, así como en el tejido placentario, mediante ELISA e IHQ, respectivamente. Los resultados muestran que no hubo diferencias significativas en la expresión de IL-6 en las muestras provenientes de los tejidos infectados respecto a los no infectados, tanto en sobrenadante de cultivo (Fig. 16 A) como en tejido placentario (Fig. 16 C). La señal para IL-6 se detectó principalmente en las células estromales y en el STB, con ubicación citoplasmática (Fig. 16 B). La semicuantificación de la marcación en el tejido, como también la cuantificación en sobrenadante de cultivo, indican que *T. cruzi* no modifica la expresión ni la secreción de esta citoquina.

A



B



C

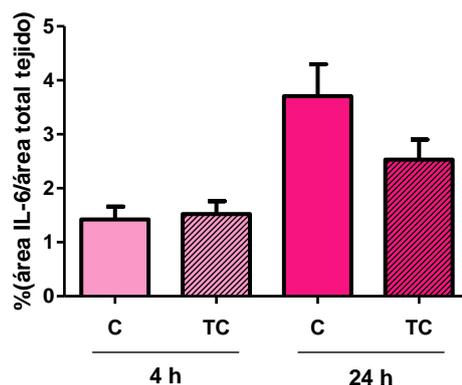


Figura 16. Expresión proteica de IL-6 en explantos de vellosidades coriónicas. A) Cuantificación de IL-6 en sobrenadante de cultivo de explantos placentarios a 4 y 24 h post-infección con *T. cruzi* (TC) respecto al control sin infección (C) determinada mediante ELISA. La gráfica representa la concentración de IL-6 en pg/ml.mg tejido en relación al control sin infección. B) Localización de IL-6 en tejidos placentarios cultivados durante 4 y 24 h post-infección con *T. cruzi* (TC) respecto al control sin infección (CONTROL) analizada mediante IHQ. Imágenes representativas de IHQ para IL-6 (color marrón), la tinción fue contrastada con hematoxilina (núcleos azules). Magnificación 400 X. C) Semicuantificación de IL-6 en tejidos placentarios cultivados durante 4 y 24 h post-infección con *T. cruzi* (TC) respecto al control sin infección (C). La gráfica representa el valor de la semicuantificación de la expresión de IL-6, representada como el % de expresión de IL-6 en relación al tejido placentario total. Las gráficas representan el valor de la media \pm EEM de 4 experimentos independientes.

Sincialización de la línea celular BeWo

La línea celular BeWo se ha utilizado como modelo de estudio de invasión para diferentes patógenos (Pong y col., 2009; Castro y col., 2013; Barbosa y col., 2015). La línea celular BeWo posee la capacidad de formar estructuras multinucleadas similares a STB (BeWo ST) al cultivarlas en presencia de forskolina (Fsk). A los fines de analizar el efecto de la infección con *T. cruzi* en un modelo similar a STB, la línea celular BeWo se trató o no con Fsk. La figura 17 muestra la marcación de células BeWo no tratadas (Fig. 17 A) y de células tratadas con Fsk (Fig. 17 B) con anti-desmoplaquina (proteína involucrada en las uniones intercelulares) y tinción nuclear con H \ddot{o} chst.

La cuantificación de los núcleos que forman estructuras similares a STB indica que las células BeWo ST alcanzaron un porcentaje de sincialización de $57,6 \pm 2,2\%$, porcentaje similar al reportado por otros grupos (Racca y col., 2015). El índice de fusión fue de $45,9 \pm 2,1\%$ con un promedio de núcleos por STB de $3,5 \pm 0,2\%$, siendo estos resultados similares a los observados por el grupo de Nadeem y col. (Nadeem y col., 2014).

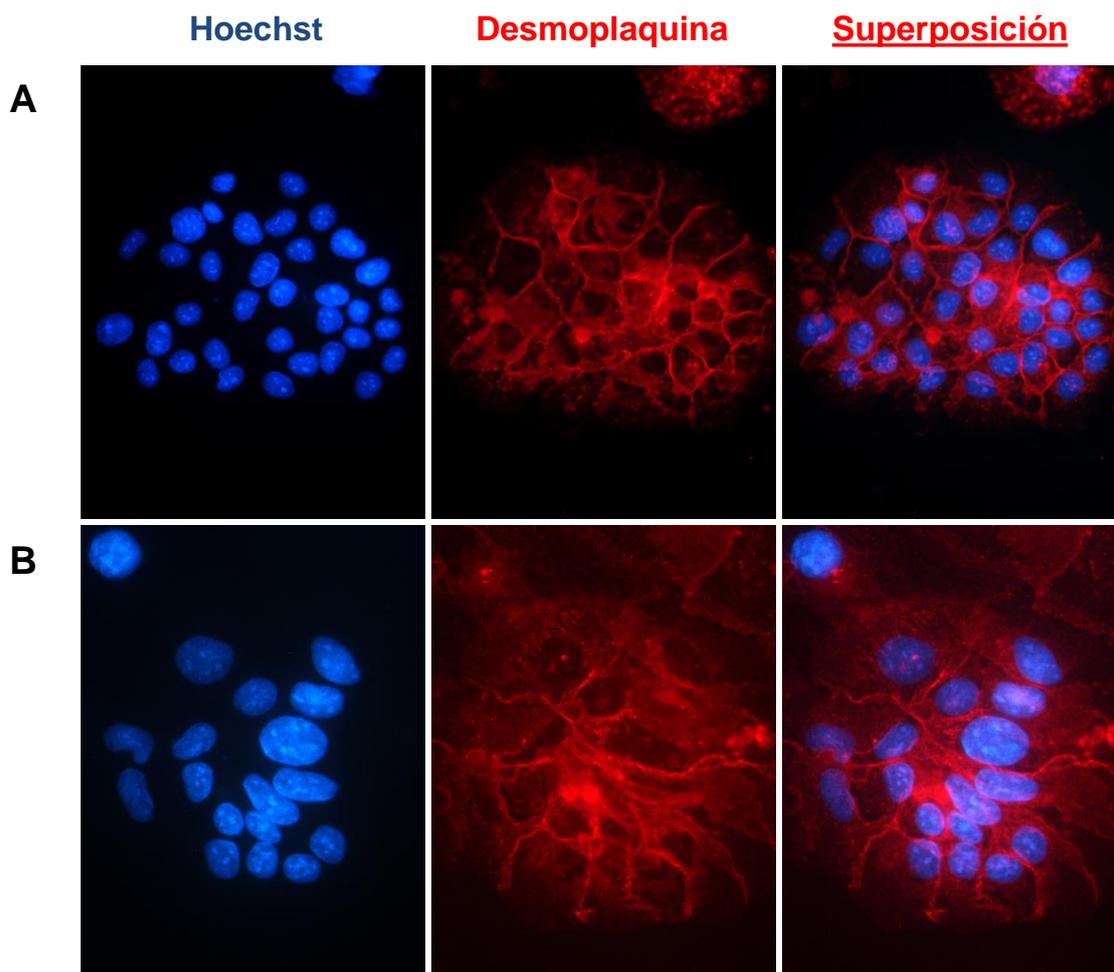


Figura 17. Inmunofluorescencia para marcación de desmoplaquina (rojo) y tinción nuclear con H \ddot{o} echst (azul). Superposición de imágenes para la localización de los núcleos en las estructuras celulares (superposición). A) BeWo sin tratamiento con forskolina B) BeWo con tratamiento con forskolina (BeWo ST). Magnificación 400X.

Producción de gonadotropina coriónica humana beta (β -hCG). β -hCG es una hormona que se utiliza como marcadora de diferenciación trofoblástica, como indicador de transición del fenotipo CTB al STB y se ha reportado aumento de su secreción en células BeWo tratadas con FsK (Lim y col., 2014; Azar y col., 2018). Se describió un aumento en la secreción de β -hCG en células BeWo a 48 h post-infección con la cepa Y de *T. cruzi* en una relación célula/parásito 1:0,1 pero no en relación 1:1 (Liempi y col., 2014). Con el fin de verificar la capacidad de sincicialización de las células BeWo tratadas con FsK y evaluar si la infección por *T. cruzi* produce cambios en la secreción de β -hCG, se determinó la producción de β -hCG, mediante ELISA, en sobrenadante de cultivos de células BeWo tratadas con FsK (BeWo ST) y sin tratar (BeWo), y posteriormente infectadas con *T. cruzi* durante 24 h. Los resultados

muestran un aumento significativo de la secreción de β -hCG en células BeWo ST respecto a BeWo ($p < 0,05$), confirmando que FsK además de inducir una diferenciación morfológica de las células BeWo (Fig. 17 B), origina una diferenciación bioquímica celular (Fig. 18). Sin embargo, no se encontraron diferencias en la secreción de β -hCG entre las células infectadas con *T. cruzi* de la cepa Tulahuen y no infectadas.

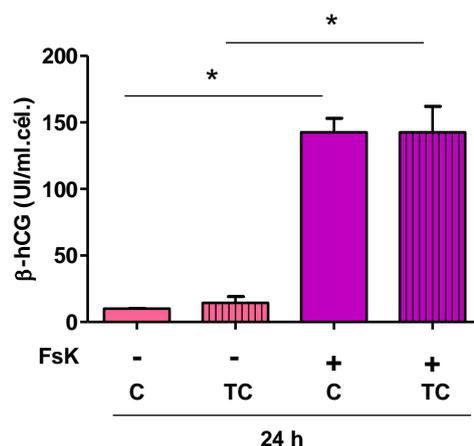


Figura 18. Producción de β -hCG en células BeWo (FsK -) y BeWo ST (FsK +) a 24 h post-infección con *T. cruzi* (TC) y control sin infección (C). La gráfica muestra la concentración de β -hCG en UI/ml.célula. * $p < 0,05$ (ANOVA de dos vías, post-test de Bonferroni). La gráfica representa el valor de la media \pm EEM de 4 experimentos independientes.

Análisis de la invasión parasitaria en la línea celular BeWo

Dado que la infección parasitaria no modificó los niveles de β -hCG en las células BeWo tratadas o no con FsK se evaluó la carga parasitaria en células BeWo ST y BeWo infectadas con *T. cruzi* durante 4 y 24 h. Para tal fin, se cuantificaron los parásitos intracelulares como nidos de amastigotes mediante tinción de los núcleos con Hoechst. Se observó una disminución no significativa en la invasión de *T. cruzi* en células BeWo ST a 24 h post-infección respecto a las células BeWo no sincializadas, no visualizándose amastigotes a tiempos tempranos de infección (4 h) en BeWo tratadas o no con forskolina (Fig. 19 A).

El recuento de los parásitos móviles en sobrenadante de cultivo, mostró una caída significativa del 50% de parásitos móviles a 24 h de cultivo tanto en células tratadas o no con forskolina (Fig. 19 B), sugiriendo ingreso de los tripomastigotes a las células o un efecto deletéreo, sobre los parásitos, de los metabolitos presentes en el sobrenadante de cultivo.

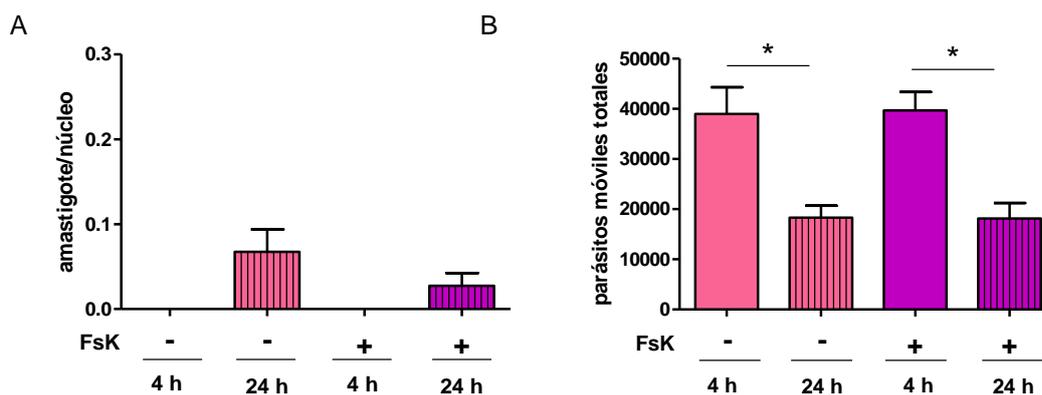


Figura 19. Cuantificación de la infección parasitaria en células BeWo (FsK -) y BeWo ST (FsK +) a 4 y 24 h post-infección con *T. cruzi* (TC). A) Invasión parasitaria mediante recuento de nidos de amastigotes previa tinción de núcleos con Hoechst. Los resultados se muestran como amastigote por núcleo. B) Cuantificación de parásitos móviles en el sobrenadante de cultivo. Los resultados se muestran como parásitos móviles totales. * $p < 0,05$ (ANOVA de dos vías, post-test de Bonferroni). Las gráficas representan el valor de la media \pm EEM de 4 experimentos independientes.

Determinación de NO, ROS e IL-6 en la línea celular BeWo infectadas con T. cruzi

Producción de óxido nítrico (NO). Se ha reportado que el NO posee un efecto deletéreo sobre el parásito (Cutrullis y col., 2017; Triquell y col., 2018). A su vez, se ha descrito la capacidad de las células BeWo de producir NO frente a la infección por *T. gondii* (Oliveira y col., 2006). Con el propósito de evaluar si la infección por *T. cruzi* en la línea celular BeWo produce alteraciones en la secreción de NO, se determinó la producción de NO, medido como nitritos mediante Griess en sobrenadante de células BeWo tratadas con FsK (BeWo ST) y sin tratar (BeWo), y posteriormente infectadas con *T. cruzi* durante 4 y 24 h. Los resultados muestran que la secreción de NO por parte de las células BeWo ST fue significativamente mayor ($p < 0,05$) con respecto a las células BeWo en los dos tiempos analizados, sin embargo, la presencia de *T. cruzi* no generó un cambio en la secreción de NO, tanto en células BeWo como en BeWo ST (Fig. 20).

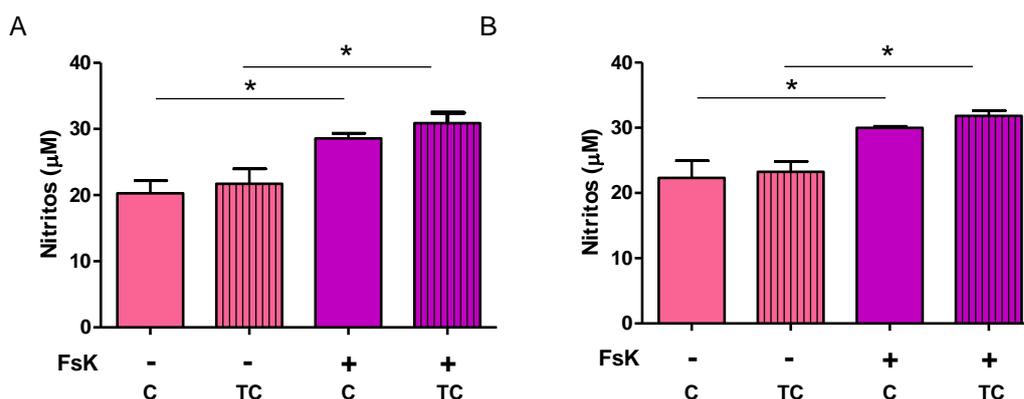


Figura 20. Producción de nitritos en células BeWo (Fsk -) y BeWo ST (Fsk +) a A) 4 post-infección y B) 24 h post-infección con *T. cruzi* (TC) y control sin infección (C). La gráfica muestra la concentración en μM de nitritos, medida mediante Griess. $*p < 0,05$ (ANOVA de dos vías, post-test de Bonferroni). La gráfica representa el valor de la media \pm EEM de 4 experimentos independientes.

Especies reactivas del oxígeno (ROS). Las células BeWo poseen la capacidad de producir ROS frente a diferentes situaciones de estrés como las que se originan en diversas patologías placentarias (He y col., 2016). En la infección por *T. cruzi*, ROS posee un efecto microbicida sobre el parásito acompañado por producción de NO (Cutrullis y col., 2017). Dado que se observó un aumento en la producción de NO en células BeWo ST, se analizó si la infección de la línea celular BeWo por *T. cruzi* produce cambios en la producción de ROS. Para ello se determinó su secreción en cultivos de células BeWo tratadas con forskolina (BeWo ST) y sin tratar (BeWo), y posteriormente infectadas con *T. cruzi* durante 4 y 24 h, mediante uso de la sonda fluorescente DCFHDA. Los resultados muestran un aumento significativo de ROS ($p < 0,01$) en cultivos de células BeWo ST infectadas en relación al control sin infección tanto a 4 h como a 24 h (Fig. 21). No se detectaron cambios en ROS en células BeWo no tratadas con Fsk en ninguna condición analizada.

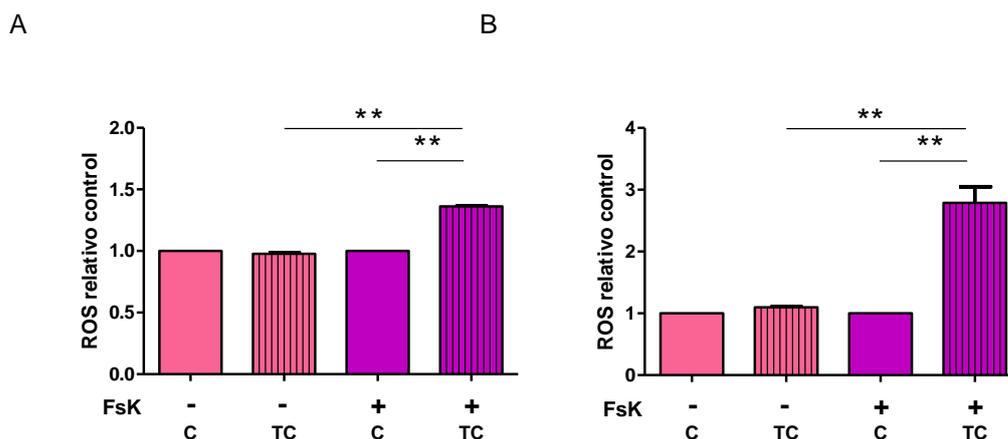


Figura 21. Producción de ROS en células BeWo (Fsk -) y BeWo ST (Fsk +) a A) 4 post-infección y B) 24 h post-infección con *T. cruzi* (TC) y control sin infección (C). La gráfica muestra la intensidad de fluorescencia/núcleo celular en relación al control sin infección. ** $p < 0,01$ (ANOVA de dos vías, post-test de Bonferroni). La gráfica representa el valor de la media \pm EEM de 4 experimentos independientes.

Interleuquina-6 (IL-6). Como se mencionó, esta citoquina regula procesos de infección por *T. cruzi* en macrófagos (Teixeira de Pinho y col., 2014). En los ensayos realizados en explantos placentarios infectados con el parásito se detectó que IL-6 se expresa principalmente en sincitiotrofoblasto (Fig. 16 B), pero la infección por *T. cruzi* no produjo una diferencia significativa en su producción (Fig. 16 A), por ello se focalizó el análisis de su expresión en el modelo de trofoblasto. Para ello, se analizó la producción de IL-6 en sobrenadante de cultivos de células BeWo tratadas con forskolina (BeWo ST) y sin tratar (BeWo), y posteriormente infectadas con *T. cruzi* durante 4 y 24 h, mediante ELISA. Los resultados muestran que no hubo diferencias significativas en la producción de IL-6 en cultivos de células BeWo y BeWo ST con y sin *T. cruzi* a los tiempos ensayados (Fig. 22).

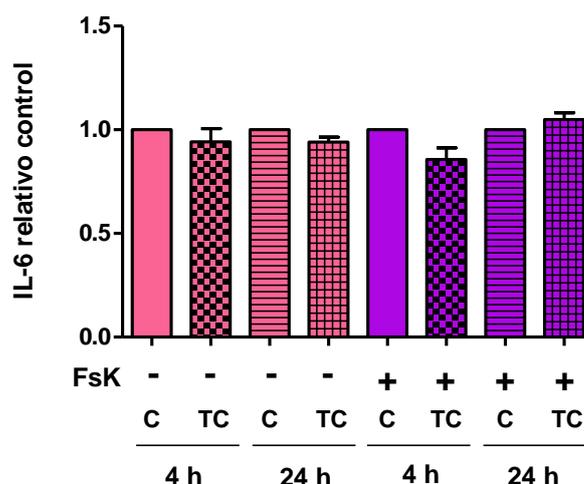


Figura 22. Producción de IL-6 en células BeWo (Fsk -) y BeWo ST (Fsk +) a 4 y 24 h post-infección con *T. cruzi* (TC) y control sin infección (C). La gráfica muestra la concentración de IL-6 en pg/ml.núcleo celular en relación al control sin infección. La gráfica representa el valor de la media \pm EEM de 4 experimentos independientes.

Sobrevida del parásito en medios condicionados provenientes de cultivos de células BeWo

Dado que se conoce que tanto NO como ROS ejercen un efecto deletéreo sobre el *T. cruzi* (Cutrullis y col., 2017; Triquell y col., 2018) y considerando el aumento de estas moléculas observado en células BeWo tratadas con forskolina respecto a las no tratadas, resultó de interés analizar la sobrevida del *T. cruzi* en estas condiciones experimentales. Para ello, se incubaron formas infectivas de *T. cruzi* en medios condicionados provenientes de cultivos de células BeWo tratadas con Fsk (BeWo ST) y sin tratar (BeWo) y en medio fresco durante 10 h; los parásitos se cuantificaron en cámara de Neubauer. Los resultados muestran una disminución del 80% ($p < 0,001$) de los parásitos móviles en los sobrenadantes condicionados provenientes de cultivos de células BeWo ST en relación al medio fresco y del 70% ($p < 0,001$) en relación a los sobrenadantes de BeWo (Fig. 23). Los medios condicionados provenientes de células BeWo no tratadas con Fsk no ejercieron ningún efecto deletéreo sobre los tripomastigotes.

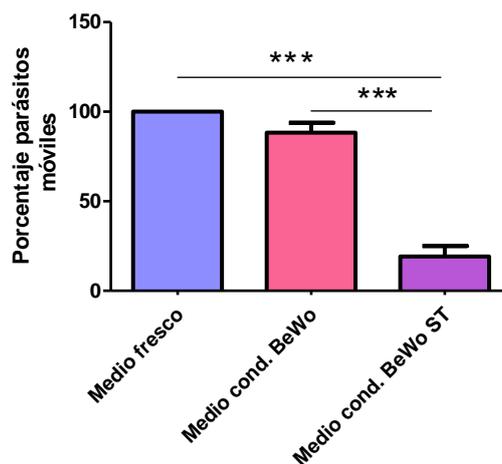


Figura 23. Sobrevida de parásitos en medios condicionados provenientes de cultivos de células BeWo tratadas con *FsK* (BeWo ST) y sin tratar (BeWo) y en medio fresco incubados durante 10 h. Los resultados se muestran como porcentaje de parásitos móviles tomando como 100% la sobrevida en medio de cultivo fresco. *** $p < 0,001$ (ANOVA de una vía, post-test de comparación múltiple Tukey's). La gráfica representa el valor de la media \pm EEM de 4 experimentos independientes.

Determinación de citoquinas y óxido nítrico durante los procesos de invasión y multiplicación del *T. cruzi* en el tejido placentario y la línea celular BeWo derivada de trofoblasto.

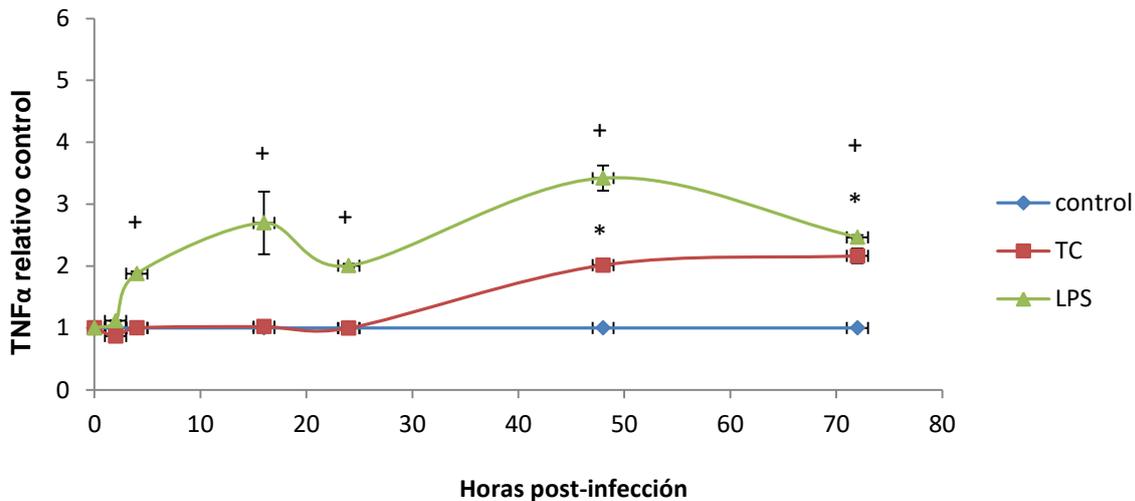
Se ha descrito que en la infección de explantos placentarios por *T. cruzi* durante 2 h, hay un aumento de la expresión de $\text{TNF}\alpha$, $\text{IL-1}\beta$, IL-6 , IL-8 e IL-10 (Castillo y col., 2018). Con el fin de analizar el nivel de producción y localización de estas citoquinas así como del NO durante el proceso de invasión y replicación parasitaria, tanto en la barrera placentaria completa (explanto placentario) como en la línea celular BeWo, se utilizó un diseño experimental de cinética de infección durante 72 h, con toma de muestra a 0, 2, 4, 16, 24, 48 y 72 h.

Producción de citoquinas en el tejido placentario durante la infección por T. cruzi

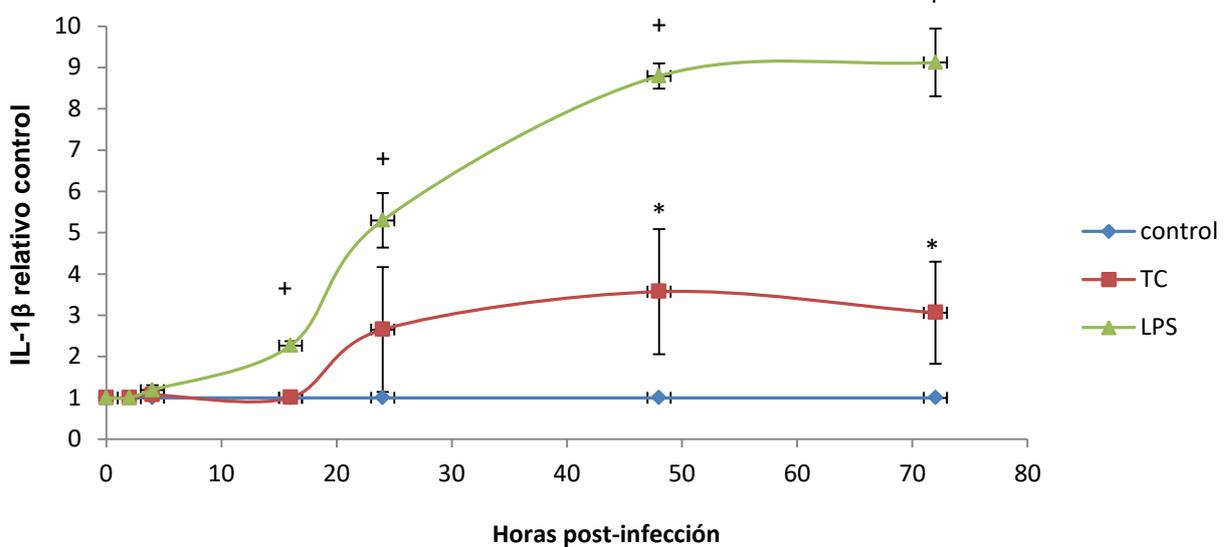
Citoquinas pro-inflamatorias. $\text{TNF}\alpha$, $\text{IL-1}\beta$ e $\text{IFN}\gamma$ son citoquinas expresadas por la placenta humana principalmente durante los procesos de implantación y el trabajo de parto (Mor y col., 2017). Durante infecciones por *T. gondi* también se las detectó aumentadas (Castillo y col., 2017). Con el objeto de determinar si la invasión y/o multiplicación de *T. cruzi* origina variaciones en la producción de citoquinas por parte del tejido placentario, se analizó la secreción de $\text{TNF}\alpha$, $\text{IL-1}\beta$ e $\text{IFN}\gamma$ en explantos

placentarios durante el proceso infeccioso. Para ello, los explantos se incubaron con tripomastigotes o con LPS (control positivo), durante 0, 2, 4, 16, 24, 48 y 72 h, con cambio de medio a las 24 h (ver materiales y métodos). Las citoquinas se midieron en el sobrenadante de los medios de cultivo mediante ELISA. Los resultados muestran que durante la invasión del parásito TNF α , IL-1 β e IFN γ no cambiaron su secreción al medio de cultivo en relación al control sin infección. Sin embargo, después de las 24 h post-infección, TNF α e IL-1 β incrementaron su secreción al medio de cultivo, observándose un aumento significativo de 2-3 veces en relación al control (sin *T. cruzi*) a las 48 y 72 h de interacción con el parásito. El agregado de LPS, como se esperaba, también aumentó significativamente la expresión de TNF α e IL-1 β , siendo el aumento de su liberación al medio a partir de las primeras horas de tratamiento (Fig. 24 A y B). La liberación de IFN γ en el sobrenadante de cultivo infectado con *T. cruzi* fue menor en relación a las otras citoquinas pro-inflamatorias analizadas, se observó un aumento significativo de 1,5 veces después de 48 h post-infección. LPS indujo un aumento en la liberación de IFN γ después de 16 h post-infección (Fig. 24 C).

A



B



C

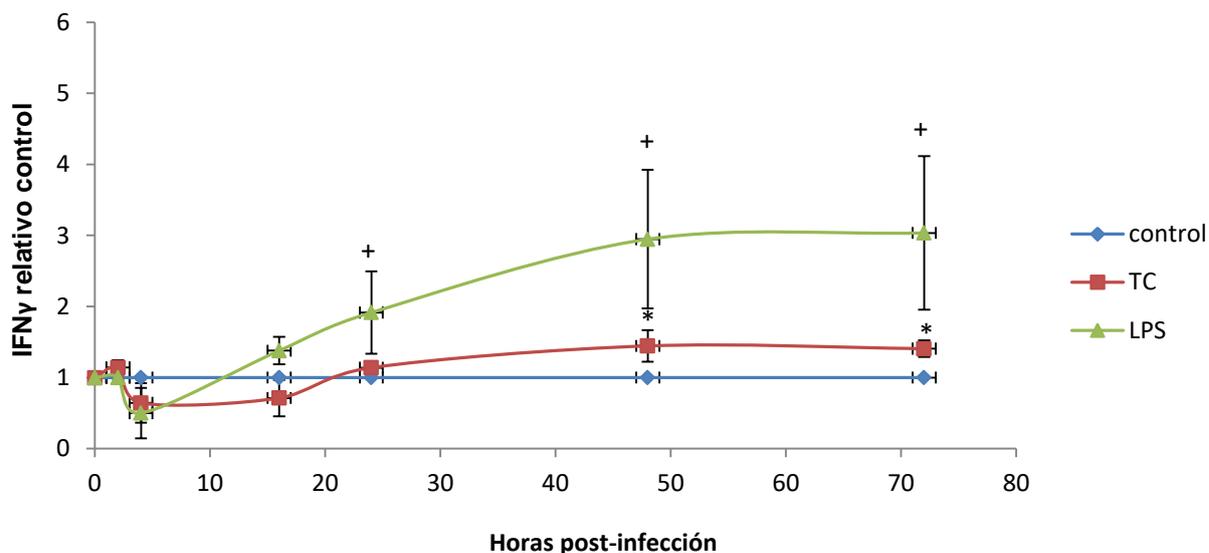


Figura 24. Cuantificación de citoquinas pro-inflamatorias en sobrenadantes de cultivos de explantos placentarios obtenidos a 0, 2, 4, 16, 24, 48 y 72 h post-infección con *T. cruzi* (TC) respecto al control sin infección (control) o tratados con LPS. Las gráficas representan la concentración en pg/ml.mg tejido relativa al control sin infección de A) TNF α , B) IL-1 β y C) IFN γ , medido mediante ELISA. Se muestra el valor de la media \pm EEM de 4 experimentos independientes, con una significancia $p < 0,05$ (prueba U de Mann-Whitney) en explantos infectados con respecto al control sin infección (*) y en explantos tratados con LPS con respecto al control sin infección (+).

Citoquinas anti-inflamatorias. IL-10 e IL-4 son citoquinas que aumentan durante los estadios intermedios del embarazo para evitar el rechazo al feto (Mor y col., 2010). En infecciones con *T. cruzi* se describió un aumento de IL-10 como un mecanismo compensatorio a la fuerte respuesta inmune pro-inflamatoria del hospedador para eliminar el parásito (Castillo y col., 2017; 2018). Con el propósito de determinar si la invasión y/o multiplicación de *T. cruzi* en el tejido placentario origina variaciones en la producción de citoquinas se analizó la secreción de IL-10 e IL-4 en explantos placentarios durante el proceso infeccioso. Para ello, los explantos se incubaron con tripomastigotes o con LPS (control positivo) durante 0, 2, 4, 16, 24, 48 y 72 h, con cambio de medio a las 24 h (ver materiales y métodos). Las citoquinas se midieron en el sobrenadante de los medios de cultivo mediante ELISA. Los resultados muestran que IL-10 aumentó gradualmente su secreción hasta alcanzar un valor de 2-3 veces a las 48 y 72 h post-infección. LPS también indujo un aumento gradual de IL-10 a partir de las 24 h de cultivo (Fig. 25 A). IL-4 no mostró una diferencia significativa en relación al control (sin *T. cruzi*) durante los procesos de invasión y replicación del parásito (Fig. 25 B).

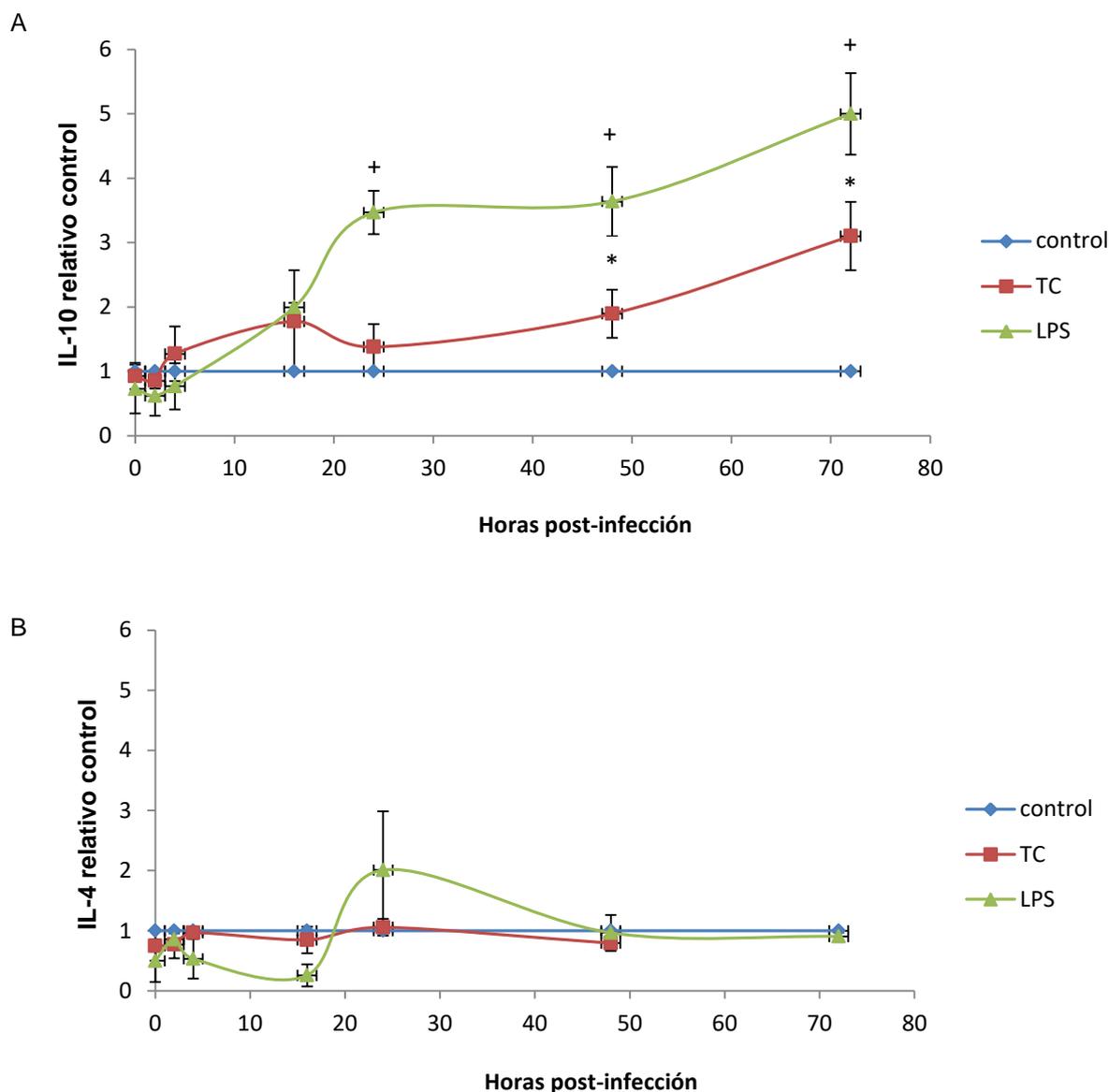
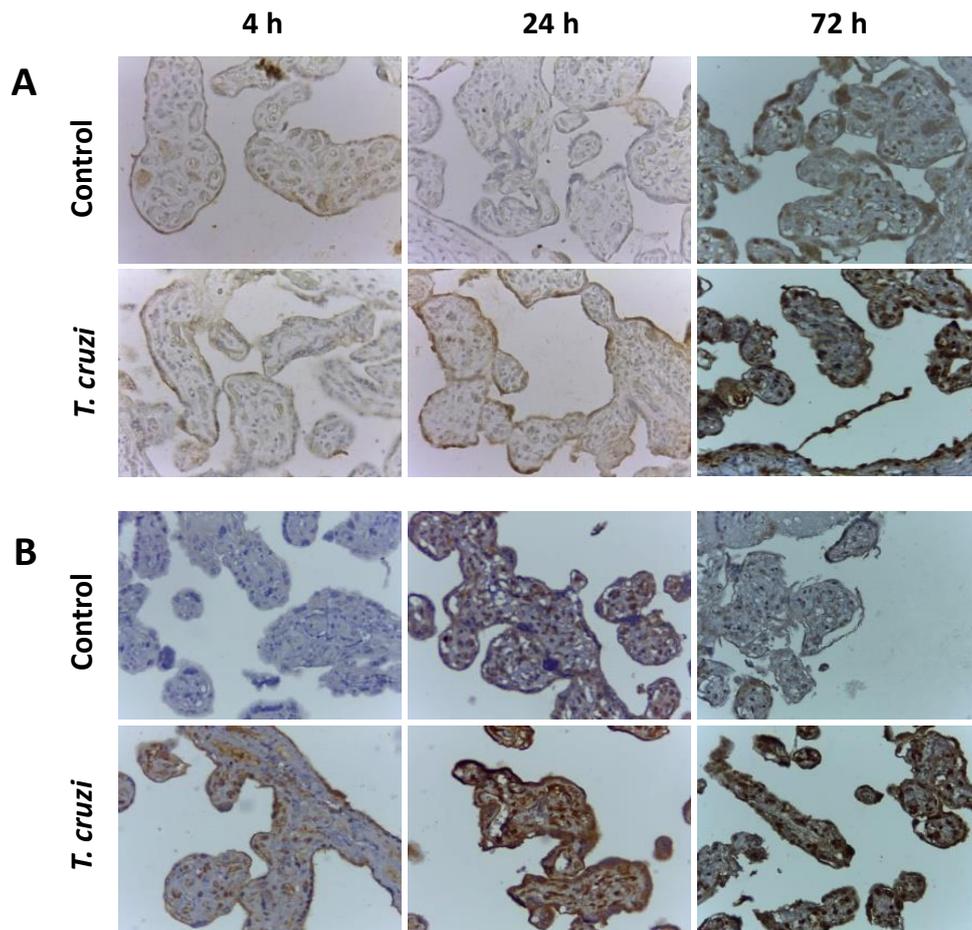


Figura 25. Cuantificación de citoquinas anti-inflamatorias en sobrenadantes de cultivos de explantos placentarios obtenidos a 0, 2, 4, 16, 24, 48 y 72 h post-infección con *T. cruzi* (TC) respecto al control sin infección (control) o tratados con LPS. Las gráficas representan la concentración en pg/ml.mg tejido relativa al control sin infección de A) IL-10 y B) IL-4, medido mediante ELISA. Se muestra el valor de la media \pm EEM de 4 experimentos independientes, con una significancia $p < 0,05$ (prueba U de Mann-Whitney) en explantos infectados con respecto al control sin infección (*) y en explantos tratados con LPS con respecto al control sin infección (+).

Localización de citoquinas. Con el objeto de determinar en qué estructuras de la barrera placentaria se ubicaba la expresión de las citoquinas liberadas al medio de cultivo de los explantos placentarios infectados con *T. cruzi* (Fig. 24 y 25), se realizaron IHQ para TNF α , IFN γ , IL-1 β e IL-10 en los tejidos de los explantos infectados. Los resultados muestran una marcación positiva (color marrón) para TNF α ,

IFN γ , IL-1 β e IL-10 en el citoplasma de las células del estroma y del trofoblasto. TNF α mostró una mayor expresión en STB, aunque se expresó también en algunas células estromales en los explantos placentarios infectados con *T. cruzi*. La expresión de IFN γ , IL-1 β e IL-10 en los explantos placentarios infectados con *T. cruzi* se detectó en el STB así como en las células estromales (Fig. 26).



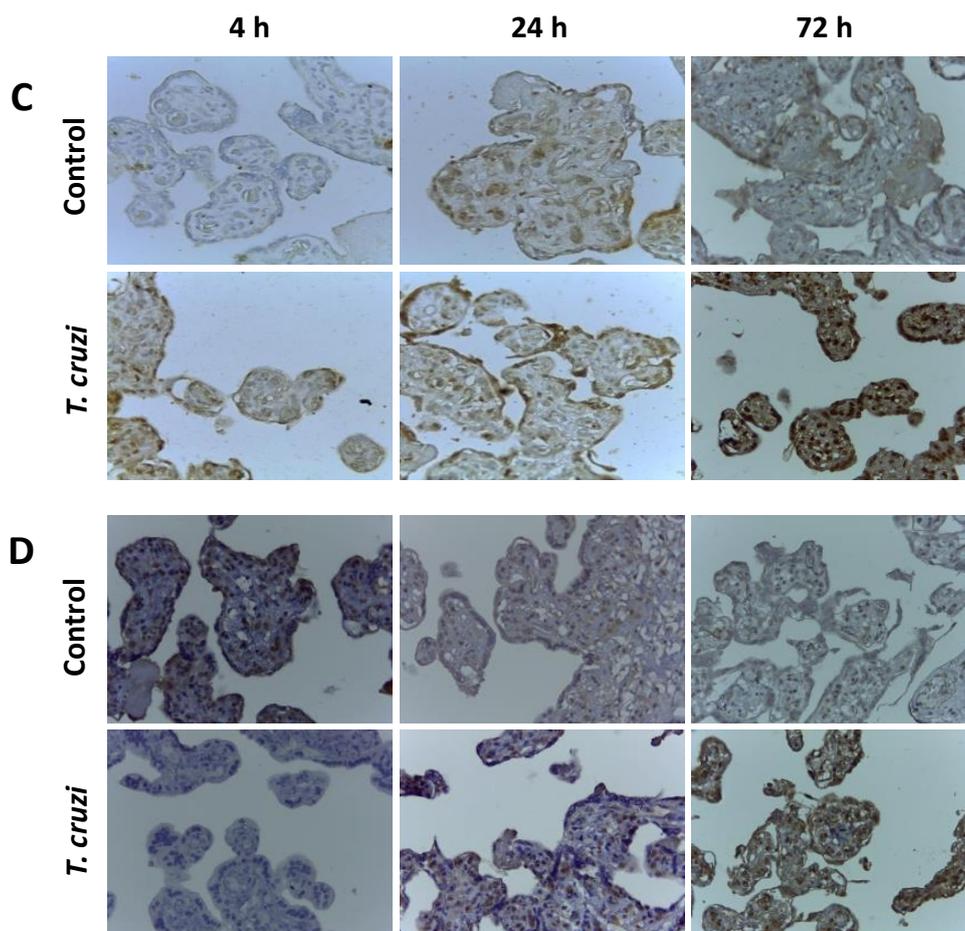


Figura 26. Localización de citoquinas en el tejido de explantos placentarios cultivados 4, 24 y 72 h post-infección con *T. cruzi* y en muestras controles sin infección determinado mediante IHQ. Imágenes representativas de IHQ para TNF α (A), IL-1 β (B), IFN γ (C) e IL-10 (D) (color marrón), la tinción fue contrastada con hematoxilina (núcleos azules). Magnificación 400 X.

Producción de óxido nítrico en el tejido placentario durante la infección por T. cruzi

Producción de óxido nítrico (NO). Como se mencionó, el NO es un metabolito deletéreo importante para el control de la infección parasitaria. Previamente se demostró que el proceso de sincicialización de células BeWo cultivadas durante 4 ó 24 h produce un aumento en la secreción de NO, el cual no se modifica con la infección parasitaria. A los fines de evaluar si el tejido placentario responde frente a la infección por *T. cruzi* liberando NO, se determinó la producción de NO, medido como nitritos mediante Griess en sobrenadante de cultivo de explantos placentarios infectados o no con *T. cruzi* o tratados con LPS (control positivo), durante 0, 2, 4, 16, 24, 48 y 72 h con cambio de medio a las 24 h (ver materiales y métodos). La figura 27 muestra que si bien se observó un aumento en la liberación de nitritos con el transcurso del tiempo de

cultivo, ésta no mostró diferencias significativas con el control (Fig. 27). El control sin infección secreta basalmente concentraciones de NO, que según bibliografía son concentraciones deletéreas para la célula parasitaria (Díaz-Luján, y col., 2012).

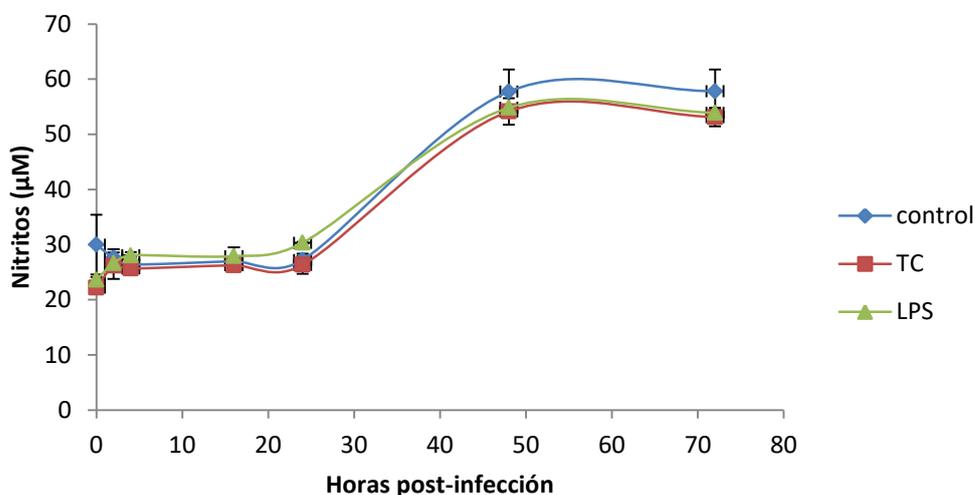


Figura 27. Concentración de nitritos en sobrenadantes de cultivos de explantos placentarios obtenidos a 0, 2, 4, 16, 24, 48 y 72 h post-infección con *T. cruzi* (TC) respecto al control sin infección (control) o tratados con LPS. La gráfica representa la concentración de nitritos en μM medida mediante Griess como el valor de la media \pm EEM de 4 experimentos independientes.

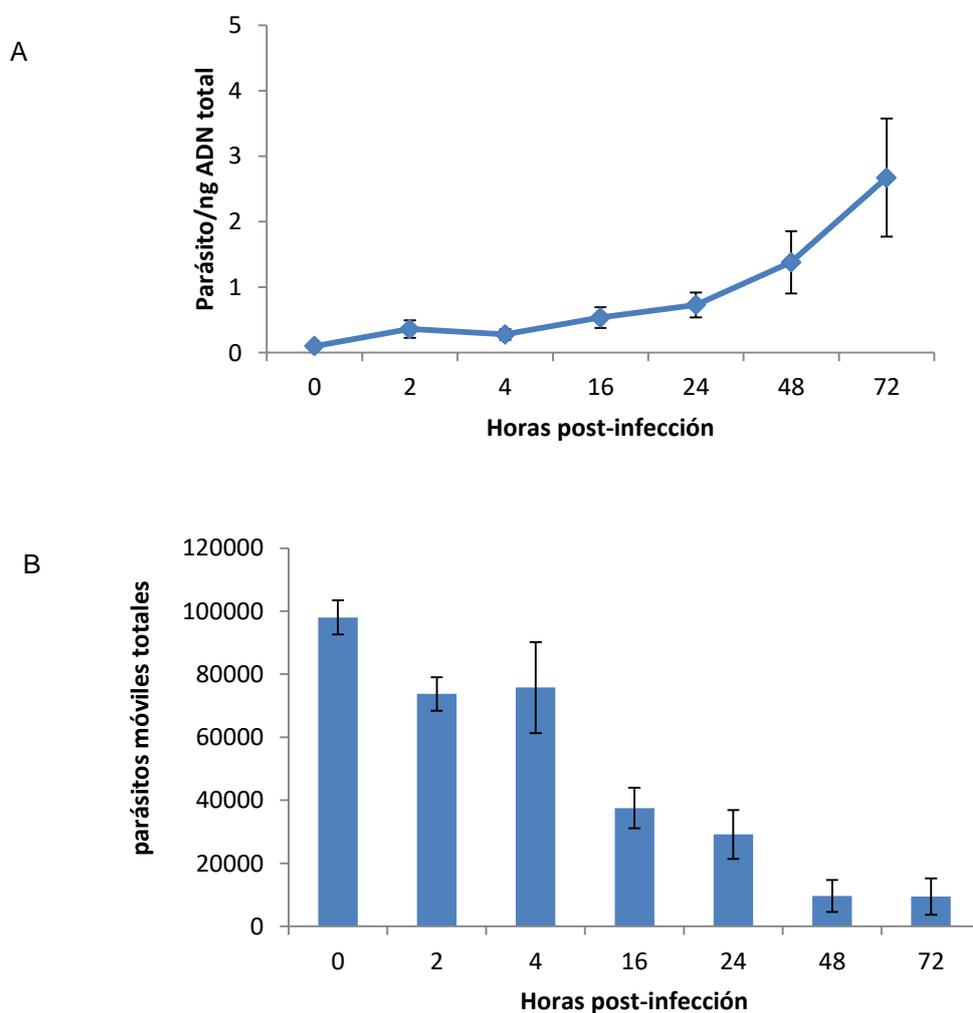
Infección parasitaria en tejido placentario

Las diferentes expresiones de moléculas involucradas en respuesta a la infección con *T. cruzi* en el tejido placentario, observadas en los objetivos 1 y 2, podrían modificar la infección, ya que algunas de ellas tienen efecto deletéreo sobre el parásito (Cutrullis y col., 2017; Triquell y col., 2018). Con el fin de evaluar el curso de la infección durante los procesos de invasión y multiplicación parasitaria en el tejido placentario, se llevó a cabo un diseño experimental de infección durante 24 h y posterior cambio de medio sin agregado de parásitos. Se cuantificaron parásitos móviles en el sobrenadante de cultivo o carga parasitaria en el tejido placentario a las 0, 2, 4, 16, 24, 48 y 72 h.

Se detectó un aumento progresivo en la carga parasitaria, cuantificada por qPCR del ADN de *T. cruzi*, hasta las 24 h post-infección y luego un marcado incremento hasta alcanzar aproximadamente 3 veces la carga inicial a las 72 h (Fig. 28 A).

La cuantificación de parásitos móviles en el sobrenadante de cultivo mostró una disminución en los parásitos con el tiempo de cultivo alcanzándose una disminución del 70% a las 24 h post-infección (Fig. 28 B).

Se observó un aumento progresivo de parásitos en el tejido placentario, como asimismo una disminución paulatina en el medio de cultivo, sin embargo, teniendo en cuenta que hay un cambio de medio a las 24 h sin agregado de parásitos se detectó presencia de *T. cruzi* en el medio a 48 y 72 h sugiriendo la existencia de un proceso de replicación y liberación parasitaria temprana. Por otro lado, se localizaron nidos de amastigotes en el citoplasma de células del estroma placentario a 72 h post-infección donde se observaron 3 células infectadas por campo con 3-5 amastigotes por nido. Se debe destacar una alta variabilidad en la infección entre placentas (Fig. 28 C), con menor infección en los explantos placentarios en relación a las células BeWo.



C

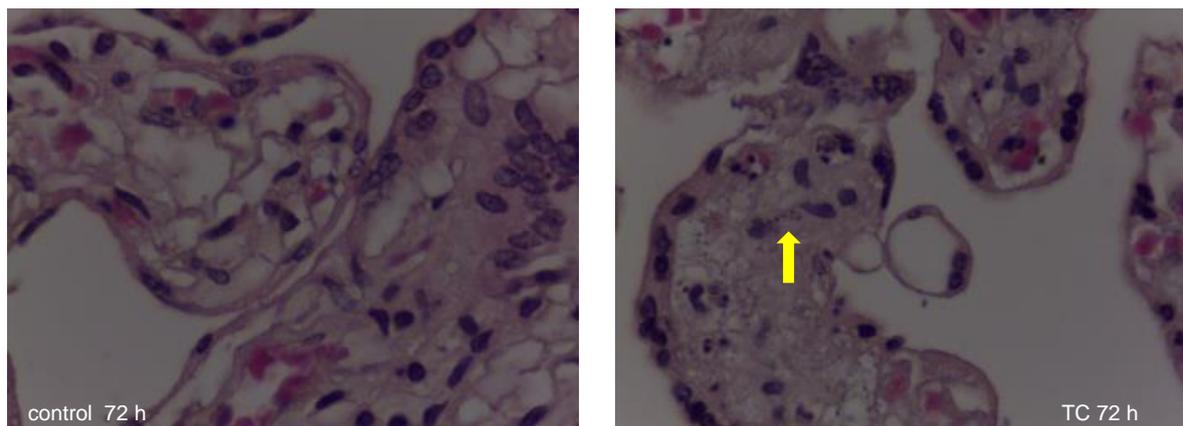


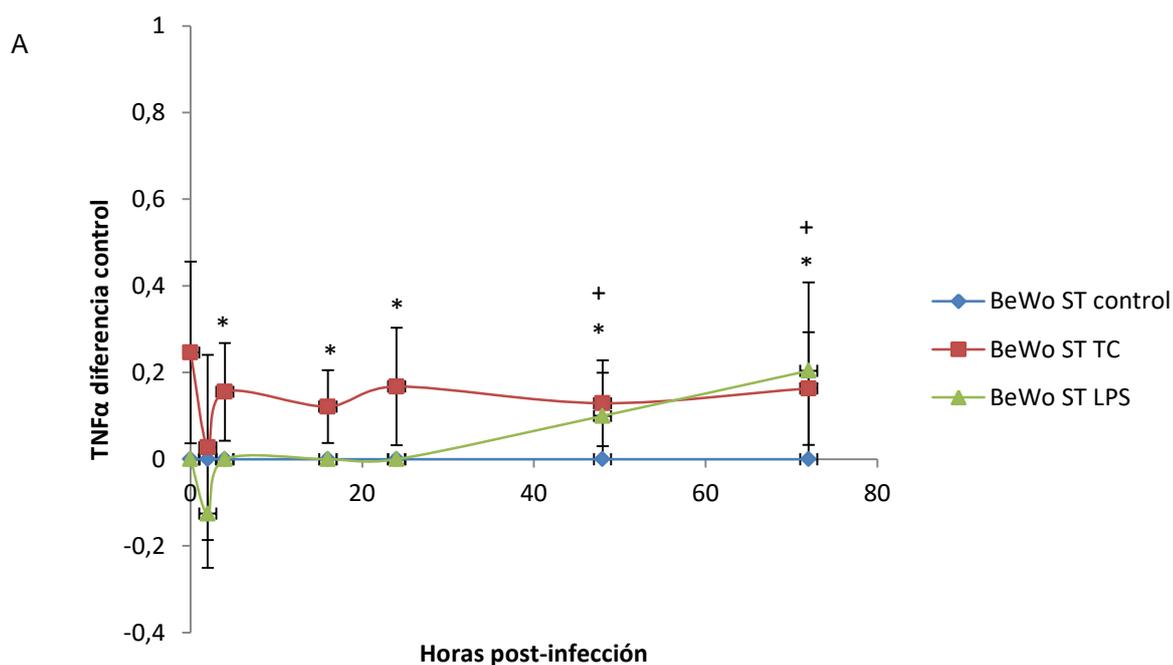
Figura 28. Infección parasitaria A) Carga parasitaria en el tejido placentario determinada a 0, 2, 4, 16, 24, 48 y 72 h post-infección con *T. cruzi*. Los resultados se muestran como parásito por ng de ADN total. B) Parásitos móviles totales en el sobrenadante de cultivo obtenidos a 0, 2, 4, 16, 24, 48 y 72 h post-infección. Los resultados se muestran como parásitos móviles totales. Las gráficas representan el valor de la media \pm EEM de 4 experimentos independientes. C) Tinción con H/E en los explantos placentarios infectados (TC) o sin infección (control) cultivados durante 72 h. Visualización de nidos de amastigotes (Flecha amarilla). Magnificación 1000 X.

Producción de citoquinas en la línea celular BeWo durante la infección por T. cruzi

Dentro de los componentes trofoblásticos de la barrera placentaria, el sincitiotrofoblasto es la estructura más externa de dicha barrera placentaria y por lo tanto es la primera en interactuar con el parásito en circulación materna y luego responde el citotrofoblasto que se ubica por debajo de esa capa celular. En ensayos anteriores mediante IHQ, se localizó la expresión de citoquinas principalmente en el trofoblasto (Fig. 26). En esta parte del trabajo de tesis, se utilizó la línea celular BeWo como modelo de estudio para analizar la secreción de TNF α , IL-1 β , IFN γ e IL-10 en condiciones de infección por *T. cruzi* respecto a la ausencia de infección. Para tal fin, se comparó el efecto de la infección sobre células BeWo tratadas con FSK (BeWo ST) y no tratadas (BeWo).

Liberación de citoquinas por células BeWo con características de sincitiotrofoblasto (BeWo ST). Con el objeto de evaluar la respuesta del STB frente a la infección parasitaria, se analizó la secreción de TNF α , IL-1 β , IFN γ e IL-10 en un modelo celular que simula un STB. Para ello, se midieron estas citoquinas en el sobrenadante de cultivo de células BeWo ST infectadas o no con *T. cruzi* o tratadas con LPS (control positivo), durante 0, 2, 4, 16, 24, 48 y 72 h, con cambio de medio a

las 24 h, mediante ELISA (ver materiales y métodos). Los resultados muestran un aumento en la secreción de TNF α e IL-1 β en las células BeWo ST en presencia de *T. cruzi* en relación al control sin infección, la cual se mantuvo a lo largo del experimento (Fig. 29 A y B). IFN γ e IL-10 no mostraron diferencias significativas con respecto al control sin infección (Fig. 30 A y B). LPS produjo solamente un aumento de TNF α posterior a las 48 h (Fig. 29 A).



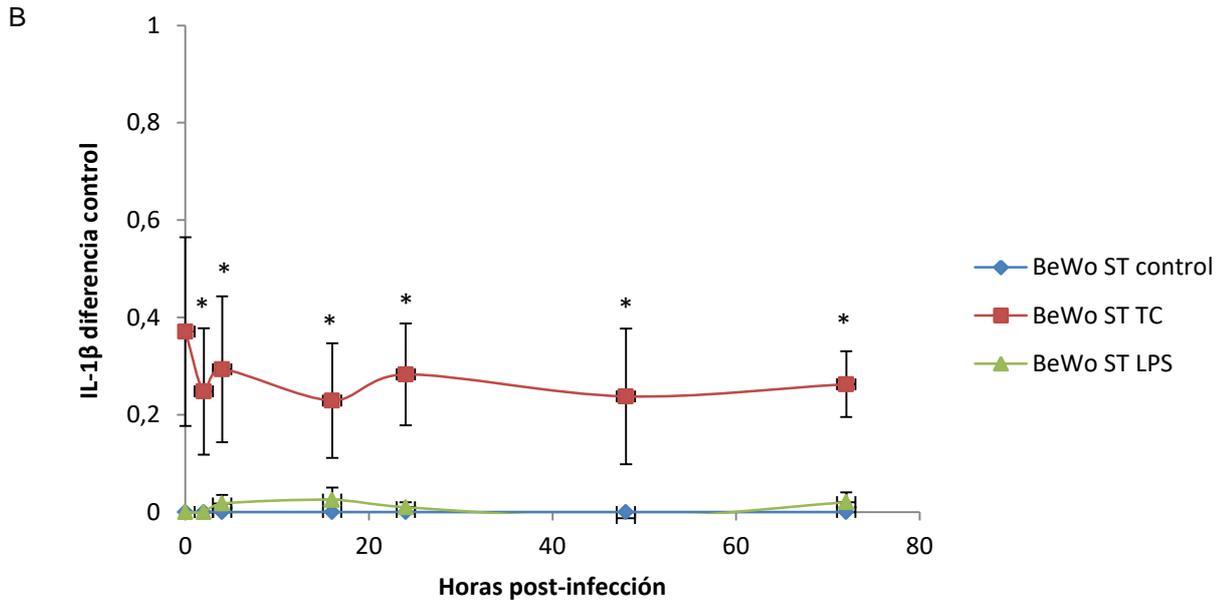
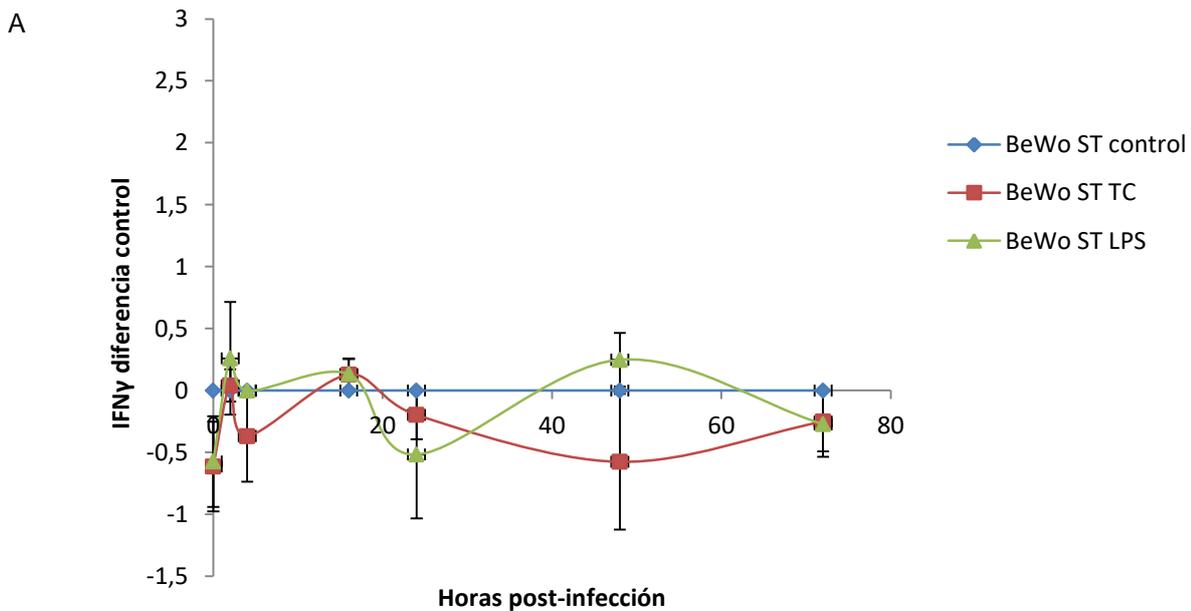


Figura 29. Cuantificación de citoquinas en sobrenadantes de cultivos de la línea celular BeWo ST obtenidos durante 0, 2, 4, 16, 24, 48 y 72 h post-infección con *T. cruzi* (BeWo ST TC) respecto al control sin infección (BeWo ST control) o tratadas con LPS (BeWo ST LPS). Las gráficas representan la diferencia de concentración en pg/ml.cél. con el control sin infección de A) TNF α y B) IL-1 β , medido mediante ELISA. Se muestran como el valor de la media \pm EEM de 4 experimentos independientes, con una significancia $p < 0,05$ (prueba *t* de Student) en BeWo ST infectadas con respecto al control sin infección (*) y en BeWo ST tratadas con LPS con respecto al control sin infección (+).



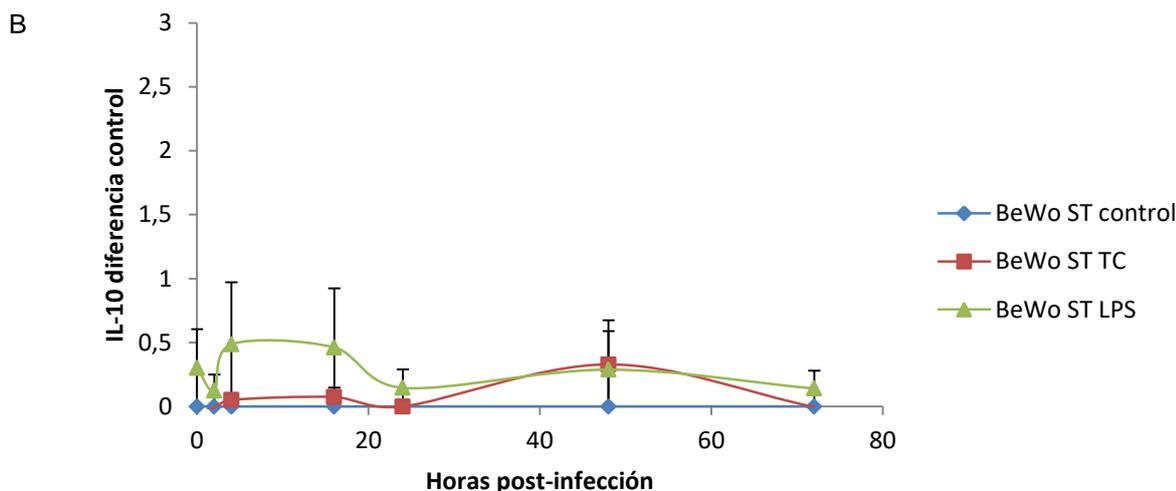


Figura 30. Cuantificación de citoquinas en sobrenadantes de cultivos de la línea celular BeWo ST obtenidos durante 0, 2, 4, 16, 24, 48 y 72 h post-infección con *T. cruzi* (BeWo ST TC) respecto al control sin infección (BeWo ST control) o tratadas con LPS (BeWo ST LPS). Las gráficas representan la diferencia de concentración en pg/ml.cél. con el control sin infección de A) IFN γ y B) IL-10, medido mediante ELISA. Se muestran como el valor de la media \pm EEM de 4 experimentos independientes.

Liberación de citoquinas por células BeWo con características de citotrofoblasto (BeWo). Con el fin de determinar la respuesta de CTB frente al parásito, se evaluó la secreción de TNF α , IL-1 β , IFN γ e IL-10 en un modelo celular que simula un CTB. Para ello, se midieron las citoquinas en sobrenadantes de cultivos de células BeWo infectadas o no con *T. cruzi* o tratadas con LPS (control positivo), durante 0, 2, 4, 16, 24, 48 y 72 h, con cambio de medio a las 24 h, mediante ELISA (ver materiales y métodos). Los resultados muestran un aumento significativo en la liberación de TNF α e IL-1 β en células BeWo en presencia de *T. cruzi* (Fig. 31 A y B). IFN γ e IL-10 no mostraron diferencias significativas con el control sin infección (Fig. 32 A y B). En relación a la respuesta frente a LPS no se encontraron diferencias con el control en la secreción de ninguna citoquina.

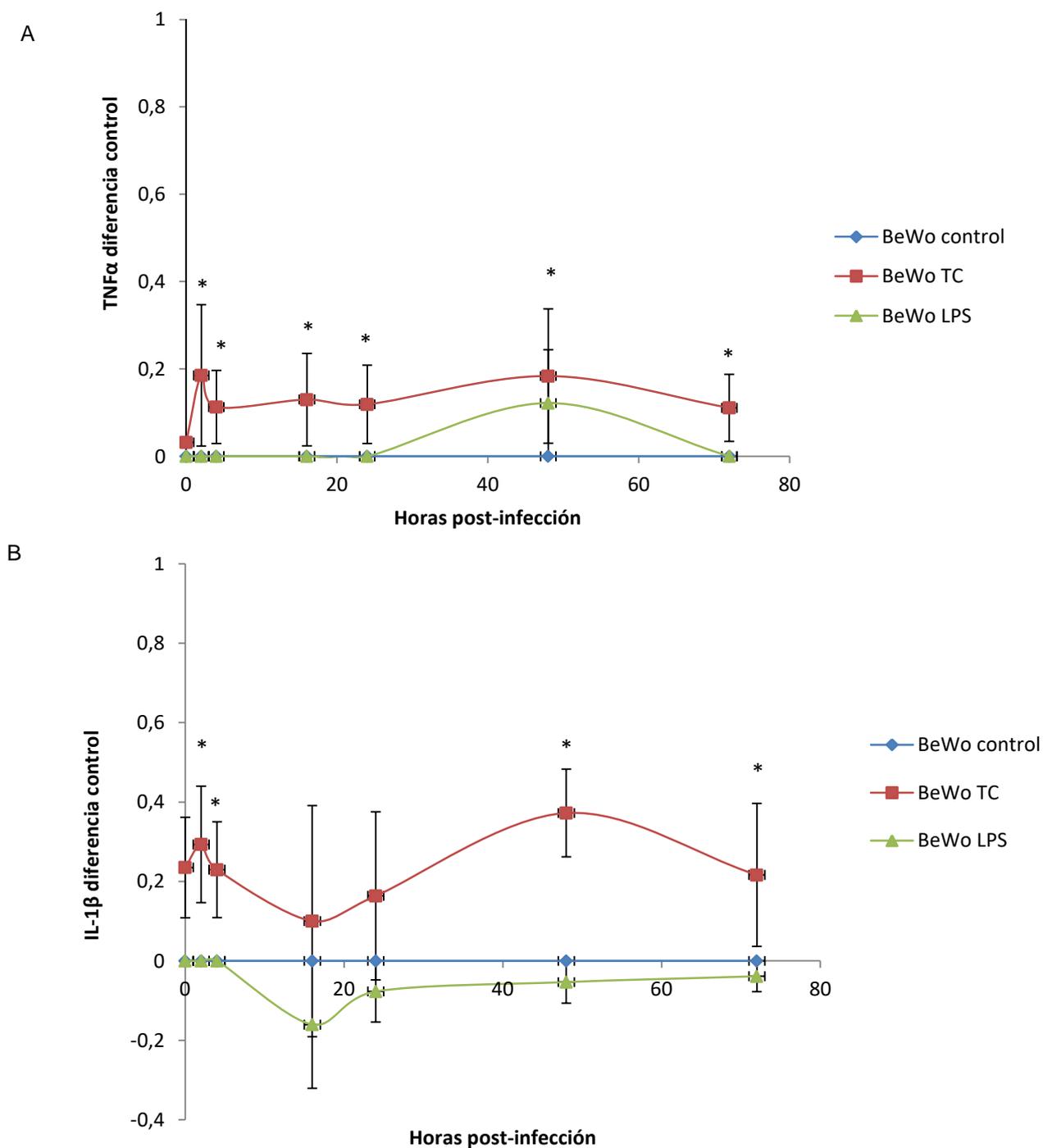


Figura 31. Cuantificación de citoquinas en sobrenadantes de cultivos de la línea celular BeWo obtenidos durante 0, 2, 4, 16, 24, 48 y 72 h post-infección con *T. cruzi* (BeWo TC) respecto al control sin infección (BeWo control) o tratadas con LPS (BeWo LPS). Las gráficas representan la diferencia de concentración en pg/ml.cél. con el control sin infección de A) TNF α y B) IL-1 β , medido mediante ELISA. Se muestran como el valor de la media \pm EEM de 4 experimentos independientes, con una significancia $p < 0,05$ (prueba t de Student) de BeWo infectadas con respecto al control sin infección (*).

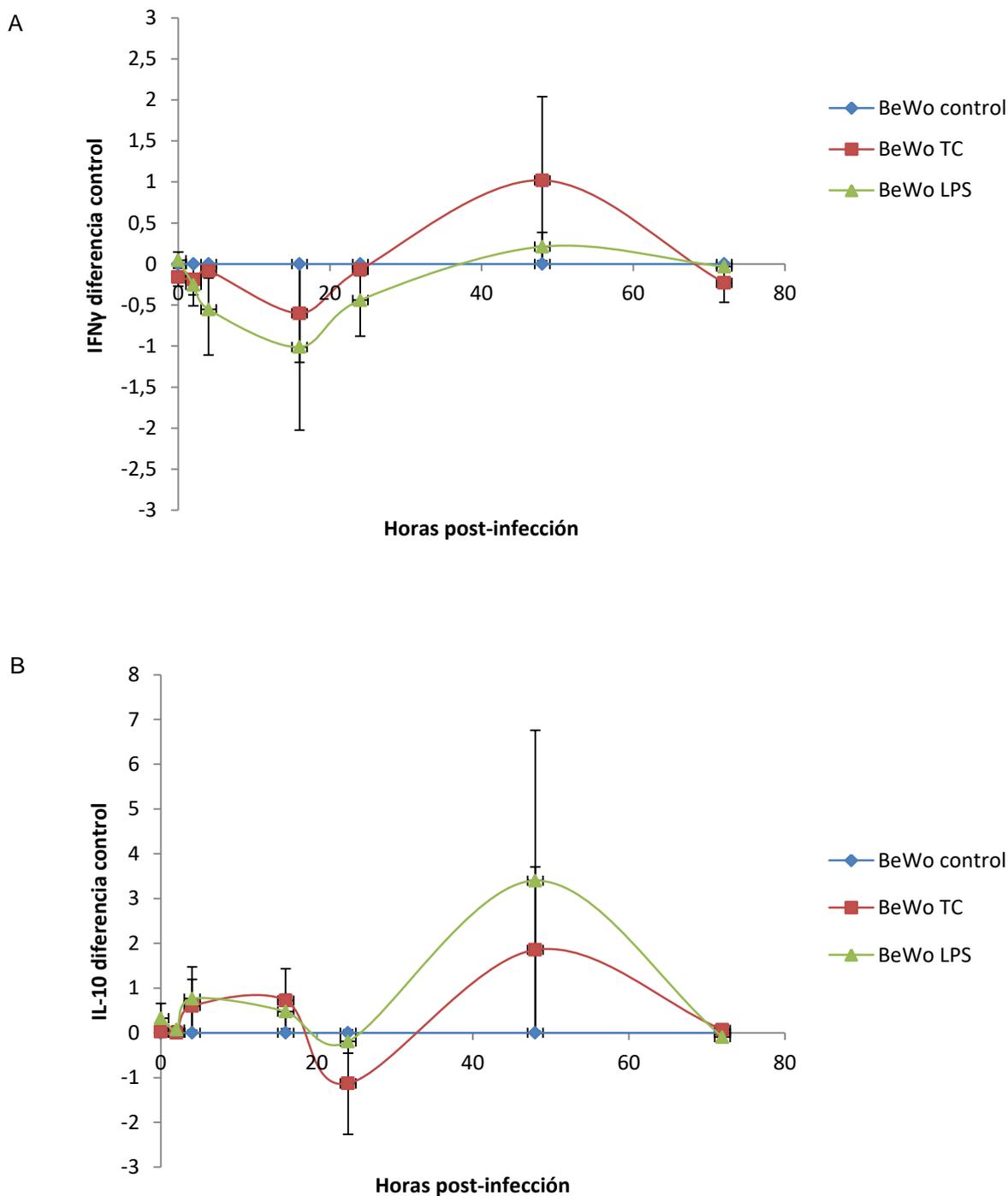
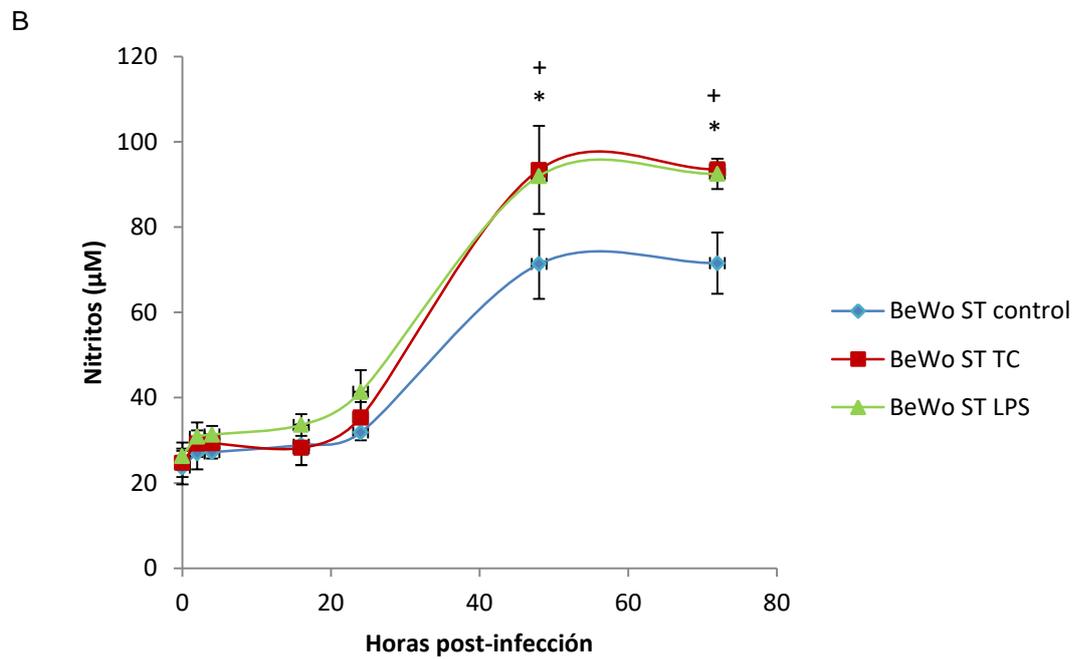
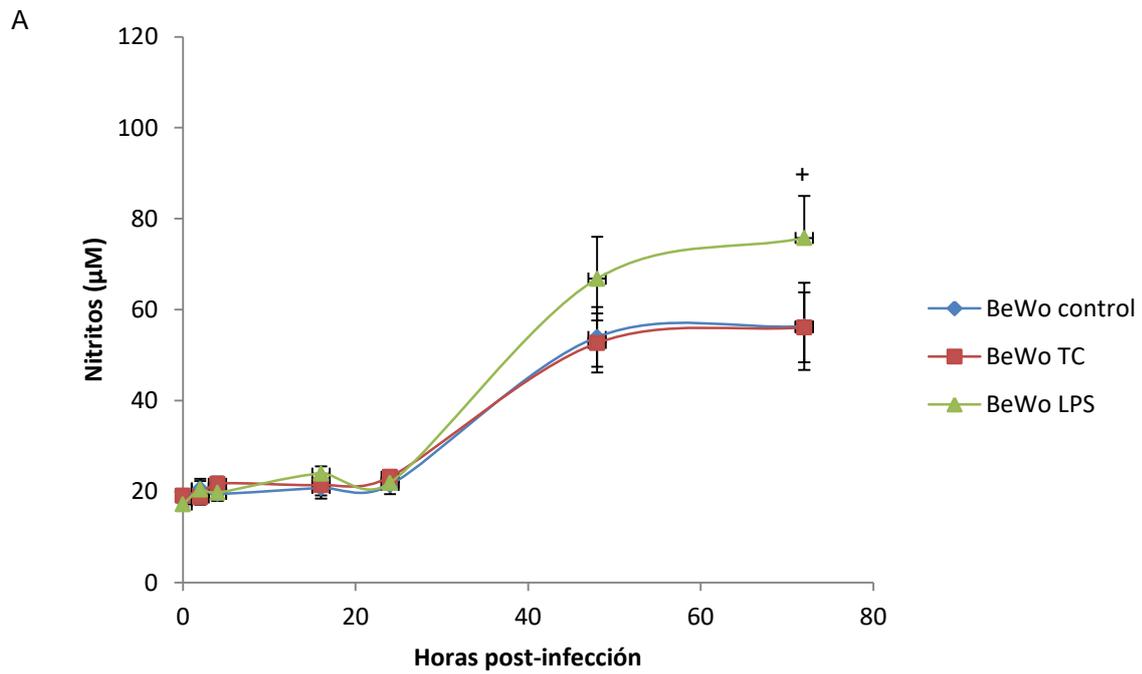


Figura 32. Cuantificación de citoquinas en sobrenadantes de cultivos de la línea celular BeWo obtenidos durante 0, 2, 4, 16, 24, 48 y 72 h post-infección con *T. cruzi* (BeWo TC) respecto al control sin infección (BeWo control) o tratadas con LPS (BeWo LPS). Las gráficas representan la diferencia de concentración en pg/ml.cél. con el control sin infección de A) IFN γ y B) IL-10, medido mediante ELISA. Se muestran como el valor de la media \pm EEM de 4 experimentos independientes.

Producción de óxido nítrico en la línea celular BeWo durante la infección por T. cruzi

Producción de óxido nítrico (NO). En el objetivo 1 se analizó la liberación de NO por parte de las células BeWo durante el proceso de invasión parasitaria encontrándose que BeWo ST produce mayor cantidad de NO el cual tendría un efecto deletéreo sobre *T. cruzi*, estimado en los ensayos de sobrevivencia del parásito utilizando medios condicionados provenientes de células BeWo y BeWo ST (Fig. 23). Durante la invasión del *T. cruzi* en las células BeWo no se encontraron diferencias en la producción de NO (Fig. 20). A los fines de extender el análisis del curso de la infección parasitaria se midió la producción de NO durante el ciclo de replicación del *T. cruzi*. Para ello, se midió la cantidad de NO como nitritos mediante Griess en sobrenadantes de cultivos de células BeWo y BeWo ST infectadas o no con *T. cruzi* o tratadas con LPS (control positivo), durante 0, 2, 4, 16, 24, 48 y 72 h, con cambio de medio a las 24 h (ver materiales y métodos). Los resultados no mostraron diferencias significativas en la producción de nitritos entre las células BeWo infectadas y el control sin infectar en ningún tiempo analizado (Fig. 33 A). Se observó que las células BeWo ST infectadas, durante la fase replicativa del parásito (48 h post-infección) producen mayor cantidad de NO en relación al control sin infección, aumento similar se detectó en el control positivo (LPS) ($p < 0,05$) (Fig. 33 B). Al comparar la producción de NO entre las células BeWo y BeWo ST ambas infectadas, se observó que BeWo ST secreta mayor cantidad de NO al medio de cultivo durante todo el proceso infeccioso, particularmente durante la fase replicativa del parásito (72 h), donde se encontró una diferencia de aproximadamente un 40% (Fig. 33 C).



C

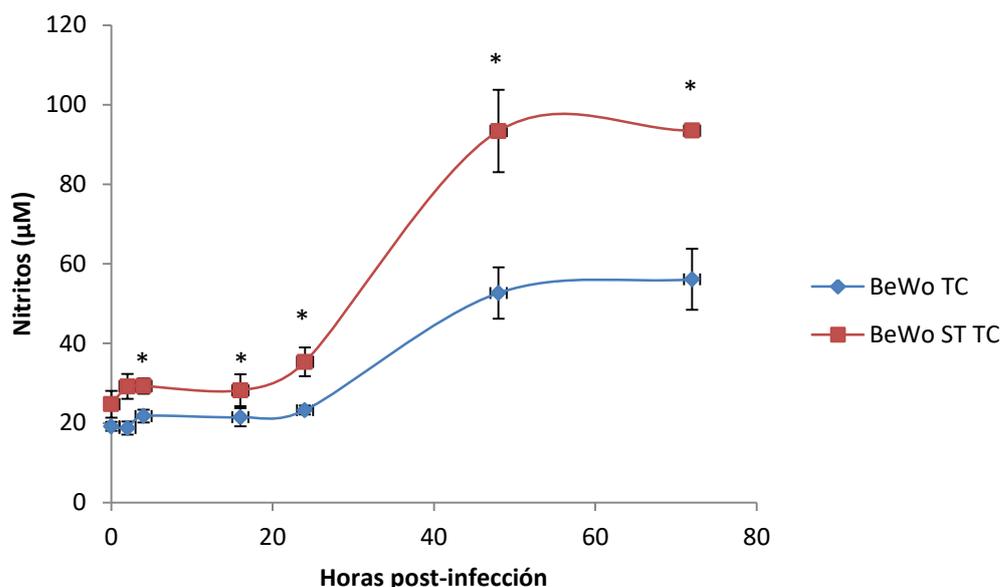


Figura 33. Producción de nitritos en sobrenadantes de cultivos de la línea celular BeWo cultivados durante 0, 2, 4, 16, 24, 48 y 72 h post-infección (TC) en relación a muestras controles (control) o tratadas con LPS. A) BeWo, B) BeWo ST. Las gráficas representan la concentración de nitritos μM , medido mediante Griess como el valor de la media \pm EEM de 4 experimentos independientes con una significancia $p < 0,05$ (prueba t de Student) de BeWo infectadas con respecto al control sin infección (*) y de BeWo tratadas con LPS con respecto al control sin infección (+). C) Se muestra en forma comparativa la concentración de nitritos en células BeWo y BeWo ST infectadas con *T. cruzi*. Las gráficas representan la concentración de nitritos μM como el valor de la media \pm EEM de 4 experimentos independientes, con una significancia $p < 0,05$ (prueba t de Student) de BeWo ST con respecto a BeWo (*).

Infección parasitaria en la línea celular BeWo

Como se demostró, la línea celular BeWo posee la capacidad de formar estructuras multinucleadas similares a STB (BeWo ST) al cultivarlas en presencia de FsK (Fig. 17). Además se confirmó que FsK origina diferenciación bioquímica determinada por el incremento en la secreción de la hormona β -hCG, indicador de sincicialización (Fig. 18). Con el fin de determinar la carga parasitaria en células BeWo y BeWo ST se realizaron inmunofluorescencias para marcación de unión celular y tinción de núcleos para determinación de infección parasitaria. La figura 34 muestra una mayor cantidad de nidos de amastigotes en las células BeWo que en las BeWo ST. Estos amastigotes se ubicaron cercanos al núcleo celular y son nidos con mayor cantidad de amastigotes que los encontrados en el tejido placentario (Fig. 28). En nuestro grupo de trabajo, se observó la misma disminución en la infección en aislados

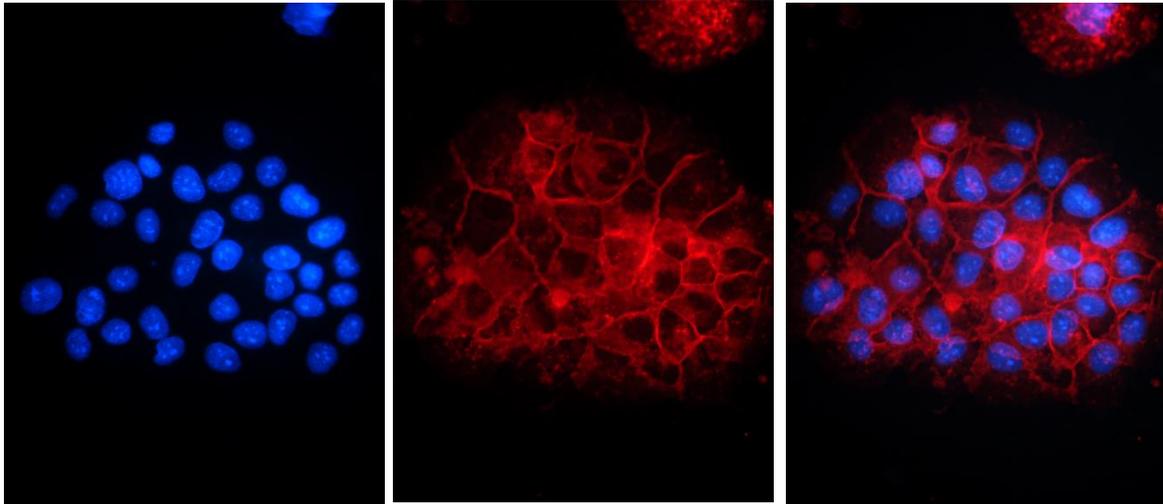
de sincitiotrofoblasto respecto al aislamiento de citotrofoblasto de placentas humanas (Díaz-Lujan y col., 2012).

Hoechst

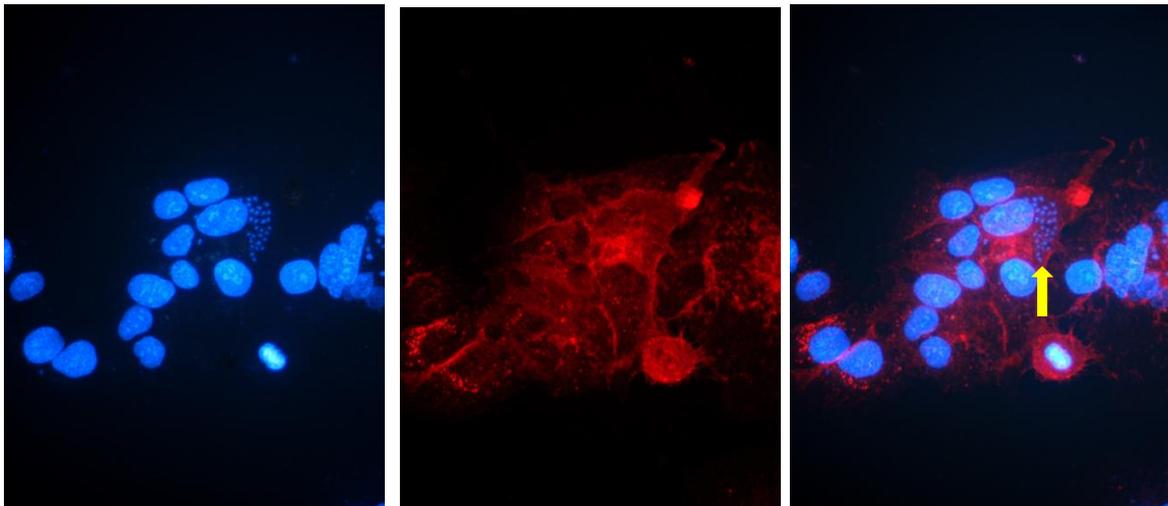
Desmoplaquina

Superposición

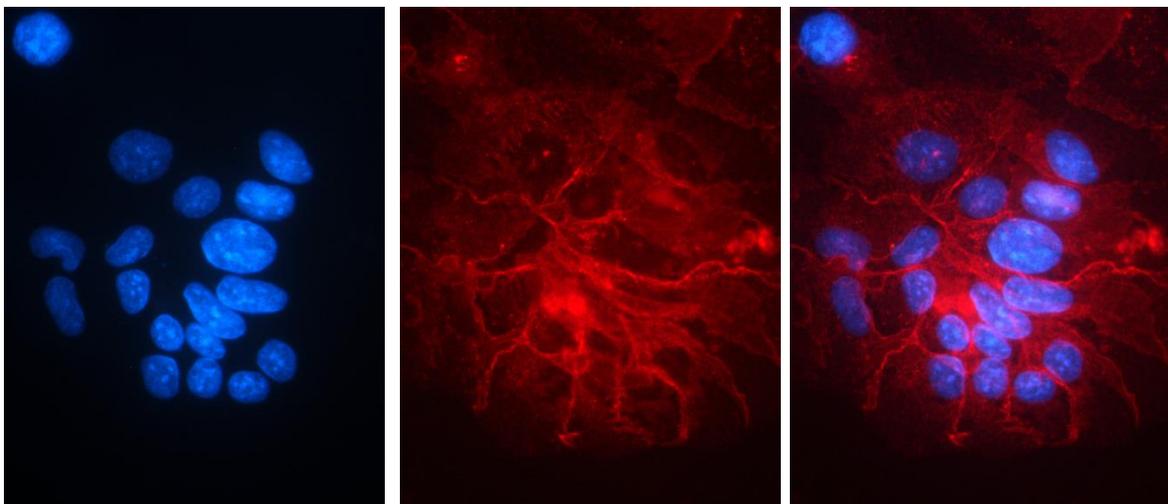
A



B



C



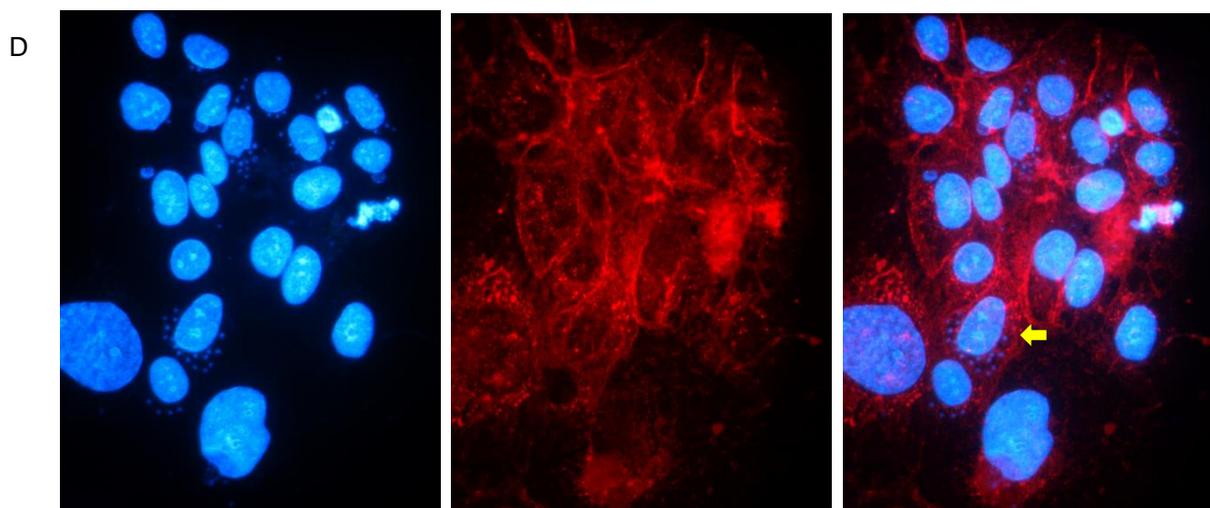


Figura 34. Inmunofluorescencia para marcación de desmoplaquina (rojo) y tinción nuclear con H \ddot{o} echst (azul). Superposición de imágenes para la localización de los núcleos en estructuras celulares (superposición). A) BeWo control sin infección a 72 h de cultivo B) BeWo con infección a 72 h de cultivo C) BeWo ST control sin infección a 72 h de cultivo D) BeWo ST con infección a 72 h de cultivo. Visualización de nidos de amastigotes (Flecha amarilla). Magnificación 400X.

Utilizando la técnica de tinción de núcleos con Giemsa, que no permite diferenciar la infección entre BeWo y BeWo ST, se detectó una mayor cantidad de amastigotes en las células en función del tiempo (Fig. 35).

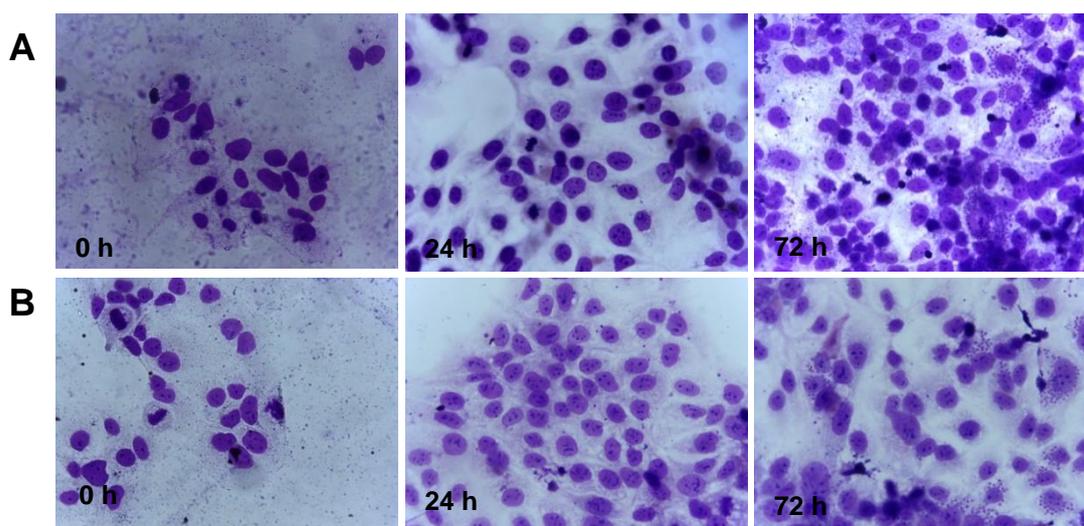


Figura 35. Marcación nuclear con Giemsa (violeta), A) BeWo B) BeWo ST, a 0, 24 y 72 h post-infección con *T. cruzi*. Magnificación 400X.

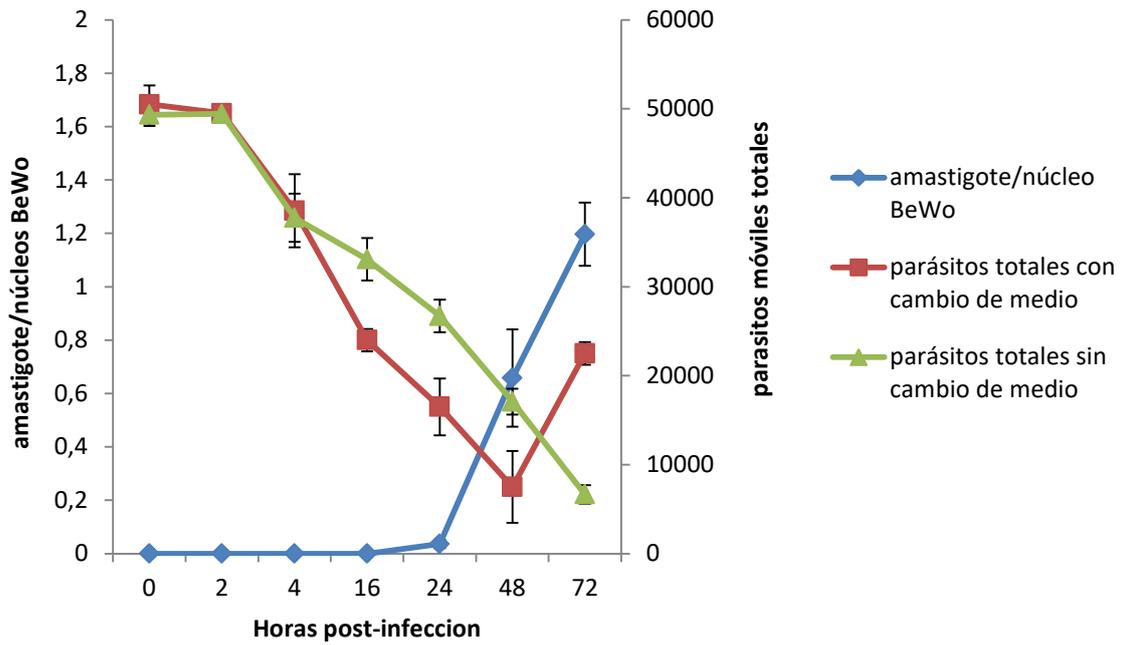
Cuantificación de la infección parasitaria en la línea celular BeWo

Anteriormente se demostró que las células BeWo ST producen mayor cantidad de NO y ROS, en relación a BeWo, y que en ensayos de sobrevivencia del parásito los medios condicionados provenientes de células BeWo ST resultan deletéreos para el parásito. Teniendo en cuenta el efecto de las células BeWo ST sobre la sobrevivencia del parásito, se analizaron los procesos de invasión y multiplicación parasitaria en células BeWo y BeWo ST. Para ello, se utilizó un diseño experimental que contempló infección durante 24 h, con cambio de medio sin nuevo agregado de parásitos, para analizar si había liberación al medio de cultivo de tripomastigotes, producto de la replicación intracelular. Por otro lado, como control se infectaron las células sin cambio de medio (ver materiales y métodos).

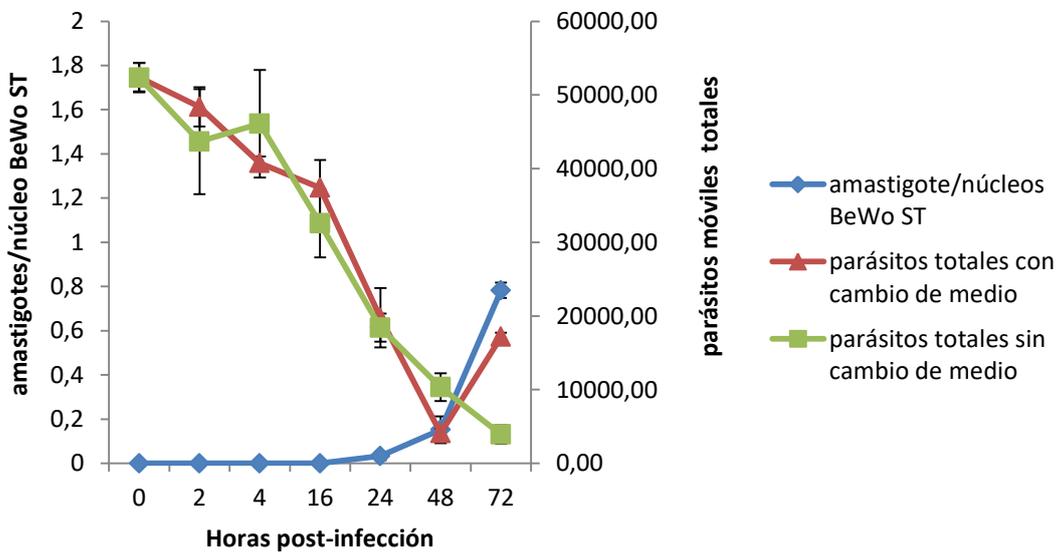
Se cuantificaron los parásitos móviles en el sobrenadante de cultivo de células BeWo y BeWo ST cultivados durante 0, 2, 4, 16, 24, 48 y 72 h post-infección con *T. cruzi*, con o sin cambio de medio a las 24 h. Los resultados muestran tanto en las células BeWo como BeWo ST una caída de más del 50% en la cantidad de parásitos móviles en el medio a las 24 h post-infección. En los ensayos realizados con cambio de medio sin nuevo agregado de parásitos, se observó liberación de parásitos al medio de cultivo en relación al sobrenadante sin cambio de medio durante las 48-72 h post-infección (Fig. 36 A y B).

Los resultados muestran un aumento de los nidos de amastigotes en células BeWo y BeWo ST a las 24 h post-infección, observándose aproximadamente 20-30 amastigotes por nido a las 72 h post-infección (Fig. 34); mientras que en los explantos se encontraron entre 3-5 amastigotes por nido (Fig. 28). Al comparar la cantidad de nidos de amastigotes entre las células BeWo y BeWo ST, se observó una disminución significativa en la infección en las células BeWo ST ($p < 0,05$). A las 72 h post-infección se detectó que las células BeWo poseían 3 veces más amastigote por núcleo que las BeWo ST (Fig. 36 C). Nótese que el número de amastigotes detectado está en relación inversa a la cantidad de NO y ROS presentes en estas células (ver Fig. 20, 21 y 23), sugiriendo que NO y ROS pueden ejercer un efecto deletéreo que limita la infección en las células BeWo ST.

A



B



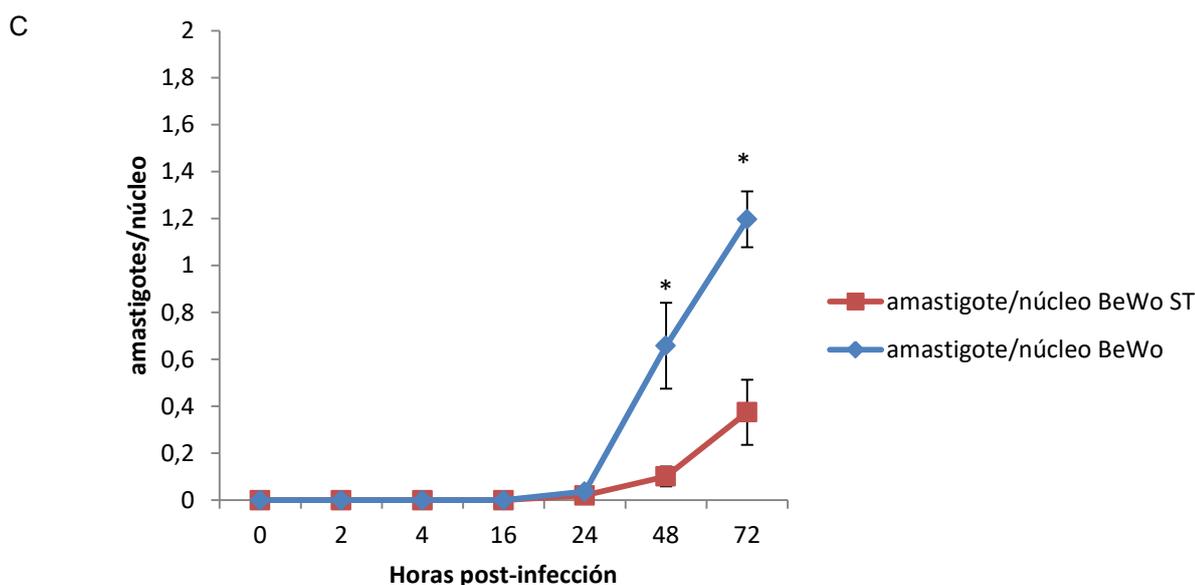


Figura 36. Infección parasitaria en las células BeWo y BeWo ST medida a 0, 2, 4, 16, 24, 48 y 72 h post-infección, con o sin cambio de medio a las 24 h. Cuantificación de parásitos móviles en el sobrenadante de cultivo y nidos de amastigotes en las células BeWo (A) y BeWo ST (B). Los resultados se muestran como amastigotes por núcleo. C) Se muestra en forma comparativa la cuantificación de amastigotes en las células BeWo y BeWo ST. Las gráficas representan el valor de la media \pm EEM de 4 experimentos independientes, con una significancia $p < 0,05$ (prueba t de Student) de amastigote en BeWo ST en relación a amastigote en BeWo (*).

Efecto del tratamiento con IFN γ en la infección del tejido placentario por *T. cruzi*.

El estado inmunológico tanto materno como fetal juega un rol muy importante en la transmisión congénita de la enfermedad de Chagas. Se ha reportado en lactantes infectados congénitamente, con bajas o con altas parasitemias, bajos niveles séricos de IFN γ (Volta y col., 2016). Se describió, una respuesta innata disminuida en madres chagásicas transmisoras con una baja liberación de IFN γ y TNF α (Carlier y Truyens, 2015; Bustos y col., 2019). Además se demostró que, en la infección por *T. cruzi*, macrófagos, NK, linfocitos T y B producen citoquinas pro-inflamatorias como el IFN γ , TNF α , IL-12 y NO (Junqueira y col., 2010; Gutierrez, 2011). Estos reportes sugieren que el ambiente inmune pro-inflamatorio influye sobre la invasión y multiplicación del parásito. A los fines de evaluar si la infección placentaria por *T. cruzi* es alterada por un cambio en el perfil de citoquinas, se trató a los explantos placentarios con IFN γ recombinante humano, previo y durante la infección.

Controles de viabilidad parasitaria y de tejido

Inicialmente se evaluó la toxicidad del IFN γ recombinante sobre los parásitos y la viabilidad del tejido placentario al ser expuesto a las distintas condiciones experimentales. Para ello, se incubaron durante 2 h los parásitos en medio con y sin IFN γ , y posteriormente se los cuantificó. La viabilidad del tejido se evaluó mediante ensayo de MTT posterior a las 72 h de cultivo en cada condición. Se observó, mediante recuento de parásitos móviles y viabilidad del tejido por MTT, que el tratamiento con IFN γ (20 ng/mL) no afectó los parámetros evaluados (Fig. 37 A y B).

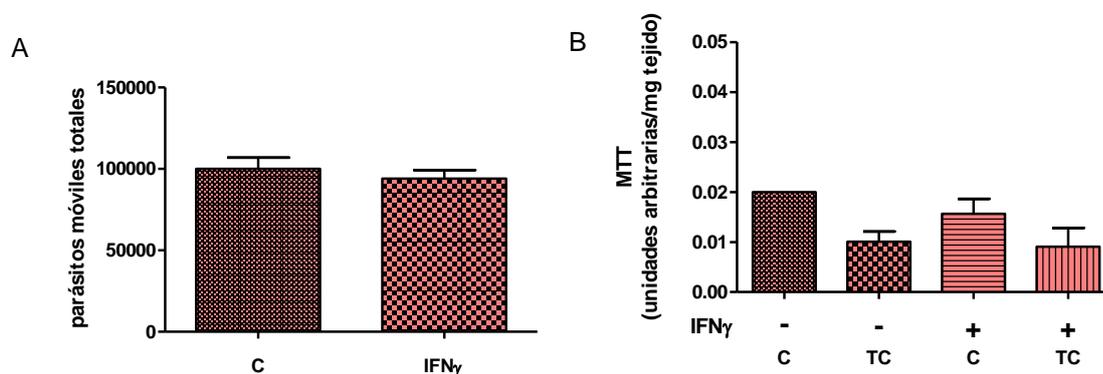


Figura 37. Controles de viabilidad. A) Parásitos móviles posteriores a 2 h de incubación en presencia (IFN γ) o ausencia (C) de IFN γ , los resultados se muestran como parásitos móviles totales. B) Viabilidad del explantos placentarios infectados (TC) y sin infección (C) en presencia de IFN γ (IFN γ +) o sin (IFN γ -), los resultados se expresan unidades arbitrarias en relación al peso en mg de explantos placentario. Las gráficas representan el valor de la media \pm EEM de 4 experimentos independientes.

Infección con *T. cruzi* en tejido placentario tratado con IFN γ

Con el fin de evaluar si el tratamiento con IFN γ modifica la invasión y/o multiplicación del parásito en el tejido placentario. Se determinó la carga parasitaria mediante cuantificación de ADN de *T. cruzi* en los explantos placentarios infectados tratados o no con IFN γ . Los resultados no mostraron diferencias significativas en la carga parasitaria en los cultivos tratados con IFN γ durante la invasión (24 h) y replicación (72 h) con respecto a los explantos no tratados (Fig. 38 A y B).

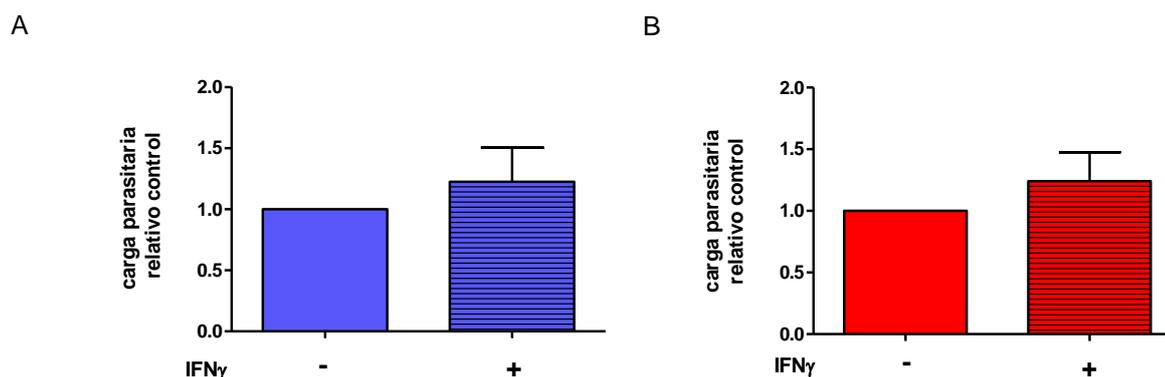


Figura 38. Carga parasitaria en tejido placentario A) 24 h post-infección y B) 72 h post-infección con *T. cruzi* (TC), tratados con IFN γ (IFN γ +) o sin tratar (IFN γ -). Los resultados expresan la carga parasitaria en parásito/ng de ADN total relativa a los explantos infectados no tratados. La gráfica representa el valor de la media \pm EEM de 4 experimentos independientes.

Para determinar el efecto del tratamiento con IFN γ en la infección placentaria por *T. cruzi* se cuantificaron los parásitos móviles en los sobrenadantes de cultivo de los explantos placentarios con o sin tratamiento con IFN γ . Los resultados indican que no hubo diferencias significativas en el recuento de parásitos móviles en el sobrenadante de cultivo en los tejidos tratados con IFN γ en relación al control sin tratamiento durante la invasión (24 h) así como durante la replicación (72 h), observándose una caída en el número de parásitos móviles en los sobrenadantes, como se ha visto en los demás ensayos durante el proceso de replicación en relación al de invasión (Fig. 39 A y B).

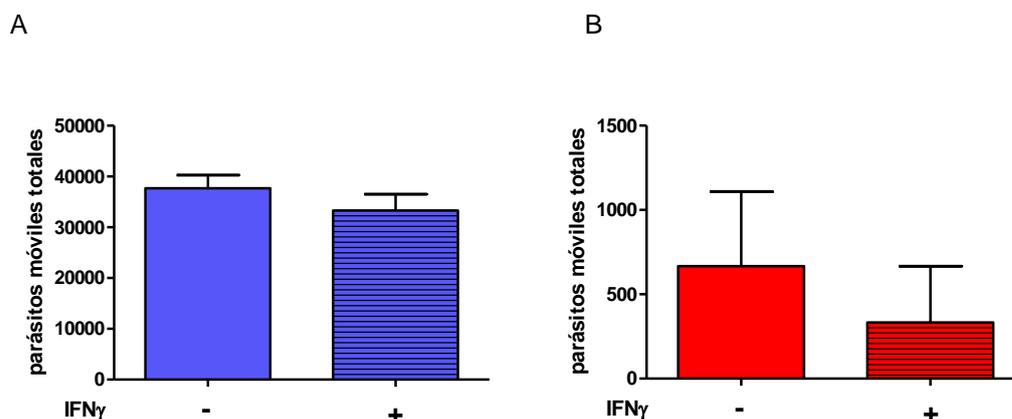


Figura 39. Parásitos móviles en el sobrenadante de cultivos de explantos placentarios A) 24 h post-infección y B) 72 h post-infección con *T. cruzi* (TC), en presencia de IFN γ (IFN γ +) o sin (IFN γ -). Los resultados se muestran como parásitos móviles totales. Las gráficas representan el valor de la media \pm EEM de 4 experimentos independientes.

Perfil de citoquinas frente al tratamiento y la infección de *T. cruzi*

Citoquinas pro-inflamatorias. Se ha descrito que TNF α es activado en macrófagos por IFN γ en presencia del parásito (Gutierrez, 2011). No se ha reportado que el IFN γ active directamente IL-1 β en infecciones parasitarias. Con el propósito de analizar si el tratamiento del tejido placentario con IFN γ modifica la producción de las citoquinas pro-inflamatorias analizadas en respuesta a la infección con *T. cruzi*, se determinó la concentración de TNF α e IL-1 β mediante ELISA en sobrenadantes de cultivo de explantos placentarios con y sin tratamiento con IFN γ y en presencia o no de *T. cruzi*.

Los resultados de la cuantificación de TNF α muestran que a 24 h post-infección no hay diferencias significativas en su secreción en los explantos tratados en ninguna condición analizada (Fig. 40 A). A 72 h de cultivo, el tratamiento con IFN γ indujo un aumento significativo de 2 veces en la secreción de TNF α ($p < 0,05$). Nuevamente, la presencia del parásito en los explantos no tratados con IFN γ indujo un aumento de la citoquina como se demostró en los ensayos anteriores de cinéticas de infección (Fig. 24 A). Sin embargo, la infección de los explantos no modificó el incremento de TNF α inducido por la presencia de IFN γ ($p < 0,05$) (Fig. 40 B).

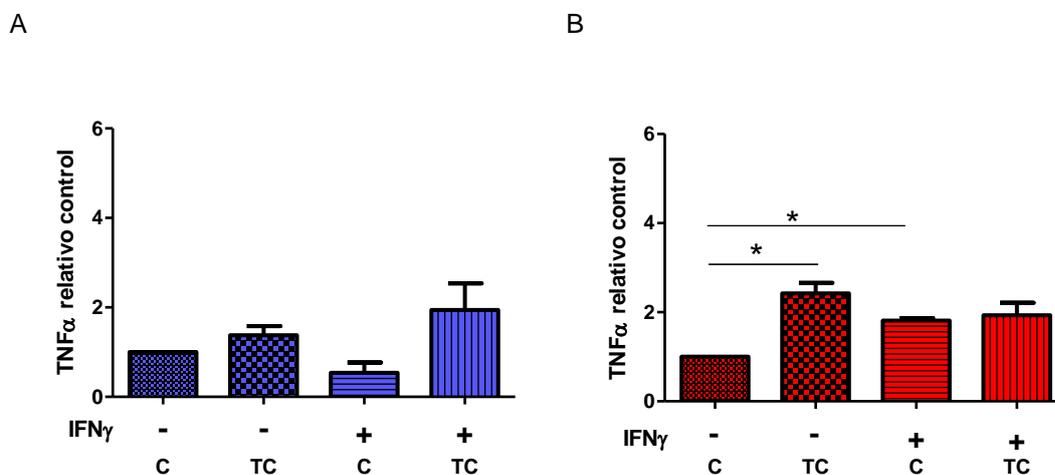


Figura 40. Cuantificación de TNF α en sobrenadantes de cultivo de explantos placentarios con tratamiento con IFN γ (IFN γ +) o sin tratamiento (IFN γ -), y en presencia de *T. cruzi* (TC) o no (C). A) 24 h post-infección y B) 72 h post-infección. Los resultados se muestran como la concentración de TNF α en pg/ml.mg tejido relativa al control sin infección ni tratamiento con IFN γ . * $p < 0,05$ (ANOVA de dos vías, post-test de Bonferroni). Las gráficas representan el valor de la media \pm EEM de 4 experimentos independientes.

En relación a IL-1 β , los resultados muestran que el tratamiento con IFN γ sin infección no produjo cambios en la secreción de la citoquina (Fig. 41 A y B). Sin

embargo se observó un aumento de la citoquina durante el proceso multiplicativo del parásito (72 h) en ausencia de IFN γ , como se mostró previamente (Fig. 24 B). La presencia de IFN γ conjuntamente con el parásito disminuyó la secreción de IL-1 β en relación a la infección sin tratamiento ($p < 0,05$).

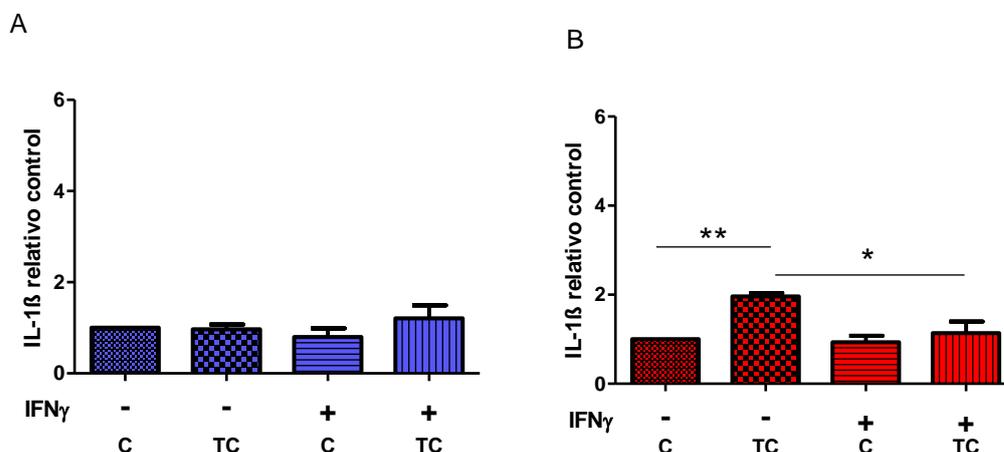


Figura 41. Cuantificación de IL-1 β en sobrenadantes de cultivo de explantos placentarios con tratamiento con IFN γ (IFN γ +) o sin tratamiento (IFN γ -), y en presencia de *T. cruzi* (TC) o no (C). A) 24 h post-infección y B) 72 h post-infección. Los resultados se muestran como la concentración de IL-1 β en pg/ml.mg tejido relativa al control sin infección ni tratamiento con IFN γ . * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ (ANOVA de dos vías, post-test de Bonferroni). Las gráficas representan el valor de la media \pm EEM de 4 experimentos independientes.

Citoquinas anti-inflamatorias. Según la bibliografía consultada, el IFN γ no induce secreción de IL-10 e IL-4 en procesos infecciosos, pero como demostramos anteriormente, la presencia de IFN γ activa otras citoquinas que pueden afectar a IL-10 e IL-4. Con el objetivo de evaluar si el tratamiento del tejido placentario con IFN γ modifica la producción de las citoquinas anti-inflamatorias ensayadas en condiciones basales (sin infección), se determinó la concentración de IL-10 e IL-4 mediante ELISA en sobrenadantes de cultivo de explantos placentarios con y sin tratamiento con IFN γ y en presencia o no de *T. cruzi* a 24 y 72 h post-infección.

Los resultados obtenidos no mostraron diferencias significativas en la secreción de IL-10 durante el proceso de invasión parasitaria (Fig. 42 A). Sin embargo, se observó un aumento de la citoquina durante el proceso multiplicativo del parásito (72 h) en ausencia de IFN γ , como se mostró previamente (Fig. 25 A). La presencia de IFN γ conjuntamente con el parásito no modificó la secreción de IL-10 en relación a la infección sin tratamiento (Fig. 42 B).

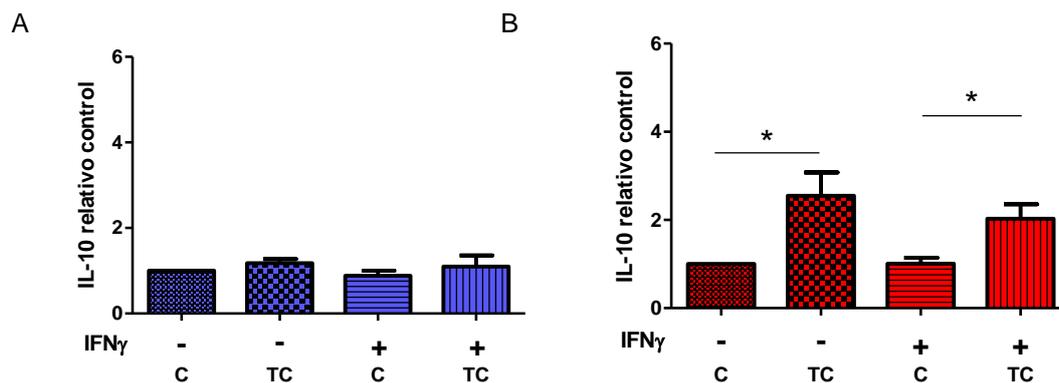


Figura 42. Cuantificación de IL-10 en sobrenadantes de cultivo de explantos placentarios con tratamiento con IFN γ (IFN γ +) o sin tratamiento (IFN γ -), y en presencia de *T. cruzi* (TC) o no (C). A) 24 h post-infección y B) 72 h post-infección. Los resultados se muestran como la concentración de IL-10 en pg/ml.mg tejido relativa al control sin infección ni tratamiento con IFN γ . * $p < 0,05$ (ANOVA de dos vías, post-test de Bonferroni). Las gráficas representan el valor de la media \pm EEM de 4 experimentos independientes.

En relación a IL-4, los resultados muestran que no hubo diferencias significativas en las condiciones ensayadas tanto durante el proceso de invasión (Fig. 43 A) como en el de multiplicación (Fig. 43 B).

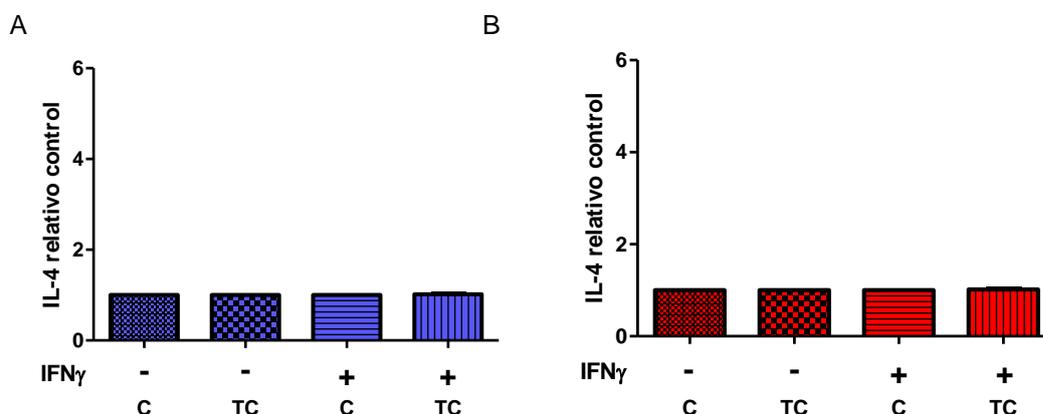


Figura 43. Cuantificación de IL-4 en sobrenadantes de cultivo de explantos placentarios con tratamiento con IFN γ (IFN γ +) o sin tratamiento (IFN γ -), y en presencia de *T. cruzi* (TC) o no (C). A) 24 h post-infección y B) 72 h post-infección. Los resultados se muestran como la concentración de IL-4 en pg/ml.mg tejido relativa al control sin infección ni tratamiento con IFN γ . Las gráficas representan el valor de la media \pm EEM de 4 experimentos independientes.

Relación TNF α /IL-10. Debido a que se encontró un aumento tanto en citoquinas anti- como pro-inflamatorias y con el fin de establecer el perfil inmunológico predominante, se determinó la relación entre las concentraciones de TNF α e IL-10 en los sobrenadantes de cultivo de explantos placentarios con o sin tratamiento con IFN γ y en presencia o no de *T. cruzi*.

Los resultados indican que en los explantos infectados con *T. cruzi* sin IFN γ , hubo una tendencia no significativa con un predominio de un ambiente pro-inflamatorio durante la etapa de invasión (24 h post-infección) (Fig. 44 A), que luego, durante la multiplicación parasitaria (72 h post-infección) tiende a disminuir ganando preponderancia IL-10 (Fig. 44 B). En el caso de los explantos solo tratados con IFN γ se observó a mayor tiempo de tratamiento (72 h) mayor inducción del perfil pro-inflamatorio. En los explantos tratados con IFN γ e infectados con *T. cruzi* se revierte ese perfil inmunológico pro-inflamatorio. La presencia del parásito en una primera interacción (24 h) con los explantos tratados con IFN γ genera una respuesta pro-inflamatoria pero con el tiempo de la infección (72 h) comienza a predominar un perfil anti-inflamatorio (Fig. 44 B).

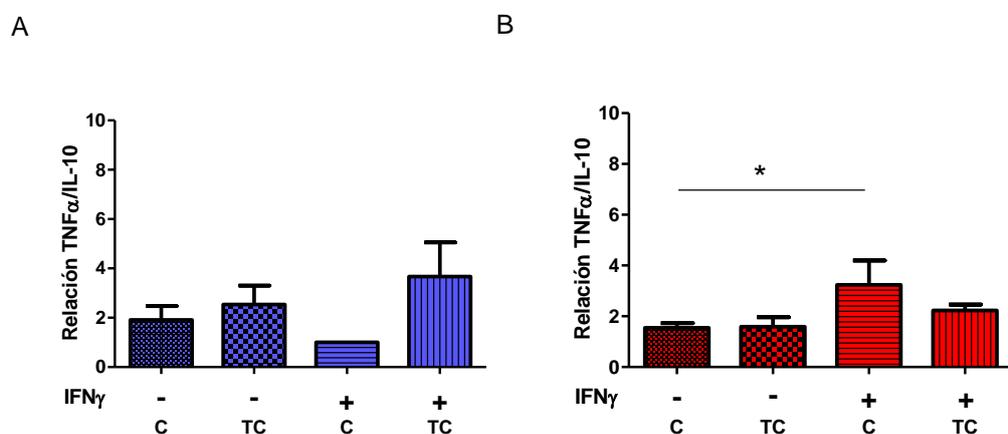


Figura 44. Relación TNF α /IL-10 en sobrenadantes de cultivo de tejidos placentarios con tratamiento con IFN γ (IFN γ +) o sin tratamiento (IFN γ -), y en presencia de *T. cruzi* (TC) o no (C). A) 24 h post-infección y B) 72 h post-infección. Los resultados se muestran como el cociente entre las concentraciones de TNF α e IL-10. * $p < 0,05$ (ANOVA de dos vías, post-test de Bonferroni). Las gráficas representan el valor de la media \pm EEM de 4 experimentos independientes.

Metabolitos mediadores de la infección con *T. cruzi* frente al tratamiento con IFN γ

Como se muestra en la figura 44, se observó una disminución en la relación TNF α /IL-10 con el tiempo de cultivo en los explantos placentarios tratados con IFN γ e infectados con *T. cruzi*, acompañado con una tendencia no significativa al aumento de la carga parasitaria. Como se describió en la introducción (Fig. 8), el parásito podría estar favoreciendo un proceso de supervivencia mediado por arginasas que desvían la producción de NO hacia urea y poliaminas, disminuyendo los metabolitos deletéreos para el *T. cruzi* y favoreciendo la aparición de metabolitos facilitadores de la

multiplicación parasitaria (Stempin y col., 2002; 2007). Con el fin de establecer si en el tejido placentario infectado con *T. cruzi* existe un mecanismo similar de evasión de la respuesta inmune pro-inflamatoria por parte del parásito para favorecer su crecimiento, se analizó el efecto del tratamiento con IFN γ sobre la producción de NO y urea.

Producción de óxido nítrico (NO). Se determinó la producción de NO como indicador del proceso mediado por arginasas. Para ello, se cuantificó la concentración de nitritos en sobrenadante de cultivo de tejidos placentarios con o sin tratamiento con IFN γ y en presencia o no de *T. cruzi* a 24 y 72 h post-infección. Los resultados indican que a las 24 h post-infección no hay diferencias significativas en los nitritos secretados al medio en ninguna de las condiciones ensayadas (Fig. 45 A). Sin embargo, a las 72 h post-infección se observó una disminución significativa del 25% de nitritos ($p < 0,001$) en los explantos tratados con IFN γ e infectados respecto a los explantos solo infectados (Fig. 45 B), como también en relación a los explantos solo tratados con IFN γ .

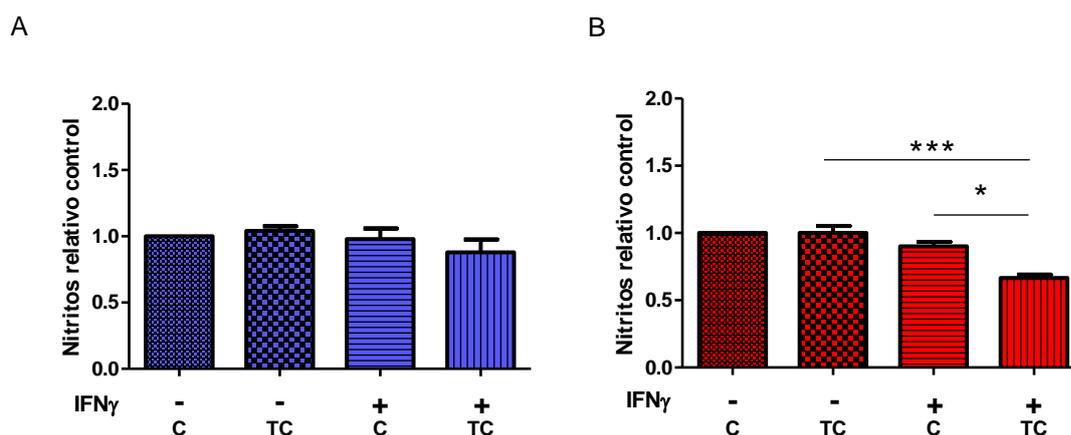


Figura 45. Cuantificación de nitritos en sobrenadantes de cultivo de tejidos placentarios con tratamiento con IFN γ (IFN γ +) o sin tratamiento (IFN γ -), y en presencia de *T. cruzi* (TC) o no (C). A) 24 h post-infección y B) 72 h post-infección. Los resultados se muestran como la concentración en μ M de nitritos relativa al control sin infección ni tratamiento con IFN γ . * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$ (ANOVA de dos vías, post-test de Bonferroni). Las gráficas representan el valor de la media \pm EEM de 4 experimentos independientes.

Producción de urea. Con el propósito de determinar si la disminución de nitritos mostrada anteriormente, se debe a un proceso de evasión de la respuesta inmune pro-inflamatoria por parte del parásito para favorecer su crecimiento, se analizó la producción de urea como producto final del mecanismo de supervivencia mediado por arginasas. Para ello, se cuantificó la urea en sobrenadantes de cultivo de tejidos placentarios tratados o no con IFN γ y en presencia o no de *T. cruzi*. Los resultados

indican que a 24 h post-infección no hay diferencias significativas en la urea producida en relación al control, en ninguna de las condiciones ensayadas (Fig. 46 A). Sin embargo, a las 72 h post-infección se observó aumento significativo de 3 veces ($p < 0,05$) en los explantos tratados con IFN γ e infectados en relación a los explantos solo infectados (Fig. 46 B). Además, se demostró que en los explantos tratados con IFN γ la presencia del parásito aumenta la producción de urea ($p < 0,05$) en relación a los solo tratados.

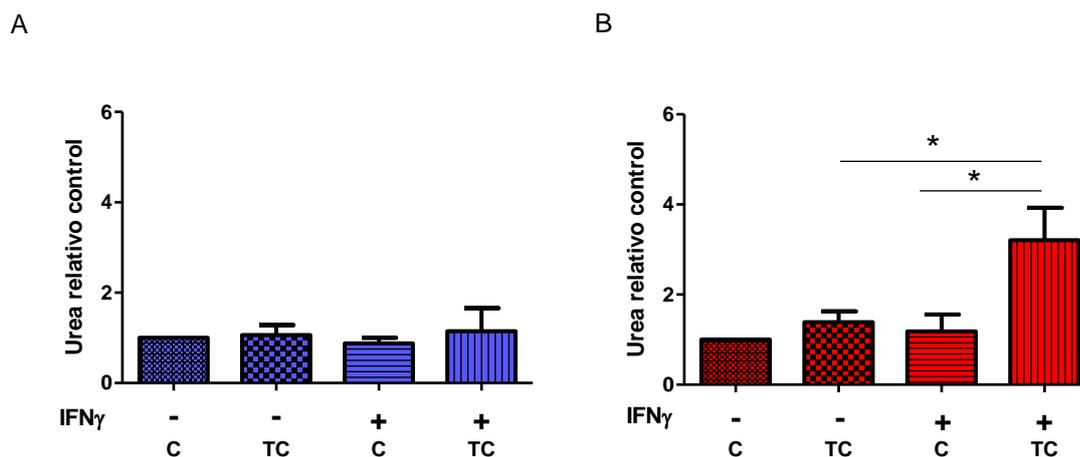


Figura 46. Cuantificación de urea en sobrenadantes de cultivo de tejidos placentarios con tratamiento con IFN γ (IFN γ +) o sin tratamiento (IFN γ -), y en presencia de *T. cruzi* (TC) o no (C). A) 24 h post-infección y B) 72 h post-infección. Los resultados se muestran como la concentración de urea en g/l.mg tejido relativa al control sin infección ni tratamiento con IFN γ . * $p < 0,05$ (ANOVA de dos vías, post-test de Bonferroni). Las gráficas representan el valor de la media \pm EEM de 4 experimentos independientes.

Efecto de la regulación de la actividad del factor de transcripción NF- κ B en la infección del tejido placentario por *T. cruzi*.

En el objetivo anterior, se mostró que un perfil pro-inflamatorio no inhibe la replicación del parásito en las condiciones ensayadas, pero podría ser limitante de una mayor infección. Como se mencionó en la introducción, NF- κ B se activa mediante una variedad de señales inflamatorias, lo que resulta en una expresión coordinada de múltiples genes que codifican a proteínas implicadas en la respuesta inmune inflamatoria e innata. A su vez, citoquinas pro-inflamatorias como IL-1 β y TNF α activan NF- κ B, y su expresión se induce en respuesta a la activación de NF- κ B, formando así un circuito amplificador de alimentación positiva (Bonizzi y Karin, 2004; Perkins, 2007; Zoltan y col., 2015; Ghosh y Dass, 2016). El *T. cruzi* también activa NF- κ B, y está asociado con un aumento de la expresión de moléculas de adhesión, NO y TNF α

(Petersen y col., 2006; Silva y col., 2010; Gutierrez, 2011). Con el objeto de analizar si un perfil inmunológico pro-inflamatorio disminuido puede modular la infección por *T. cruzi* en el tejido placentario modificando la carga parasitaria y la producción de citoquinas durante la infección por *T. cruzi* los explantos placentarios se trataron con los inhibidores de la vía clásica de NF- κ B, sulfasalazina (SULF) y N-acetil-cisteína (NAC) previo y durante la infección parasitaria. Se utilizaron concentraciones a las que ambos fármacos tienen la capacidad de bloquear el NF- κ B en ensayos de cultivo de explantos placentarios (Lappas y col., 2002; 2004). Por otro lado, nuestro grupo de trabajo ya ha trabajado con NAC como *scavenger* de ROS para analizar su efecto sobre la infección por *T. cruzi* en tejido placentario pero en concentraciones que no alcanzaban a bloquear NF- κ B (Triquell y col., 2018).

Controles de viabilidad parasitaria y de tejido

Inicialmente se evaluó la toxicidad de SULF y NAC sobre la viabilidad de los parásitos. Para ello, se los incubó durante 2 h en los medios con las mismas concentraciones de fármacos y vehículo utilizados en el ensayo, y posteriormente se cuantificaron los parásitos móviles en los medios de cultivo así como su viabilidad. Los resultados indican que ninguno de los fármacos o el vehículo ensayados tienen efecto deletéreo sobre el *T. cruzi* (Fig. 47 A y B).

A

B

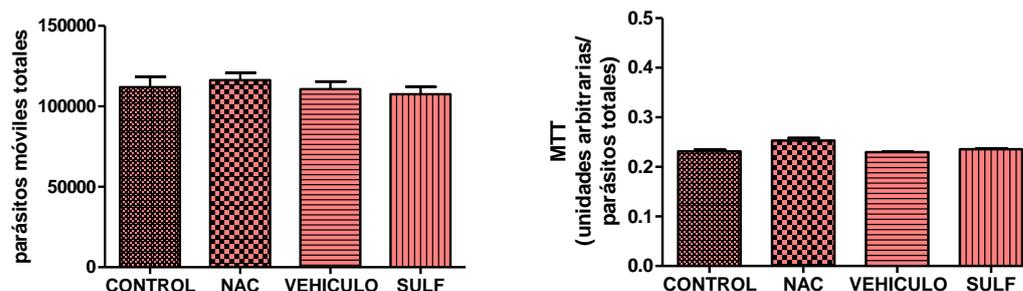


Figura 47. Controles de viabilidad parasitaria frente al tratamiento con SULF o NAC. A) Recuento de parásitos móviles posterior a 2 h de incubación en las condiciones indicadas. Los resultados se muestran como parásitos móviles totales B) Viabilidad de tejido placentario evaluada por MTT. Los resultados se expresan como unidades arbitrarias relativas en relación a parásitos totales. Las gráficas representan el valor de la media \pm EEM de 4 experimentos independientes.

Además, se determinó si los fármacos o el vehículo utilizados afectan la viabilidad del tejido placentario en todas las condiciones de experimentación utilizadas. Los resultados muestran que no se encontraron diferencias significativas entre el

control y los explantos tratados con SULF, NAC y vehículo en presencia del parásito o LPS durante 72 h de cultivo (Fig. 48).

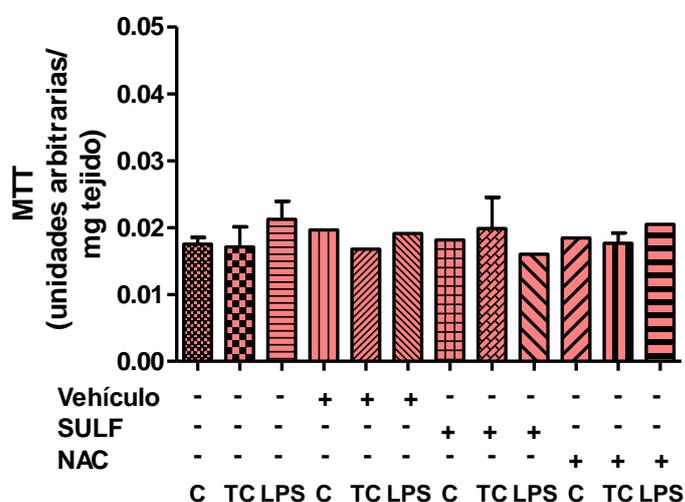


Figura 48. Controles de viabilidad de tejido placentario tratado con SULF, NAC o vehículo en presencia (TC) o no del parásito (C) o tratados con LPS. Los resultados de viabilidad de tejido placentario evaluado por MTT, se muestran como unidades arbitrarias relativas en relación a peso en mg de explanto placentario. Las gráficas representan el valor de la media \pm EEM de 4 experimentos independientes.

Infección con *T. cruzi* en tejido placentario tratado con SULF y NAC

Durante el transcurso de este trabajo de tesis otro grupo de investigación reportó la participación del NF-kB en la infección de explantos placentarios por *T. cruzi*. Se determinó que tanto la vía clásica como la alternativa del NF-kB se activan en presencia del parásito (Liempi y col., 2019). Los autores observaron que al inhibir la vía clásica (mediante el uso de BAY) como la alternativa (mediante el uso de isoquinoline-1, 3 (2H, 4H) – dione) durante 2 h previo a la infección, la carga parasitaria aumenta entre 1,5-1,75 veces en relación al control sin infección (Liempi y col., 2019). Con el fin de evaluar si la infección se alteraba en presencia de inhibidores de esta vía, se determinó la carga parasitaria en los explantos placentarios infectados y tratados o no con SULF o NAC, y en el control y control de SULF (vehículo). Los resultados muestran que durante la fase de multiplicación parasitaria hay un aumento significativo de entre 1,86 y 1,60 veces en la carga parasitaria en los explantos tratados con SULF y NAC respectivamente, en relación a sus controles ($p < 0,05$) (Fig. 49).

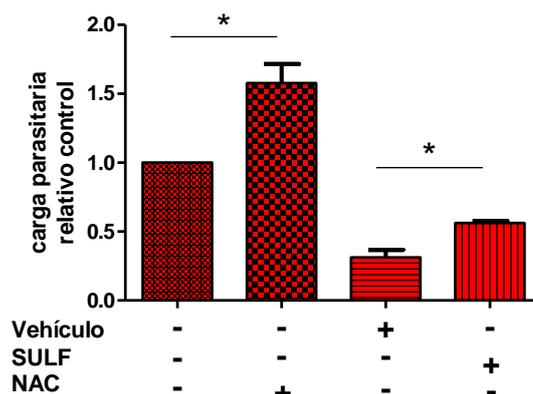


Figura 49. Carga parasitaria en tejido placentario tratado con SULF (SULF +), NAC (NAC +) o vehículo (Vehículo +) a 72 h post-infección. Los resultados se expresan como la carga parasitaria en parásito/ng ADN total relativa a los explantos infectados no tratados. * $p < 0,05$ (prueba U de Mann-Whitney). La gráfica representa el valor de la media \pm EEM de 4 experimentos independientes.

Se cuantificaron los parásitos móviles en sobrenadantes de cultivo de explantos placentarios infectados y tratados o no con SULF o NAC, y sus respectivos controles, durante la invasión (24 h) y replicación (72 h) parasitaria. Los resultados indican que no hubo diferencias significativas en el recuento de parásitos móviles a 24 y 72 h post-infección (Fig. 50 A y B), con una tendencia a disminuir el número de los parásitos móviles en el sobrenadante durante la multiplicación parasitaria, como se ha visto en los demás ensayos en el proceso de replicación (Fig. 28 B). Se debe hacer notar que se detectaron tripomastigotes en el sobrenadante del medio de cultivo posterior al cambio de medio a las 24 h, sugiriendo una multiplicación parasitaria.

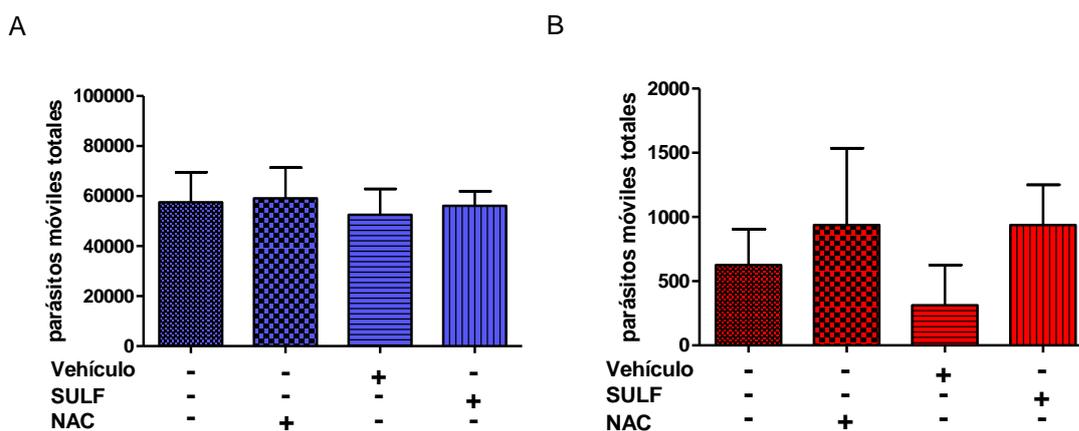


Figura 50. Parásitos móviles en los sobrenadantes de cultivo de explantos placentarios tratado con SULF (SULF +), NAC (NAC +) o vehículo (Vehículo +) A) 24 h post-infección y B) 72 h post-infección. Los resultados se muestran como parásitos móviles totales. Las gráficas representan el valor de la media \pm EEM de 4 experimentos independientes.

Perfil de citoquinas frente al tratamiento con SULF o NAC y la infección de *T. cruzi*

Citoquinas pro-inflamatorias. Se ha descrito que la activación de la vía del NF- κ B en macrófagos infectados con *T. cruzi* se acompaña con un aumento de la expresión de TNF α e IL-1 β , entre otras citoquinas pro-inflamatorias (Gutierrez, 2011). Con el objeto de analizar si la regulación del NF- κ B en tejido placentario infectado por *T. cruzi* afecta la producción de estas citoquinas, se cuantificó la concentración de TNF α e IL-1 β en sobrenadantes de cultivo de explantos placentarios con o sin tratamiento con SULF o NAC o en presencia o no de *T. cruzi* o LPS.

Los resultados muestran que el agregado de NAC produce una disminución significativa de más del 50% en la secreción de TNF α tanto a 24 como 72 h de cultivo, en todas las condiciones analizadas ($p < 0,05$; $p < 0,01$) (Fig. 51). Cuando se trataron los explantos placentarios con SULF no fue posible determinar la concentración de TNF α en el sobrenadante de cultivo de ninguno de los tiempos ensayados (Fig. 52). Otros autores han encontrado resultados similares a nuestros experimentos controles, en explantos placentarios tratados con las mismas dosis de NAC y SULF (Lappas y col., 2002; Dharane y col., 2010).

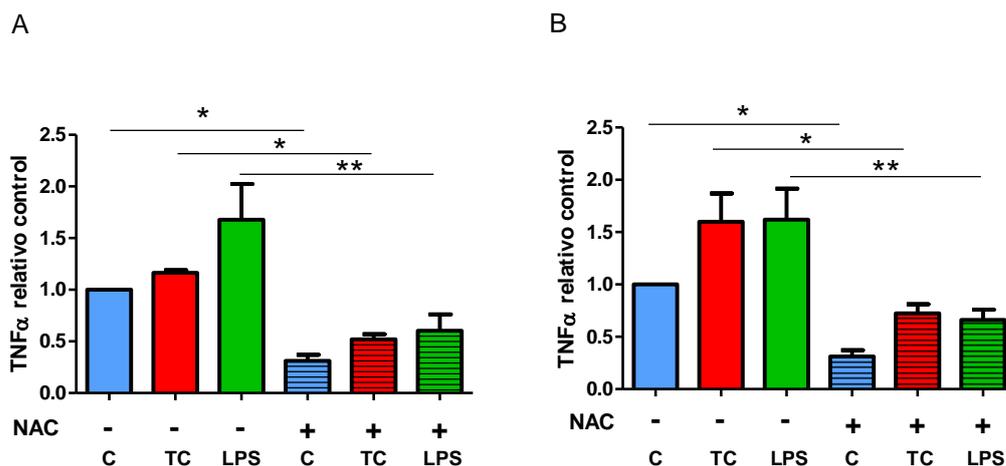


Figura 51. Cuantificación de TNFα en sobrenadantes de cultivo de explantos placentarios con tratamiento con NAC (NAC +) o no (NAC -) y en presencia (TC) o no de *T. cruzi* (C) o LPS. A) 24 h post-infección y B) 72 h post-infección. Los resultados se muestran como la concentración de TNFα en pg/ml.mg tejido relativa al control sin infección (C) ni tratamiento (NAC -). *p<0,05, **p<0,01 (ANOVA de dos vías, post-test de Bonferroni). Las gráficas representan el valor de la media ± EEM de 4 experimentos independientes.

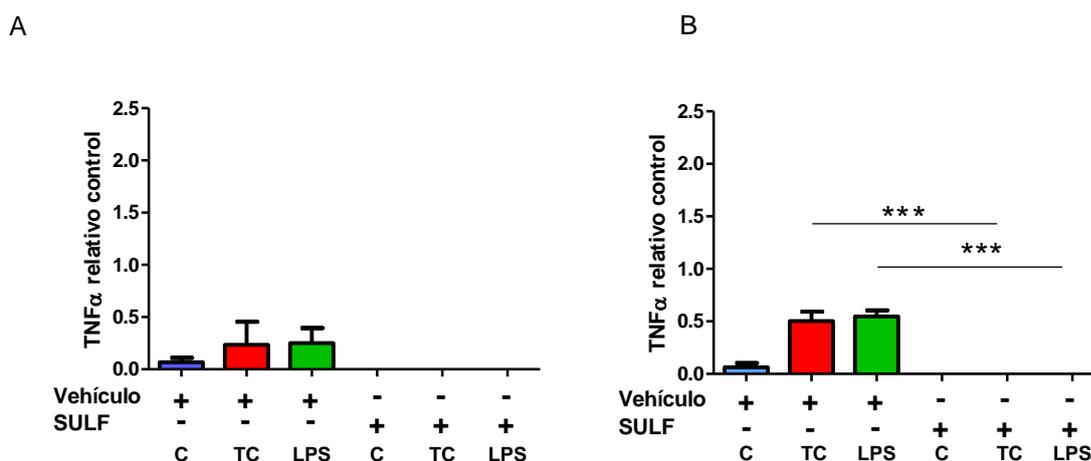


Figura 52. Cuantificación de TNFα en sobrenadantes de cultivo de explantos placentarios con tratamiento con SULF (SULF +) o no (SULF -), con vehículo (Vehículo +) o no (Vehículo -) y en presencia (TC) o no de *T. cruzi* (C) o LPS. A) 24 h post-infección y B) 72 h post-infección. Los resultados se muestran como la concentración de TNFα en pg/ml.mg tejido relativa al control sin infección (C) ni tratamiento (Vehículo/SULF -). ***p<0,001 (ANOVA de dos vías, post-test de Bonferroni). Las gráficas representan el valor de la media ± EEM de 4 experimentos independientes.

Los resultados encontrados en relación a la secreción de IL-1β no muestran diferencias significativas en los explantos tratados con NAC a 24 h post-infección (Fig. 53 A). Sin embargo, en los explantos tratados con NAC a 72 h post-infección se observó una disminución significativa en los explantos infectados y en los tratados con LPS (p<0,05) (Fig. 53 B). El tratamiento con SULF produjo una disminución

significativamente mayor en la secreción de IL-1 β que la observada con NAC (Fig. 54). De manera similar, Dharane y col. observaron que el tratamiento con SULF en explantos placentarios (en ausencia de infección parasitaria) genera mayor disminución en la secreción de TNF α que en IL-1 β (Dharane y col., 2010).

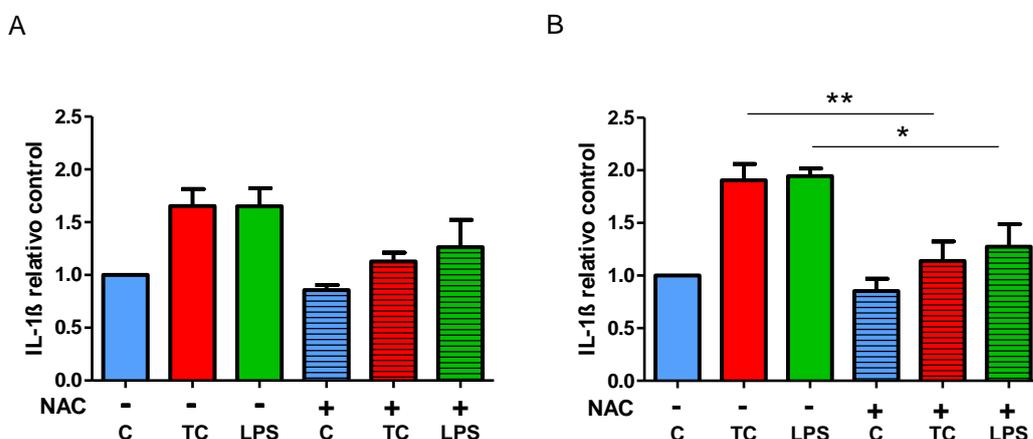


Figura 53. Cuantificación de IL-1 β en sobrenadantes de cultivo de explantos placentarios con tratamiento con NAC (NAC +) o no (NAC -) y en presencia (TC) o no de *T. cruzi* (C) o LPS. A) 24 h post-infección y B) 72 h post-infección. Los resultados se muestran como la concentración de IL-1 β en pg/ml.mg tejido relativa al control sin infección (C) ni tratamiento (NAC -). * p <0,05, ** p <0,01 (ANOVA de dos vías, post-test de Bonferroni). Las gráficas representan el valor de la media \pm EEM de 4 experimentos independientes.

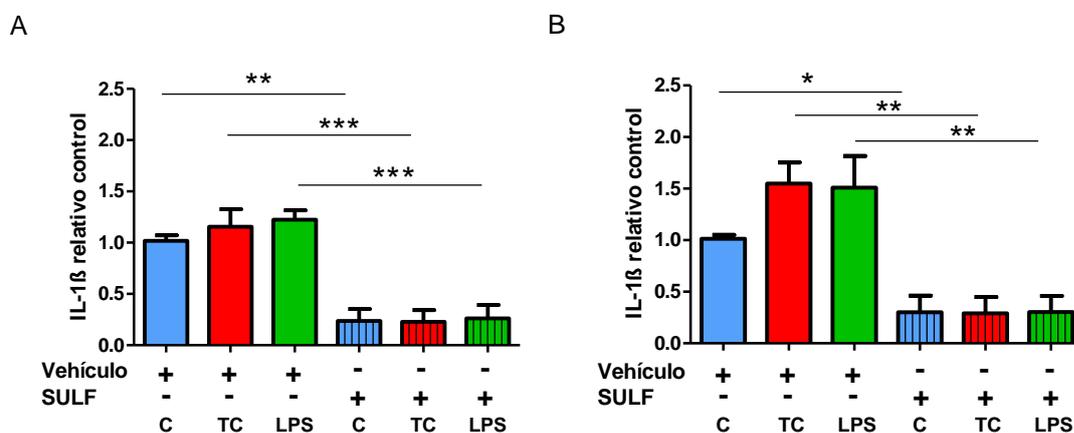


Figura 54. Cuantificación de IL-1 β en sobrenadantes de cultivo de explantos placentarios con tratamiento con SULF (SULF +) o no (SULF -), con vehículo (Vehículo +) o no (Vehículo -) y en presencia (TC) o no de *T. cruzi* (C) o LPS. A) 24 h post-infección y B) 72 h post-infección. Los resultados se muestran como la concentración de IL-1 β en pg/ml.mg tejido relativa al control sin infección (C) ni tratamiento (Vehículo/SULF -). * p <0,05, ** p <0,01, *** p <0,001 (ANOVA de dos vías, post-test de Bonferroni). Las gráficas representan el valor de la media \pm EEM de 4 experimentos independientes.

Citoquinas anti-inflamatorias. Se ha reportado que NF- κ B no participa en la activación de la expresión de IL-10 e IL-4, pero al regular su vía y disminuir la secreción de citoquinas pro-inflamatorias, podría generarse un efecto compensatorio de IL-10 como se observó en experimentos anteriores (Fig. 25). Con el propósito de evaluar si el bloqueo del NF- κ B en tejido placentario infectado por *T. cruzi* afecta la producción de estas citoquinas, se cuantificó la concentración de IL-10 e IL-4 en sobrenadantes de cultivo de explantos placentarios con o sin tratamiento con SULF o NAC y en presencia o no de *T. cruzi* o LPS.

Los resultados encontrados en relación a la secreción de IL-10 indican que el tratamiento con NAC a 24 h de cultivo produjo una disminución significativa en los cultivos tratados con LPS (Fig. 55 A) y en los cultivos tratados con NAC a 72 h se observó una disminución significativa con la infección parasitaria y el tratamiento con LPS (Fig. 55 B). En los cultivos tratados con SULF (Fig. 56) a 24 y 72 h de cultivo disminuyó significativamente la secreción de IL-10 con la infección parasitaria y el tratamiento con LPS.

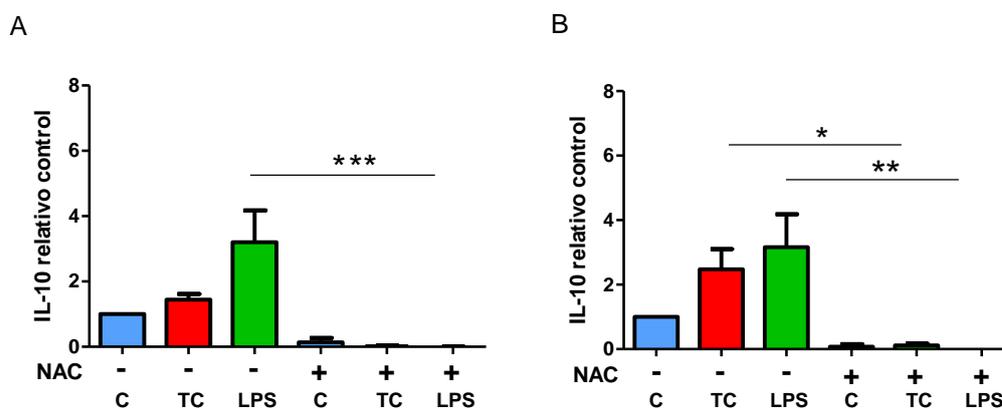


Figura 55. Cuantificación de IL-10 en sobrenadante de cultivo de explantos placentarios con tratamiento con NAC (NAC +) o sin tratamiento con NAC (NAC -) y en presencia (TC) o no de *T. cruzi* (C) o LPS. A) 24 h post-infección y B) 72 h post-infección. Los resultados se muestran como la concentración de IL-10 en pg/ml.mg tejido relativa al control sin infección (C) ni tratamiento (NAC -). * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ (ANOVA de dos vías, post-test de Bonferroni). Las gráficas representan el valor de la media \pm EEM de 4 experimentos independientes.

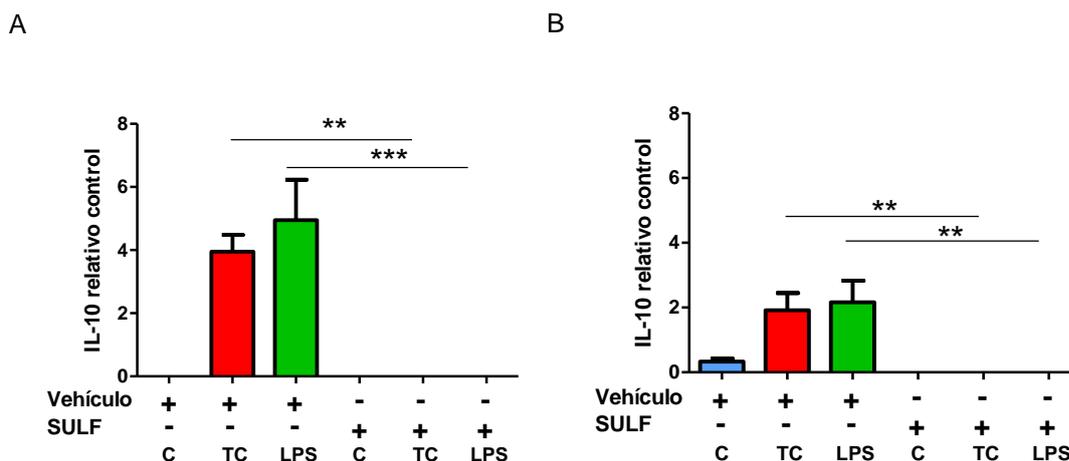


Figura 56. Cuantificación de IL-10 en sobrenadantes de cultivo de explantos placentarios con tratamiento con SULF (SULF +) o no (SULF -), con vehículo (Vehículo +) o no (Vehículo -) y en presencia (TC) o no de *T. cruzi* (C) o LPS. A) 24 h post-infección y B) 72 h post-infección. Los resultados se muestran como la concentración de IL-10 en pg/ml.mg tejido relativa al control sin infección (C) ni tratamiento (Vehículo/SULF -). ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ (ANOVA de dos vías, post-test de Bonferroni). Las gráficas representan el valor de la media \pm EEM de 4 experimentos independientes.

Los resultados hallados en relación a la secreción de IL-4 no mostraron diferencias con el tratamiento con NAC (Fig. 57) o con SULF (Fig. 58) a 24 y 72 h de cultivo, con y sin parásito, o con LPS. Estos resultados coinciden con lo observado en los objetivos anteriores con respecto a esta citoquina.

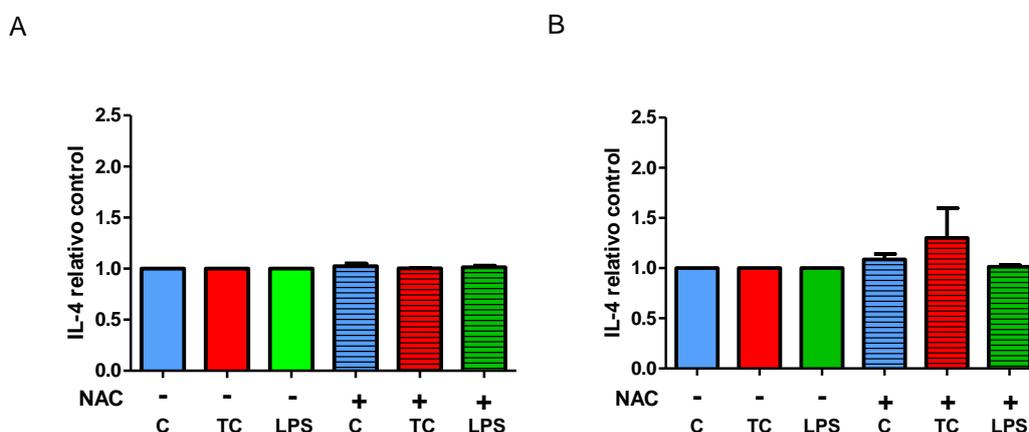
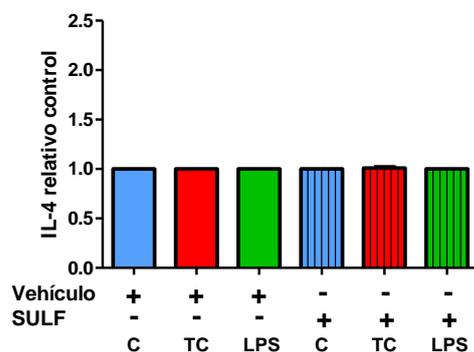


Figura 57. Cuantificación de IL-4 en sobrenadantes de cultivo de explantos placentarios con tratamiento con NAC (NAC +) o no (NAC -) y en presencia (TC) o no de *T. cruzi* (C) o LPS. A) 24 h post-infección y B) 72 h post-infección. Los resultados se muestran como la concentración de IL-4 en pg/ml.mg tejido relativa al control sin infección (C) ni tratamiento (NAC -). Las gráficas representan el valor de la media \pm EEM de 4 experimentos independientes.

A



B

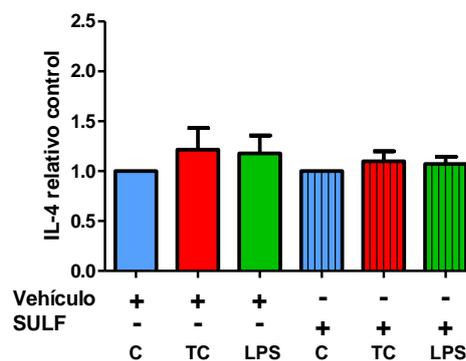


Figura 58. Cuantificación de IL-4 en sobrenadantes de cultivo de explantos placentarios con tratamiento con SULF (SULF +) o no (SULF -), con vehículo (Vehículo +) o no (Vehículo -) y en presencia (TC) o no de *T. cruzi* (C) o LPS. A) 24 h post-infección y B) 72 h post-infección. Los resultados se muestran como la concentración de IL-4 en pg/ml.mg tejido relativa al control sin infección (C) ni tratamiento (Vehículo/SULF -). Las gráficas representan el valor de la media \pm EEM de 4 experimentos independientes.

DISCUSIÓN



La enfermedad de Chagas afecta alrededor de 6 a 7 millones de personas (WHO 2015) y aproximadamente el 25% de la población de América Latina se encuentra en riesgo de contraerla (WHO, 2015). Es causada por el parásito intracelular obligado *Trypanosoma cruzi*, que se transmite al ser humano a través de triatóminos (insectos vectores), transfusión de sangre, trasplante de órganos, ingesta de alimentos con parásito, accidente de laboratorio y transmisión congénita (Coura y col., 2007; Fretes y Kemmerling, 2012; Carlier y col., 2015; WHO, 2015). El éxito en el control de la transmisión vectorial y el control de los bancos de sangre ha disminuido la incidencia de esta enfermedad en humanos, cobrando gran importancia la transmisión vertical y extendiéndose mundialmente a regiones no endémicas debido a las migraciones (Carlier y col, 2011).

La transmisión congénita se produce cuando el parásito alcanza al feto a través de la barrera placentaria (Bittencourt, 1976; Carlier, 2005). En América Latina, existen 2 millones de mujeres infectadas en edad reproductiva, de las cuales entre el 1% y el 12% pueden transmitir la infección por vía transplacentaria, generando alrededor de 15.000 niños cada año con Chagas congénito en regiones urbanas y rurales, endémicas y no endémicas (Carlier y col, 2011). En Argentina, la seroprevalencia entre mujeres embarazadas es de alrededor el 6% en regiones endémicas y el riesgo de transmisión congénita del 6% (Carlier y col, 2015).

En el presente trabajo de tesis, se estudió cómo moléculas mediadoras y efectoras involucradas en la respuesta inmune se modificaron en explantos placentarios y en la línea celular BeWo durante los diferentes estadios de la infección parasitaria con *T. cruzi*. También se consideró de interés determinar cómo varía la infección cuando se favorece o se bloquea el ambiente pro-inflamatorio.

Dentro de los componentes de la barrera placentaria, el trofoblasto es quien primero interacciona con el parásito, por ello se analizó la infección por *T. cruzi* en el modelo de células BeWo y BeWo ST. Tanto ROS como NO son metabolitos deletéreos de la respuesta pro-inflamatoria y participan en muchas funciones biológicas, desde la neurotransmisión a la actividad microbicida (Gutiérrez, 2011; Xu y col., 2012; Liu y col., 2019). Después de la activación en presencia *T. cruzi*, las células del hospedador producen grandes cantidades de NO, con actividad deletérea sobre los parásitos (Díaz-Lujan y col., 2012; Koo y col., 2018; Triquell y col., 2018; Herreros-Cabello y col., 2019). En nuestros ensayos se detectó mayor secreción de ROS al medio de cultivo en las células BeWo ST infectadas en relación a las células BeWo ST no infectadas y BeWo, tanto en etapas tempranas como tardías de la invasión.

Además, a 4 y 24 h hay mayor producción de NO en BeWo ST en relación a BeWo sin diferencias entre infectadas y no infectadas. En concordancia con este resultado se reportó un aumento en la expresión de NOSe en BeWo tratadas con FSK respecto a las células no tratadas (Kiss y col., 1998). Por otro lado, se demostró en los ensayos de sobrevivencia del parásito que los sobrenadantes de cultivo de las células BeWo ST poseen un efecto deletéreo sobre *T. cruzi*, posiblemente debido a este aumento de NO y ROS, como se reportó en otros tipos celulares como fibroblastos y cardiomiocitos (Guimarães-Pinto y col., 2018, Paiva y col., 2018). Estos resultados muestran la capacidad que poseen las células BeWo ST de producir metabolitos deletéreos para el parásito sin necesidad de que sean infectadas por el mismo.

El *T. cruzi* para alcanzar la sangre fetal e infectar al feto, no solo debe atravesar el trofoblasto, sino que necesita traspasar toda la barrera placentaria. Por ello resultó de interés evaluar, en el modelo de explanto placentario su susceptibilidad a la infección por *T. cruzi*. Se reportó que MIF es un regulador de la inmunidad innata y adaptativa que promueve las funciones pro-inflamatorias de las células inmunes (Calandra y Roger, 2003). En infecciones por *T. cruzi* de macrófagos y modelos animales, MIF ha sido considerado un factor crítico para controlar la infección mediante la regulación de la secreción de NO, ROS y TNF α (Reyes y col., 2006; Cutrullis y col., 2009; 2013; 2017). En el presente trabajo de tesis, se analizó la secreción de MIF en sobrenadantes de cultivo placentario infectado y su localización en las células que conforman el tejido placentario. En presencia del parásito se detectó una mayor expresión de MIF respecto al tejido control, principalmente en células del STB y en el estroma a 24 h post-infección. Un aumento similar se observó en los sobrenadantes de cultivo provenientes de los explantos infectados. En concordancia con estos resultados, infecciones de células BeWo y explantos placentarios con *P. falciparum* y *T. gondii* produjeron un aumento en la producción de MIF (Chaisavaneeyakorn y col., 2002; Bevilacqua y col., 2014). Cabe descartar que en infecciones por *T. gondii* de explantos placentarios de tercer trimestre el aumento de MIF se reportó en tejido y no en sobrenadante de cultivo y que la expresión se localizó en las células del STB (de Oliveira Gomes y col., 2011). Resultados obtenidos en esta tesis y en trabajos sobre otras infecciones parasitarias muestran la participación de MIF en la regulación de la infección en la interfase materno-fetal.

Las MMPs son responsables del daño tisular observado durante la invasión de diferentes parásitos y dentro de ellas, la MMP-9 es una gelatinasa presente en el tejido placentario con capacidad de degradar la matriz extracelular (Castillo y col., 2012).

Castillo y col., reportó un aumento en la actividad gelatinasa de MMP-9 y MMP-2, acompañado alteraciones en la matriz extracelular de las vellosidades coriónicas de los explantos placentarios infectados con *T. cruzi* de la cepa Y durante 24 h; a su vez, demostró como el tratamiento de los explantos infectados con un inhibidor de MMPs revierte el daño tisular y disminuye la infección parasitaria en relación a los explantos no tratados (Castillo y col., 2012). En concordancia con este reporte, en nuestros ensayos, el análisis de la actividad de MMP-9 en homogenato de explantos placentarios infectados fue mayor en relación a los no infectados, durante los procesos de invasión tanto en etapas tempranas (4 h) como tardías (24 h). Otros autores describen aumentos similares en la activación de MMP-9 en infecciones de macrófagos por *T. cruzi* con respuesta pro-inflamatoria aumentada (Teixeira de Pinho y col., 2014). Las MMPs son cruciales para una respuesta inflamatoria frente a diferentes patógenos (*Plasmodium*, *Trypanosoma*, *Leishmania* y *Toxoplasma*), la actividad incontrolada de estas proteasas después de terminada la infección puede derivar en daño tisular severo, diseminación microbiana e inmunopatología en el hospedero (Geurts y col., 2012). Diferentes autores reportan que en la enfermedad de Chagas, la desregulación de MMPs en tejido cardíaco podría tener un rol importante en el desarrollo de miocarditis aguda (Gutierrez y col., 2008; Hovsepian y col., 2011). En la infección por *T. cruzi* del tejido placentario, MMP-2 y MMP-9 pueden por un lado participar del mecanismo antiparasitario y por el otro, facilitar alteraciones en la matriz extracelular de las vellosidades coriónicas durante la infección generando cambios en la barrera placentaria que podrían favorecer la invasión del parásito.

IL-6 es una citoquina pro-inflamatoria inmunomoduladora, involucrada en la regulación de la respuesta inmune pro-inflamatoria frente a *T. cruzi* en macrófagos junto con MMP-9 (Teixeira de Pinho y col., 2014). Castillo y col., reportó un aumento de IL-6 con otra cepa de parásito en infecciones de explantos placentarios durante 2 h (Castillo y col., 2017). Así mismo, en infecciones en células BeWo con *P. falciparum* y *T. gondii* se demostró un aumento en la secreción de esta citoquina (Vásquez y col., 2013; Barbosa y col., 2015). En este trabajo se observó que la expresión de esta citoquina en las células BeWo, BeWo ST y en explantos placentarios durante la interacción del *T. cruzi* con las célula/tejido, así como en la secreción en los sobrenadantes de cultivo, no demostró cambios significativos en relación a sus respectivos controles tanto a 4 h como a 24 h de cultivo. Resultados similares se reportaron en infecciones de explantos placentarios por *T. gondii* durante 2 h (Castillo y col., 2017). A su vez, análisis transcriptómico de citoquinas en infecciones de explantos placentarios por *T. cruzi* con 10^6 parásito/mL a 2 y 24 h demostró que en

infecciones no hubo cambios en la expresión de IL-6 (Castillo y col., 2018). Estas diferencias en la expresión proteica de IL-6 durante la infección por *T. cruzi* en relación a los resultados de Castillo y col., podrían deberse a la cepa parasitaria utilizada, en nuestros trabajos utilizamos la cepa Tulahuen (DTU VI) y Castillo y col. utilizó la cepa Y (DTU II). Cada DTU posee características de distribución geográfica, presentaciones clínicas, virulencia y susceptibilidad a fármacos particulares (Zingales y col., 2012).

Los resultados obtenidos en los ensayos de invasión realizados durante este trabajo de tesis indican que la barrera placentaria y el trofoblasto responden frente a la presencia del parásito durante una primera interacción. Esta respuesta no fue sólo mediante NO y ROS sino también mediante MMP-9 y MIF. Se observó también, que frente a una primera interacción de la barrera placentaria-*T. cruzi*, hay una respuesta efectora rápida, a 4 y 24 h, mediada por NO y ROS que busca eliminar el parásito, como se mostró en los ensayos de sobrevivencia en sobrenadantes de cultivos de BeWo ST. También se demostró que el STB, que es la estructura trofoblástica que primero interacciona con el parásito, tiene una respuesta inmune innata mayor y tiene mayor resistencia a la infección que CTB.

Se ha descrito que *T. cruzi* comienza con una invasión a las células humanas dentro de los 15 minutos posteriores a la unión, y se encuentra encerrado por una porción de la membrana de la célula hospedera (vacuola parasitófora). A las 4 horas después de la infección, el parásito comienza a transformarse del tripomastigote infeccioso al amastigote intracelular; sale de la vacuola parasitófora alrededor de 8 h post-infección. El parásito completa su transformación a amastigote en 24 horas y comienza a replicarse alcanzando su mayor división a las 72 h post-infección. Alrededor de 96 h post-infección, el parásito comienza la transformación a la forma tripomastigote, que luego escapan de la célula para comenzar un nuevo proceso de infección (Houston-Ludlam y col., 2016; Li y col, 2016). Se ha reportado en fibroblastos de piel que, acompañando los procesos de infección, las células responden expresando en una primera etapa, hasta las 24 h, genes que regulan metabolismos como glicólisis, oxidación y síntesis de ácidos grasos (Li y col, 2016). Posterior a la transformación en amastigote y al aumento de la replicación, hay una mayor expresión de genes relacionados al sistema inmune del huésped como TNF α e IL-8 (Houston-Ludlam y col., 2016). En la bibliografía actual no se encuentran estudios sobre el proceso infeccioso en el tejido placentario que comprendan la invasión y la multiplicación parasitaria.

Los resultados de este trabajo de tesis indican que las células BeWo y BeWo ST tienen la capacidad de infectarse de la misma manera que otras células humanas (Houston-Ludlam y col., 2016; Li y col., 2016), pasando por los procesos de invasión hasta 24 h y posteriormente, un aumento en el número de amastigotes por célula a las 72 h que aumenta de 0,05 a 0,4 en BeWo ST y 0,05 a 1,2 en BeWo. A partir de las 48 h se visualizaron nidos de amastigotes, cada nido contenía entre 20-30 amastigotes, una diferencia significativa con los encontrados en el tejido placentario (3-5 amastigotes por nido) sugiriendo que el tejido placentario tiene mayor resistencia a la infección que las células del trofoblasto aisladas. Inclusive es posible observar un aumento de tripomastigotes móviles en el sobrenadante de cultivo luego de 72 h de células BeWo y BeWo ST. Como se mencionó, el nivel de infección en BeWo y BeWo ST es diferente, las células que forman estructuras similares a STB se infectaron 3 veces menos que las similares a CTB. Una sensibilidad similar a la infección por *T. cruzi* se reportó en trabajos previos de nuestro laboratorio utilizando el modelo de aislados de STB de placentas humanas infectados *in vitro* (Díaz-Lujan y col., 2012). El sincitiotrofoblasto como elemento de la barrera placentaria, forma una barrera epitelial física, sin complejos de unión, que participa en la inmunidad innata y las células BeWo ST se estructuran de manera similar formando una masa citoplasmática multinucleada por fusión de células BeWo, como se demostró con la marcación con desmoplaquina. Como modelo *in vitro* de STB, las células BeWo ST poseen la capacidad de responder frente a un patógeno. Coincidiendo con lo que se observó en los ensayos de sobrevivencia del parásito en medios de cultivo condicionados de estas células BeWo y BeWo ST, se demostró que los parásitos poseen una menor sobrevivencia en los sobrenadantes de BeWo ST, lo que podría sugerir que estas estructuras, con características de STB, responden de manera más activa frente a la infección al participar en la inmunidad innata.

Las células del STB son las primeras que se enfrentan al *T. cruzi* durante la invasión y durante la replicación se liberan tripomastigotes al medio que vuelven a interactuar con las células trofoblásticas, reactivando posiblemente la respuesta inmune innata propia de una barrera epitelial. En cuanto a la respuesta frente al proceso de infección del *T. cruzi* en células BeWo y BeWo ST se encontró que TNF α e IL-1 β se mantienen aumentados significativamente durante la invasión y la multiplicación parasitaria. Esto podría deberse, a que el trofoblasto es la primera barrera inmune y posee TLRs que le permiten responder frente a patógenos presentes en la circulación materna, secretando mediadores inmunológicos (Heerema-McKenney, 2018) como los analizados en esta tesis. Sin embargo, en relación a IFN γ

e IL-10 no se detectó diferencias significativas con el control sin infección en células BeWo y BeWo ST durante los procesos de invasión y replicación del parásito. En concordancia con estos resultados la infección de células BeWo con *T. gondii* o con *P. falciparum* no se demostraron diferencias en la secreción de TNF α , IL-1 β , IFN γ e IL-10 en relación a las no infectadas (Vasquez y col., 2013; Castro y col., 2013; Barbosa y col., 2015). Cabe destacar que, según la bibliografía consultada, los trabajos donde estudian la infección por patógenos en células BeWo solo son en BeWo basales, no se analizó en BeWo ST. Nuestros resultados provienen de ensayos donde se trabajó con un modelo de células BeWo y BeWo ST infectadas con tripomastigotes, donde se encontraron diferencias entre ellas. Al analizar la producción de NO, se encontró un aumento significativo en BeWo ST infectadas, durante los procesos de replicación del parásito, se determinó un aumento del 40% en BeWo ST respecto a BeWo, estos resultados se condicen con lo encontrado en los procesos de invasión en otras células infectadas con *T. cruzi* (Houston-Ludlam y col., 2016). Esta diferencia podría deberse a que siendo el NO un efector de la respuesta inmune, estaría aumentado su secreción para eliminar los nuevos tripomastigotes liberados al medio por las células luego de la replicación parasitaria intracelular.

En este trabajo de tesis se analizaron los procesos de invasión y replicación dentro del tejido placentario. En los ensayos realizados en explantos placentarios a 24 h de cultivo se encontró infección parasitaria, sin diferencia entre las 4 y 24 h. Esto puede ser debido a que durante estos tiempos el parásito ingresó y sufrió transformación de tripomastigote a amastigote, pero no llegó a replicarse. Se observó una caída significativa en los parásitos móviles en el sobrenadante de cultivo infectado, pudiendo deberse a la invasión del parásito al tejido placentario o al efecto deletéreo de NO y ROS en los sobrenadantes de cultivo. Durante el lapso de 16-24 h de infección, se observó un aumento leve en la carga parasitaria dentro del tejido pero la caída en los parásitos móviles en el sobrenadante fue del 50%, mostrando nuevamente cómo efectores de la respuesta inmune presentes en el medio de cultivo ejercen un efecto deletéreo sobre el parásito en el espacio intervelloso. Este efecto pudo deberse a NO y ROS, ya que en células trofoblásticas (BeWo) se reportó el mismo resultado. En cambio, cuando se analizó la infección a 72 h, período que coincide con la multiplicación parasitaria, se comprobó que la carga parasitaria aumentó significativamente 3 veces respecto a lo observado durante el proceso de invasión (24 h) detectándose nidos de amastigotes mediante tinción de núcleos en los citoplasmas de las células estromales del tejido placentario, la cuantificación demostró que los nidos estaban formados por 3-5 amastigotes. Esta infección es menor a la

encontrada en tejido cardíaco de ratones, donde se describieron nidos de 15-20 amastigotes (Ucan-Euan y col., 2019). Estos resultados sugieren que el tejido placentario frente a la infección por *T. cruzi* desarrolla los mismos procesos que una célula de mamífero (Houston-Ludlam y col., 2016), pero con una carga infecciosa menor.

En cuanto a los mediadores que participan en el sistema inmune analizados en los cultivos de explantos placentarios, otros autores, reportaron que *T. cruzi* induce un aumento significativo de 5 a 30 veces en los niveles de IL-1 β , TNF α e IL-10 durante las primeras 2 h de infección en relación al control (Castillo y col., 2017; 2018). Estos resultados difieren con lo encontrado en este trabajo de tesis, ya que a 2 h post-infección la expresión de citoquinas no mostró cambios respecto a los explantos sin infectar, pero si se detectaron incrementos de estas citoquinas a partir de las 24 h post-infección. Esta diferencia se podría explicar debido a que se utilizaron diferentes kit de ELISA para detección de citoquinas, y diferentes cepas de *T. cruzi* con las que se enfrentaron los explantos placentarios. En nuestro caso se utilizó la cepa Tulahuen (DTU VI) y Castillo y col. utilizó la cepa Y (DTU II). Como se dijo anteriormente, cada DTU posee características particulares (Zingales y col., 2012). En nuestros ensayos se analizó tanto la invasión como la replicación del parásito en el tejido placentario, y se observó que TNF α e IL-1 β se secretaron después de 16-24 h post-infección con un aumento significativo de 2-3 veces sobre el control sin infección, a las 48 y 72 h post-infección. Al comparar estos resultados con los obtenidos en células BeWo, se encontró que las células derivadas de trofoblasto mantienen una respuesta constante con el tiempo de la infección. En cambio al analizar la respuesta de los explantos como modelo de barrera completa, se observa mayor respuesta durante los procesos replicativos del parásito, pudiendo deberse a que los nidos de amastigotes se ubican mayoritariamente en células del estroma que están presentes en el modelo de explanto placentario y no en las células BeWo. La liberación de IFN γ fue menor en relación con las otras citoquinas pro-inflamatorias, aunque se observó un aumento significativo de 1,5 veces sobre el control sin infección, después de 48 h post-infección. En relación a citoquinas anti-inflamatorias, IL-10 aumentó su secreción en presencia del parásito de la misma manera que las citoquinas pro-inflamatorias, pero la secreción fue gradual. En procesos inflamatorios se ha atribuido el incremento de IL-10 como modulador de la respuesta pro-inflamatoria, para evitar el daño tisular (Hovsepian y col., 2013). Por último, no se detectaron cambios en los niveles de IL-4 en explantos placentarios frente al proceso de infección por *T. cruzi* en ninguna de las condiciones ensayadas.

Hasta el momento, no hay trabajos que reporten cuales son las estructuras placentarias que responden a la infección por *T. cruzi*. En este estudio de tesis se determinó que dentro de los componentes de la barrera placentaria, las estructuras que están involucradas en la respuesta frente al parásito son el STB y las células estromales. Ciertamente el incremento de TNF α , IFN γ , IL-1 β e IL-10 generado por la infección parasitaria se localizó principalmente en las células del STB y células estromales. El aumento similar de estas citoquinas detectado en el sobrenadante de cultivo de los explantos placentarios sugiere que durante la gestación estas moléculas se liberarían al espacio intervelloso.

En resumen se demostró que las células BeWo y BeWo ST (como modelo de estructuras trofoblásticas) es la primera que entra en contacto con el parásito que se encuentra en la sangre materna, responde mediante la expresión de efectores y mediadores inmunológicos de un modo constante durante los procesos de invasión y replicación del *T. cruzi*. En cambio, los explantos (como modelo de barrera placentaria completa), muestran un aumento del número de amastigotes en el estroma placentario con el comienzo de la replicación y podrían ser estas células estromales las que generan la respuesta pro-inflamatoria significativa que se observó a 48-72 h post-infección, con una compensación anti-inflamatoria mediada por IL-10, posiblemente para evitar el daño tisular, como el que pudieran causar algunos efectores tales como MMP-9, NO y ROS.

La respuesta inmune materna posee un rol muy importante en la transmisión congénita del *T. cruzi* (Volta y col., 2016; Bustos y col., 2019). Se ha observado que una respuesta innata disminuida con una liberación de IFN γ y TNF α bajos, se asocia a transmisión congénita. También se ha reportado aumento de IL-1 β , IFN γ y TNF α en madres infectadas con *T. cruzi* no trasmisoras (García y col., 2008; Cuna y col., 2009; Mayer y col., 2010; Fretes y Kemmerling, 2012; Volta y col., 2016; Bustos y col., 2019). Además se demostró que en la infección por *T. cruzi*, macrófagos, NK, linfocitos T y B producen citoquinas pro-inflamatorias como el IFN γ , TNF α , IL-12 y NO (Junqueira y col., 2010; Gutierrez, 2011). Resultados de esta tesis mostraron aumentos de IL-1 β , IFN γ y TNF α , en el tejido placentario infectado.

Teniendo en cuenta resultados propios y lo descrito en la bibliografía en estudios *in vivo* en circulación materna de madres infectadas no trasmisoras sobre la importancia de un ambiente pro-inflamatorio, se analizó lo que sucedía con la invasión y replicación del parásito en un medio pro-inflamatorio. Considerando lo reportado se esperaba que un perfil pro-inflamatorio disminuyera la carga parasitaria presente en

los explantos, sin embargo el tratamiento de los explantos placentarios con la citoquina pro-inflamatoria IFN γ no mostró diferencias significativas en la carga parasitaria de los cultivos tratados durante la invasión y replicación en relación a los no tratados. Esto podría deberse a que los ensayos se realizaron utilizando placentas del último trimestre de gestación, donde hay una predominancia a un perfil TH1 (Mor y col., 2017), si bien al ser de cesáreas no ha comenzado el trabajo de parto donde la respuesta pro-inflamatoria está aumentada. Cabe aclarar que debido a la legislación Argentina es difícil conseguir placentas humanas de segundo trimestre de gestación para realizar los experimentos. Resultados coincidentes fueron reportados por otros autores empleando células BeWo tratadas con IFN γ y posteriormente infectadas con *T. gondii* durante 24 h (Barbosa y col., 2015). Sin embargo, la infección de células HeLa previamente tratadas con IFN γ fue menor respecto a las no tratadas, siendo una posible explicación el tipo celular (Oliveira y col., 2006). El tratamiento con IFN γ de células BeWo y HeLa previo a la infección por *N. caninum* tampoco mostró diferencias entre las tratadas y no tratadas (Carvalho y col., 2010). En nuestro modelo de explantos placentarios, el tratamiento con IFN γ no alteró la carga parasitaria.

Se ha descrito que la infección de macrófagos por *T. cruzi* requiere de IFN γ a los fines de activar la respuesta inmune (Gutiérrez, 2011). Frente a la infección por *T. cruzi*, los macrófagos producen citoquinas (principalmente TNF α , IL-12) y efectores inflamatorios como NO. Se describió que junto a otras citoquinas como IL-10 y TGF β regulan la activación de los macrófagos generando una respuesta inflamatoria local que controla la proliferación o el daño sobre los parásitos (Junqueira y col., 2010; Gutiérrez, 2011; Dutra y col., 2014). En este trabajo de tesis, se demostró que el tratamiento con IFN γ induce un aumento significativo de TNF α en los cultivos de 72 h de los explantos placentarios con y sin infección parasitaria. En relación a IL-10, la presencia del parásito indujo un aumento de la citoquina a las 72 h post-infección pero no se encontró diferencias con el tratamiento. Se ha reportado que las células BeWo tratadas con la misma concentración de IFN γ e infectadas con *T. gondii* durante 24 h no modificaron la secreción de TNF α ni de IL-10 (Barbosa y col., 2015), sugiriendo que en el efecto observado en los explantos placentarios participarían otros componentes de la barrera placentaria. Por otro lado, en nuestros ensayos, el IFN γ disminuyó la secreción de IL-1 β en los explantos infectados en relación a los no tratados, otros autores reportaron que macrófagos y células dendríticas estimuladas con IFN γ bloquean la producción de IL-1 β (Eigenbrod y col., 2013). En relación a la producción de IL-4, el tratamiento con IFN γ no generó cambios en la secreción de la misma. En las condiciones ensayadas, el ambiente pro-inflamatorio generado por el agregado de

IFN γ no llega a ejercer un efecto limitante del crecimiento del parásito suficiente para disminuir la carga parasitaria en forma significativa en el tejido placentario.

Esos resultados indican que el tratamiento con IFN γ favorece una respuesta pro-inflamatoria, pero cuando el explanto se infecta y *T. cruzi* entra en un proceso de replicación, la respuesta tiende a balancearse hacia un perfil anti-inflamatorio.

Se ha reportado en macrófagos que la enzima NOSi cataliza la bio-transformación de L-arginina produciendo NO y citrulina. Esta enzima es inducida por citoquinas como TNF α , IFN γ e IL-12 (Stempin y col., 2007). Además se demostró que, los macrófagos activados alternativamente no producen NO a partir de L-arginina, en virtud de la inducción de la enzima arginasa, que destruye L-arginina comprometiendo la capacidad de los macrófagos para eliminar patógenos intracelulares. En este tipo de macrófagos la activación de la enzima arginasa genera urea y ornitina, y finalmente poliaminas y prolina, metabolitos facilitadores de la multiplicación de patógenos. Este proceso está acompañado de secreción de IL-10 y TGF β . Estos macrófagos, han sido identificados en tejidos como pulmón y placenta (Kropf y col., 2007). Este fenotipo de activación alternativa de macrófagos, puede ser aprovechado por varios microorganismos y por células tumorales para persistir y proliferar en el hospedero (Liu y col., 2018; Orecchioni y col., 2019). Particularmente se reportó que macrófagos activados alternativamente por Cz y luego infectados con *T. cruzi* incrementan el número de parásitos (Stempin y col., 2002). En nuestro modelo experimental, el tejido placentario tratado con IFN γ responde de una manera dicotómica con el transcurso de la infección. En la etapa de invasión hay un aumento de citoquinas pro-inflamatorias y en las etapas de replicación se balancea a un equilibrio anti-inflamatorio, pudiendo favorecer la multiplicación del parásito en el estroma de los explantos. Otros autores han observado en macrófagos que un aumento de IL-10 y TGF β , inducido por Cz, favorece un desplazamiento del metabolismo de L-arginina, disminuyendo NO e induciendo la producción de ornitina y urea y de esta manera favoreciendo la replicación parasitaria (Stempin y col., 2002). Nuestros resultados en un modelo de tejido placentario tratado con IFN γ e infectado con tripomastigotes, muestran un aumento de IL-10 durante el proceso de replicación parasitaria. Diferentes autores describieron que un balance entre citoquinas anti-inflamatorias (IL-10 y TGF- β) y pro-inflamatorias (TNF α y IL-12) al comienzo de la infección con *T. cruzi*, sería crucial para permitir la instalación del parásito. En este trabajo de tesis se demostró que en los explantos placentarios tratado con IFN γ se produce un mecanismo similar de evasión de la respuesta pro-inflamatoria por el parásito lo cual favorece su supervivencia. Se

demonstró que a las 72 h post-infección hubo una disminución significativa del 25% de NO cuando los explantos son tratados con IFN γ e infectados, en relación al control. A su vez, se reportó un aumento significativo de 3 veces sobre el control en la liberación de urea cuando los explantos son tratados con IFN γ e infectados. Estos resultados sugieren que la disminución de nitritos se debe a un mecanismo mediado por arginasas, disminuyendo la concentración de NO, con un desplazamiento del metabolismo de L-arginina hacia la producción de urea y metabolitos favorecedores de la multiplicación parasitaria. Resultados que podrían explicar la carga parasitaria medida en los explantos placentarios tratados con IFN γ e infectados con *T. cruzi*.

Como se mencionó, una respuesta innata disminuida en madres gestantes infectadas con una liberación de IFN γ y TNF α bajos, se asocia a la transmisión congénita de *T. cruzi* (Carlier y Truyens, 2015; Bustos y col., 2019). Diferentes microorganismos poseen pequeñas moléculas como PAMPs que pueden unirse a sus receptores TLRs y activar una serie de cascadas intracelulares que terminan en la translocación de JNK y NF- κ B al núcleo, lo que induce la expresión de TNF α , IL-1 β , IL-12, NO y moléculas co-estimuladoras. Además, PAMPS, NLR, NOD1 y NOD2 pueden activar NF- κ B después de la escisión de IL-1 β , IL-33 e IL-18 en respuesta a los amastigotes de *T. cruzi* presentes en el citoplasma (Gutiérrez, 2011; Hovsepian y col., 2013). A su vez, en explantos placentarios se observó que infecciones con *T. cruzi* de la cepa Y durante 2 h activa los TLR y aumenta la expresión de IL-1 β , TNF α , IL-6, IL-8 e IL-10 (Castillo y col., 2017). También se demostró en explantos placentarios utilizando un modelo de infección de 10 min con 10⁵ tripomastigotes de la cepa Y, que tanto la vía clásica como la alternativa del NF- κ B se activan en presencia del parásito (Liempi y col., 2019). Resultados de esta tesis mostraron aumentos de IL-1 β , IFN γ y TNF α , en el tejido placentario infectado durante el proceso de multiplicación parasitaria. Teniendo en cuenta estos antecedentes y los propios resultados de la tesis, se analizó en los explantos placentarios el efecto de la disminución del perfil pro-inflamatorio, mediante la regulación de la vía del NF- κ B con SULF y NAC, previo y durante la infección con *T. cruzi*. Sulfasalazina, inhibidor de la vía clásica del NF- κ B, tiene la capacidad de prevenir la fosforilación I κ B y, por lo tanto, su degradación y translocación de NF- κ B al núcleo (Dharane y col., 2010). Por su parte, NAC actúa eliminando intermediarios reactivos de oxígeno y bloquea la vía clásica de activación de NF- κ B (Lappas y col., 2004). Se ha demostrado, que en el tejido placentario SULF y NAC mitigan la actividad de NF- κ B resultando en la disminución de moléculas pertenecientes a la cascada de activación de este factor de transcripción (Lappas y col., 2002; 2004). Las concentraciones usadas de ambos fármacos en nuestros

ensayos se ha reportado que tienen la capacidad de bloquear el NF- κ B (Lappas y col., 2002; 2004). En nuestro modelo experimental de explantos placentarios infectados con *T. cruzi* durante 72 h, se pudo determinar que el bloqueo de NF- κ B disminuye la producción de citoquinas pro-inflamatorias como TNF α e IL-1 β tanto con presencia o no del *T. cruzi* como con LPS, y que SULF ejerce un efecto más inhibitorio que NAC. Los resultados obtenidos en los cultivos controles (sin infección), concuerdan con los obtenidos por Dharane y col. quienes reportan una disminución de citoquinas pro-inflamatorias (Dharane y col., 2010). En cuanto a IL-10, se observó un comportamiento similar a TNF α e IL-1 β . Si bien la producción de IL-10 en la infección por *T. cruzi* no está determinada por la vía del NF- κ B (Silva y col., 2010; Gutierrez, 2011). La disminución de TNF α e IL-1 β pudo favorecer la replicación del parásito, ya que se encontró un aumento entre 1,86 y 1,60 veces en la carga parasitaria en los explantos tratados con SULF o NAC, respectivamente, en relación a los controles sin tratamiento. Los resultados de este ensayo, coinciden con lo encontrado por Liempi y col., en explantos placentarios al inhibir la vía clásica (mediante el uso de BAY) y la alternativa (mediante el uso de isoquinoline-1, 3 (2H, 4H) – dione) del NF- κ B durante 2 h previo a la infección con *T. cruzi* de la cepa Y, la carga parasitaria aumentaba entre 1,50-1,75 veces en relación al control sin tratamiento (Liempi y col., 2019). Si bien la infección placentaria por *T. cruzi* está regulada por una variedad de factores, se puede concluir que moléculas activadas por la vía del NF- κ B participan en este mecanismo.

Los datos obtenidos en esta tesis indican que los distintos componentes de la barrera placentaria y las moléculas activadas por la vía del NF- κ B, participan en la regulación de la infección por *T. cruzi*. Los resultados indican que las células del CTB y STB son las que responden tempranamente durante la invasión y mantienen la respuesta durante el proceso de replicación del parásito, mediante la producción de citoquinas pro-inflamatorias como TNF α e IL-1 β . Se observó una menor infección de las células similares a STB (BeWo ST) pudiéndose deber al aumento de secreción de NO y ROS que ejercen un efecto deletéreo sobre el parásito. Por otro lado, se estableció que son las células estromales ubicadas en zonas más internas de la barrera placentaria, quienes alojan los nidos de amastigotes durante los procesos de replicación del parásito. Durante este proceso se demostró que la producción de TNF α , IFN γ e IL-1 β en explantos placentarios, está aumentada, sugiriendo que las células estromales son quienes responden activamente durante el proceso replicativo del parásito. Tanto los explantos placentarios como las células trofoblásticas en cultivo, generan una fuerte respuesta pro-inflamatoria a los fines de eliminar el *T. cruzi* pero esto podría traer aparejado injuria sobre el tejido placentario, de acuerdo a

nuestros datos con aumento en la secreción de NO y ROS, y la activación de MMP-9. Es por ello, que posiblemente el aumento de IL-10 observado intenta compensar este proceso dañino, ya que, esta citoquina posee funciones proliferativas y anti-apoptóticas. Se demostró que IL-4 e IL-6 no participan en la respuesta frente a la infección del tejido placentario por *T. cruzi* siendo esta última altamente expresada por el tejido en condiciones no infectivas. El análisis de los mediadores inmunológicos durante la invasión y replicación del parásito en el tejido placentario tratado con IFN γ demostró principalmente secreción de TNF α . Se observó un aumento de IL-10 como posible modulador de la respuesta pro-inflamatoria generada por TNF α . Se hipotetizó un mecanismo de evasión por parte del parásito para evitar el efecto deletéreo generado por liberación de NO. Sin embargo, se detectó una disminución de NO con aumento de urea, sugiriendo la existencia de un mecanismo de respuesta mediado por arginasas. Por el contrario, la infección de los explantos placentarios por *T. cruzi* en un medio con disminución de las citoquinas pro-inflamatorias TNF α e IL-1 β , originado por la reducción de la actividad del factor NF- κ B, mostró un consecuente aumento en la carga parasitaria durante el proceso de replicación del parásito. Esto sugiere que las citoquinas pro-inflamatorias reguladas por la vía clásica del NF- κ B, limitan la infección por *T. cruzi*. Estos datos podrían explicar que el perfil inmunológico observado en circulación materna de madres chagásicas transmisoras y no transmisoras, provienen de mecanismos inmunes que se producen en los diferentes componentes de la barrera placentaria durante los procesos de invasión y replicación del *T. cruzi*, aspecto novedoso ya que, el origen de los cambios en las citoquinas en sangre materna es desconocido. Nuestros resultados indican que la placenta aporta citoquinas al pool de citoquinas producidas por las células del sistema inmune en madres gestantes infectadas con *T. cruzi*.

La respuesta inmune de la mujer pasa por diferentes cambios durante todo el proceso de embarazo, y en el caso de una infección por *T. cruzi*, se requiere la generación de una respuesta inmune controlada que reconozca y elimine el parásito, siempre limitando el daño a la placenta y disminuyendo el riesgo de aborto o parto prematuro.

CONCLUSIONES



Los resultados obtenidos en el presente trabajo de tesis de acuerdo a los objetivos planteados permiten concluir que:

Moléculas efectoras de la respuesta inmune durante el proceso de invasión del *T. cruzi* en el tejido placentario y la línea celular BeWo derivada de trofoblasto.

- Durante el proceso de invasión del tejido placentario con las formas infectivas de *T. cruzi*, se observó un aumento en la activación de MMP-9 y en la expresión de reguladores inmunes, como MIF.
- Las células BeWo con características de STB, se infectaron significativamente menos que las células BeWo con características de CTB, con un aumento de la producción de NO y ROS.
- La respuesta observada tanto en tejido placentario como en las células BeWo podría tener un efecto deletéreo en la sobrevivencia del *T. cruzi* y, paralelamente, mediar alteraciones en el tejido placentario; ya que, se ha informado, que MMP-9, ROS y NO pueden causar daños en la matriz extracelular o membrana basal de la barrera placentaria.

Determinación de citoquinas y óxido nítrico durante los procesos de invasión y multiplicación del *T. cruzi* en el tejido placentario y la línea celular BeWo derivada de trofoblasto.

- El tejido placentario y las células BeWo son capaces de infectarse por *T. cruzi*, donde la forma tripomastigote invade a la célula del hospedador, luego dentro de la célula se replica con posterior formación de nidos de amastigotes y finalmente se liberan las formas infectivas al sobrenadante de cultivo.
- Las células BeWo durante la invasión y la replicación del *T. cruzi* responden secretando TNF α e IL-1 β . En el tejido placentario, con el comienzo de la replicación y aumento de amastigotes en el estroma placentario estas células originan una respuesta pro-inflamatoria significativa produciendo NO, TNF α , IFN γ e IL-1 β observada a 48-72 h post-infección acompañada por un aumento de IL-10.
- Dentro de los componentes de la barrera placentaria, las estructuras involucradas en la respuesta inmune al parásito son el sincitiotrofoblasto y algunas células estromales.

Efecto del tratamiento con IFN γ en la infección del tejido placentario por *T. cruzi*.

- El tratamiento de los explantos placentarios con IFN γ produjo un aumento de TNF α durante los procesos multiplicativos del parásito.
- La carga parasitaria no disminuyó en relación a los explantos no tratados con IFN γ . Esto podría deberse a un mecanismo de evasión por parte del parásito por vía de las arginasas, como sugiere el aumento de IL-10 y urea, y la disminución de NO en los sobrenadantes de cultivo tratados e infectados.

Efecto de la regulación de la actividad del factor de transcripción NF- κ B en la infección del tejido placentario por *T. cruzi*.

- El tratamiento de los explantos placentarios con SULF y NAC produjo una disminución significativa de TNF α , IL-1 β e IL-10.
- La inhibición de la secreción de citoquinas pro-inflamatorias sugiere que éstas podrían estar participando en el aumento significativo de la carga parasitaria, en relación a los explantos control.
- Si bien la infección placentaria por *T. cruzi* está regulada por una variedad de factores, podemos concluir que la vía del NF- κ B participa en este mecanismo.

Por todo ello, en este trabajo de tesis se concluye que el *T. cruzi* tiene la capacidad de infectar el tejido placentario, pasando por estadios de invasión y multiplicación, y como consecuencia, se genera una respuesta pro-inflamatoria regulada por la vía del NF- κ B, producida por componentes de la barrera placentaria, principalmente, células del trofoblasto y del estroma. Esta respuesta pro-inflamatoria es deletérea para el parásito pero también puede llegar a ser dañina para el tejido y por eso se genera una respuesta compensatoria para disminuir el daño. Si el proceso infeccioso se da en un ambiente pro-inflamatorio previo, hay un aumento de TNF α pero no alcanza a disminuir la carga parasitaria, pudiendo deberse a un mecanismo de evasión por parte del parásito por vía de las arginasas, para favorecer su supervivencia.

BIBLIOGRAFÍA



- Abad Dar M, Hölscher C (2018). Arginase-1 Is Responsible for IL-13-Mediated Susceptibility to Trypanosoma cruzi Infection. *Front Immunol.* 29; 9: 2790.
- Abrahams, V. M., Straszewski-Chavez, S. L., Guller, S. & Mor, G (2004). First trimester trophoblast cells secrete Fas ligand which induces immune cell apoptosis. *Mol. Hum. Reprod.* 10, 55–63.
- Al-Nasiry S, Spitz B, Hanssens M, Luyten C, Pijnenborg R. (2006). Differential effects of inducers of syncytialization and apoptosis on BeWo and JEG-3 choriocarcinoma cells. *Hum Reprod.* 21(1):193-201.
- Andrade, Z.A. (1982). Pathogenesis of Chagas' disease. New aspects. *Arquivos brasileiros de cardiologia*, 38(4), pp.255–60.
- Azar C, Valentine M, Trausch-Azar J, Druley T, Nelson DM, Schwartz AL (2018). RNA-Seq identifies genes whose proteins are transformative in the differentiation of cytotrophoblast to syncytiotrophoblast, in human primary villous and BeWo trophoblasts. *Sci Rep.* 23; 8(1):5142.
- Barbosa BF, Lopes-Maria JB, Gomes AO, Angeloni MB, Castro AS, Franco PS, Fermino ML, Roque-Barreira MC, Ietta F, Martins-Filho OA, Silva DA, Mineo JR, Ferro EA (2015). IL10, TGF beta1, and IFN gamma modulate intracellular signaling pathways and cytokine production to control Toxoplasma gondii infection in BeWo trophoblast cells. *Biol Reprod.*;92(3):82.
- Bartholomeu DC, Ropert C, Melo MB, Parroche P, Junqueira CF, Teixeira SM, Sirois C, Kasperkovitz P, Knetter CF, Lien E, Latz E, Golenbock DT, Gazzinelli RT. (2008). Recruitment and endo-lysosomal activation of TLR9 in dendritic cells infected with Trypanosoma cruzi. *J Immunol* 181(2): 1333–44.
- Benirschke, K., Kaufmann, P. y Baergen, R., (2015). Pathology of the human placenta,
- Bergmann S, Elbahesh H (2019). Targeting the proviral host kinase, FAK, limits influenza A virus pathogenesis and NFkB-regulated pro-inflammatory responses. *Virology.*; 534: 54-63.
- Besuschio SA, Llano Murcia M, Benatar AF, Monnerat S, Cruz I, Picado A, Curto MLÁ, Kubota Y, Wehrendt DP, Pavia P, Mori Y, Puerta C, Ndung'u JM, Schijman AG (2017). Analytical sensitivity and specificity of a loop-mediated isothermal amplification (LAMP) kit prototype for detection of Trypanosoma cruzi DNA in human blood samples. *PLoS Negl Trop Dis.* 20; 11 (7):e0005779.
- Bevilacqua E, Paulesu L, Ferro EA, Ietta F, Faria MR, Lorenzon AR, Costa AF, Martucci M (2014). Review: putative roles for the macrophage migratory inhibitory factor at the maternal fetal interface. *Placenta.*; 35 Suppl:S51-6
- Bittencourt, A. (1976). Congenital Chagas Disease. *Am J Dis Child*, 130, pp. 97–130.
- Bittencourt, A. (1992). Possible risk factors for vertical transmission of chagas' disease. *Rev Inst Med Trop.* 34(5), pp. 403–408.

- Blanco, S.B. y col. (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.
- Bonizzi G, Karin M (2004). The two NF-kappaB activation pathways and their role in innate and adaptive immunity. *Trends Immunol.*; 25(6):280-8.
- Brisse, S., Verhoef, J. y 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.
- Britto C, Cardoso MA, Ravel C, Santoro A, Pereira JB, Coura JR, Morel CM, Wincker P. (1995). *Trypanosoma cruzi*: Parasite Detection and Strain Discrimination in Chronic Chagasic Patients from Northeastern Brazil Using PCR Amplification of Kinetoplast DNA and Nonradioactive Hybridization. *Experimental parasitology*, 81, pp. 462–471.
- Bua J, Volta BJ, Velazquez EB, Ruiz AM, Rissio AM, Cardoni RL. (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.
- Burgos JM, Altchek J, Bisio M, Duffy T, Valadares HM, Seidenstein ME, Piccinali R, Freitas JM, Levin MJ, Macchi L, Macedo AM, Freilij H, Schijman AG. (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.
- Bustos PL, Milduberger N, Volta BJ, Perrone AE, Laucella SA, Bua J (2019). *Trypanosoma cruzi* Infection at the Maternal-Fetal Interface: Implications of Parasite Load in the Congenital Transmission and Challenges in the Diagnosis of Infected Newborns. *Front Microbiol.* 7;10:1250
- Calandra T, Roger T (2003). Macrophage migration inhibitory factor: a regulator of innate immunity. *Nat Rev Immunol.*;3(10):791-800. Review.
- Camandaroba, E.L.P., Pinheiro Lima, C.M. & Andrade, S.G., (2002). Oral transmission of Chagas disease: Importance of *Trypanosoma cruzi* biotype in the intragastric experimental infection. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo*, 44(2), pp.97–103.
- Campos MA, Almeida IC, Takeuchi O, Akira S, Valente EP, Procópio DO, Travassos LR, Smith JA, Golenbock DT, Gazzinelli RT. (2001). Activation of Toll-like receptor-2 by glycosylphosphatidylinositol anchors from a protozoan parasite. *J Immunol* 167(1): 416–23.
- Cardoso EJ, Valdéz GC, Campos AC, de la Luz Sanchez R, Mendoza CR, Hernández AP, Ramírez MH, Habana JR, González EB, Matsumura PD, Carlier Y (2012).

- Maternal fetal transmission of *Trypanosoma cruzi*: a problem of public health little studied in Mexico. *Exp Parasitol.*;131(4):425-32.
- Carlier Y (2005). Factors and mechanisms involved in the transmission and development of congenital infection with *Trypanosoma cruzi*. *Rev Soc Bras Med Trop.*;38 Suppl 2:105-7.
- Carlier Y, Sosa-Estani S, Luquetti AO, Buekens P. (2015). Congenital Chagas disease: an update. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 110(3), pp.363–368.
- Carlier Y, Truyens C, Deloron P, Peyron F. (2012). Congenital parasitic infections: A review. *Acta Tropica*, 121(2), pp.55–70.
- Carlier, Y. 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.
- Carlier, Y. y Truyens, C. (2015). Congenital Chagas disease as an ecological model of interactions between *Trypanosoma cruzi* parasites, pregnant women, placenta and fetuses. *Acta Tropica*. Elsevier B.V., 151(1), pp. 103–115.
- Carlier, Y., y Truyens, C. (2010). Maternal–Fetal Transmission of *Trypanosoma cruzi*. *American Trypanosomiasis*, 539–581.
- Carrillo, I., Droguett, D., Castillo, C., Liempi, A., Muñoz, L., Maya, J. D., Kemmerling, U. (2016). Caspase-8 activity is part of the BeWo trophoblast cell defense mechanisms against *Trypanosoma cruzi* infection. *Experimental Parasitology*, 168, 9–15.
- Cartwright JE, Fraser R, Leslie K, Wallace AE, James JL (2010). Remodelling at the maternal-fetal interface: relevance to human pregnancy disorders. *Reproduction.*; 140(6):803-13.
- Carvalho JV, Alves CM, Cardoso MR, Mota CM, Barbosa BF, Ferro EA, Silva NM, Mineo TW, Mineo JR, Silva DA (2010). Differential susceptibility of human trophoblastic (BeWo) and uterine cervical (HeLa) cells to *Neospora caninum* infection. *Int J Parasitol.*;40(14):1629-37.
- Castillo C, Carrillo I, Libisch G, Juiz N, Schijman A, Robello C, Kemmerling U (2018). Host-parasite interaction: changes in human placental gene expression induced by *Trypanosoma cruzi*. *Parasit Vectors*. 24;11(1):479
- Castillo C, Muñoz L, Carrillo I, Liempi A, Medina L, Galanti N, Maya JD, Kemmerling U (2017). Toll-like receptor-2 mediates local innate immune response against *Trypanosoma cruzi* in ex vivo infected human placental chorionic villi explants. *Placenta.*;60:40-46.
- Castillo, C., López-Muñoz, R., Duaso, J., Galanti, N., Jaña, F., Ferreira, J., Kemmerling, U. (2012). Role of matrix metalloproteinases 2 and 9 in ex vivo *Trypanosoma cruzi* infection of human placental chorionic villi. *Placenta*, 33(12), 991–997.

- Castro AS, Alves CM, Angeloni MB, Gomes AO, Barbosa BF, Franco PS, Silva DA, Martins-Filho OA, Mineo JR, Mineo TW, Ferro EA (2013). Trophoblast cells are able to regulate monocyte activity to control *Toxoplasma gondii* infection. *Placenta*; 34(3):240-7
- Chaisavaneeyakorn S, Moore JM, Othoro C, Otieno J, Chaiyaraj SC, Shi YP, Nahlen BL, Lal AA, Udhayakumar V (2002). Immunity to placental malaria. IV. Placental malaria is associated with up-regulation of macrophage migration inhibitory factor in intervillous blood. *J Infect Dis*. 1;186(9):1371-5.
- Ckless K, van der Vliet A, Janssen-Heininger Y (2007). Oxidative-nitrosative stress and post-translational protein modifications: implications to lung structure-function relations. Arginase modulates NF-kappaB activity via a nitric oxide-dependent mechanism. *Am J Respir Cell Mol Biol*.; 36(6):645-53.
- Coppé JP, Patil CK, Rodier F, Sun Y, Muñoz DP, Goldstein J, Nelson PS, Desprez PY, Campisi J (2008). Senescence-associated secretory phenotypes reveal cell-nonautonomous functions of oncogenic ras and the p53 tumor suppressor. *PLoS Biol* 6:2853–2868.
- Corrales RM, Mora MC, Negrette OS, Diosque P, Lacunza D, Virreira M, Brenière SF, Basombrio MA. (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.
- 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.
- Cuna WR, Choque AG, Passera R, Rodriguez C (2009). Pro-inflammatory cytokine production in chagasic mothers and their uninfected newborns. *J Parasitol*. ;95(4):891-4.
- Cura CI, Duffy T, Lucero RH, Bisio M, Péneau J, Jimenez-Coello M, Calabuig E, Gimenez MJ, Valencia Ayala E, Kjos SA, Santalla J, Mahaney SM, Cayo NM, Nagel C, Barcán L, Málaga Machaca ES, Acosta Viana KY, Brutus L, Ocampo SB, Aznar C, Cuba Cuba CA, Gürtler RE, Ramsey JM, Ribeiro I, VandeBerg JL, Yadon ZE, Osuna A, Schijman AG (2015). Multiplex Real-Time PCR Assay Using TaqMan Probes for the Identification of *Trypanosoma cruzi* DTUs in Biological and Clinical Samples. *PLoS Negl Trop Dis*. 19;9(5):e0003765.
- Cutrullis, R.A., Postan, M., Petray, P.B., Corral, R.S (2009). Timing of expression of inflammatory mediators in skeletal muscles from mice acutely infected with the RA strain of *Trypanosoma cruzi*. *Pathobiology : journal of immunopathology, molecular and cellular biology*, 76(4), 170–180.
- Cutrullis RA, Petray PB, Schapachnik E, Sánchez R, Postan M, González MN, Martín V, Corral RS (2013). Elevated serum levels of macrophage migration inhibitory factor are associated with progressive chronic cardiomyopathy in patients with Chagas disease. *PLoS One*. 2013;8(2):e57181.

- Cutrullis RA, Petray PB, Corral RS (2017). MIF-driven activation of macrophages induces killing of intracellular *Trypanosoma cruzi* dependent on endogenous production of tumor necrosis factor, nitric oxide and reactive oxygen species. *Immunobiology.*; 222(2):423-431.
- de Oliveira Gomes, A., de Oliveira Silva, D. A., Silva, N. M., de Freitas Barbosa, B., Franco, P. S., Angeloni, M. B., Fermino, M. L., Roque-Barreira, M. C., Bechi, N., Paulesu, L. R., Dos Santos, M. C., Mineo, J. R., & Ferro, E. A. (2011). Effect of macrophage migration inhibitory factor (MIF) in human placental explants infected with *Toxoplasma gondii* depends on gestational age. *The American journal of pathology*, 178(6), 2792–2801.
- De Souza W. (2002). From the cell biology to the development of new chemotherapeutic approaches against trypanosomatids: dreams and reality. *Kinetoplastid Biol Dis.* 31; 1(1):3.
- Dharane Neé Ligam P, Manuelpillai U, Wallace E, Walker DW (2010). NFκB-dependent increase of kynurenine pathway activity in human placenta: inhibition by sulfasalazine. *Placenta.* 2010;31(11):997-1002.
- Díaz-Luján C, Triquell MF, Castillo C, Hardisson D, Kemmerling U, Fretes RE (2016). Role of placental barrier integrity in infection by *Trypanosoma cruzi*. *Acta Trop.*; 164:360-368.
- Díaz-Luján C, Triquell MF, Schijman A, Paglini P, Fretes RE. (2012). Placental Infection by Trypanosome *Cruzi*, the Causal Agent of Congenital Chagas Disease. in *Recent Advances in Research on the Human Placenta*. 1st edn. Croacia, pp. 127–148.
- Díaz-Luján C, Triquell MF, Sembaj A, Guerrero CE, Fretes RE. (2004). *Trypanosoma cruzi*: productive infection is not allowed by chorionic villous explant from normal human placenta in vitro. *Experimental parasitology*, 108(3–4), pp. 176–81.
- Duffy T, Bisio M, Altcheh J, Burgos JM, Diez M, Levin MJ, Favaloro RR, Freilij H, Schijman AG (2009). Accurate real-time PCR strategy for monitoring bloodstream parasitic loads in chagas disease patients. *PLoS Negl Trop Dis*;3(4):e419.
- Duffy T, Cura CI, Ramirez JC, Abate T, Cayo NM, Parrado R, Bello ZD, Velazquez E, Muñoz-Calderon A, Juiz NA, Basile J, Garcia L, Riarte A, Nasser JR, Ocampo SB, Yadon ZE, Torrico F, de Noya BA, Ribeiro I, Schijman AG. (2013). Analytical performance of a multiplex Real-Time PCR assay using TaqMan probes for quantification of *Trypanosoma cruzi* satellite DNA in blood samples. *PLoS neglected tropical diseases*, 7(1), p. e2000.
- Dumonteil E, Herrera C, Buekens P (2019). A therapeutic preconceptional vaccine against Chagas disease: A novel indication that could reduce congenital transmission and accelerate vaccine development. *PLoS Negl Trop Dis.* 31; 13(1):e0006985.
- Dutra WO, Menezes CA, Magalhães LM, Gollob KJ (2014). Immunoregulatory networks in human Chagas disease. *Parasite Immunol.*; 36(8):377-87.

- Eigenbrod T, Bode KA, Dalpke AH (2013). Early inhibition of IL-1 β expression by IFN- γ is mediated by impaired binding of NF- κ B to the IL-1 β promoter but is independent of nitric oxide. *J Immunol.* Jun 15;190(12):6533-41.
- Fernandez-Aguilar, S. (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.
- Ferro EA, Mineo JR, Ietta F, Bechi N, Romagnoli R, Silva DA, Sorda G, Bevilacqua E, Paulesu LR (2008). Macrophage migration inhibitory factor is up-regulated in human first-trimester placenta stimulated by soluble antigen of *Toxoplasma gondii*, resulting in increased monocyte adhesion on villous explants. *Am J Pathol.*;172(1):50-8.
- Fisher JJ, Bartho LA, Perkins AV, Holland OJ (2019). Placental mitochondria and reactive oxygen species in the physiology and pathophysiology of pregnancy. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 30
- Frank F, Sartori MJ, Asteggiano C, Lin S, de Fabro SP, Fretes RE. (2000). The effect of placental subfractions on *Trypanosoma cruzi*. *Exp Mol Pathol.* Oct; 69(2):144-51.
- Freilij, H. y 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.
- Fretes, E. y Fabro, S. de. (1990). *Trypanosoma cruzi*: modification of alkaline phosphatase activity induced by trypomastigotes in cultured human placental villi. *Rev Inst Med Trop*, 32, pp. 403–409.
- Fretes, R. y Fabro, S. (1995). In vivo in vitro analysis of lysosomes and acid phosphatase activity in human chagasic placentas. *Exp Mol Pathol*, 63, p. 153–160.
- Fretes, R.E. y 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.
- Garcia A, Ortiz S, Iribarren C, Bahamonde MI, Solari A. (2014). Congenital co-infection with different *Trypanosoma cruzi* lineages. *Parasitology International*, 63(1), pp.138–139.
- García MM, De Rissio AM, Villalonga X, Mengoni E, Cardoni RL. (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
- Garcia-Ruiz G, Flores-Espinosa P, Preciado-Martínez E, Bermejo-Martínez L, Espejel-Nuñez A, Estrada-Gutierrez G, Maida-Claros R, Flores-Pliego A, Zaga-Clavellina V (2015). In vitro progesterone modulation on bacterial endotoxin-induced

- production of IL-1 β , TNF α , IL-6, IL-8, IL-10, MIP-1 α , and MMP-9 in pre-labor human term placenta. *Reprod Biol Endocrinol.* 7;13:115.
- Gazzinelli, R. T. y E. Y. Denkers (2006). Protozoan encounters with Toll-like receptor signaling pathways: implications for host parasitism. *Nat Rev Immunol* 6(12): 895–906.
- Geurts, N., Opendakker, G., Van den Steen, P. E. (2012). Matrix metalloproteinases as therapeutic targets in protozoan parasitic infections. *Pharmacology & therapeutics*, 133(3), 257–279.
- Ghosh S, Dass JF (2016). Study of pathway cross-talk interactions with NF- κ B leading to its activation via ubiquitination or phosphorylation: A brief review. *Gene*; 10;584(1):97-109.
- Gilmore TD, Herscovitch M (2006). Inhibitors of NF-kappaB signaling: 785 and counting. *Oncogene.* 30; 25(51):6887-99..
- Green LC, Wagner DA, Glogowski J, Skipper PL, Wishnok JS, Tannenbaum SR (1982) Analysis of nitrate, nitrite, and [15N]nitrate in biological fluids. *Anal Biochem.*;126(1):131-8.
- Guimarães-Pinto K, Nascimento DO, Corrêa-Ferreira A, Morrot A, Freire-de-Lima CG, Lopes MF, DosReis GA, Filardy AA (2018). Trypanosoma cruzi Infection Induces Cellular Stress Response and Senescence-Like Phenotype in Murine Fibroblasts. *Front Immunol.* 9;9:1569.
- Gürtler, R.E., Segura, E.L. y Cohen, J.E., (2003). Congenital transmission of Trypanosoma cruzi infection in Argentina. *Emerging infectious diseases*, 9(1), pp.29–32.
- Gutierrez F (2011). Chapter 4. Regulation of Innate Immunity During Trypanosoma cruzi Infection. En Aliberti (ed.), *Control of Innate and Adaptive Immune Responses during Infectious Diseases*,
- Gutierrez, F. R., Lalu, M. M., Mariano, F. S., Milanezi, C. M., Cena, J., Gerlach, R. F., (2008). Increased activities of cardiac matrix metalloproteinases matrix metalloproteinase (MMP)-2 and MMP-9 are associated with mortality during the acute phase of experimental Trypanosoma cruzi infection. *J Infect Dis* 197, 1468–1476.
- He MY, Wang G, Han SS, Jin Y, Li H, Wu X, Ma ZL, Cheng X, Tang X, Yang X, Liu GS (2016). Nrf2 signalling and autophagy are involved in diabetes mellitus-induced defects in the development of mouse placenta. *Open Biol.*;6(7). pii: 160064.
- Heerema-McKenney A (2018). Defense and infection of the human placenta. *APMIS.*;126(7):570-588.

- Hermann E, Truyens C, Alonso-Vega C, Even J, Rodriguez P, Berthe A, Gonzalez-Merino E, Torrico F, Carlier Y (2002). Human fetuses are able to mount an adultlike CD8 T-cell response. *Blood*. 15;100(6):2153-8.
- Hermann E, Truyens C, Alonso-Vega C, Rodriguez P, Berthe A, Torrico F, Carlier Y (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.
- Herrera C, Truyens C, Dumonteil E, Alger J, Sosa-Estani S, Cafferata ML, Gibbons L, Ciganda A, Matute ML, Zuniga C, Carlier Y, Buekens P (2019). Phylogenetic Analysis of *Trypanosoma cruzi* from Pregnant Women and Newborns from Argentina, Honduras, and Mexico Suggests an Association of Parasite Haplotypes with Congenital Transmission of the Parasite. *J Mol Diagn*. 23. pii: S1525-1578(19)30367-8.
- Herreros-Cabello A, Callejas-Hernández F, Fresno M, Gironès N (2019). Comparative proteomic analysis of trypomastigotes from *Trypanosoma cruzi* strains with different pathogenicity. *Infect Genet Evol*. 16;76:104041.
- Higo H, Yanagi T, Matta V, Agatsuma T, Kanbara H, Tada I, De Leon MP, Monroy C, Tabaru Y (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.
- Hildebrand D, Sahr A, Wölfle SJ, Heeg K, Kubatzky KF (2012). Regulation of Toll-like receptor 4-mediated immune responses through *Pasteurella multocida* toxin-induced G protein signalling. *Cell Commun Signal*. 1; 10(1):22.
- Hölscher C, Köhler G, Müller U, Mossmann H, Schaub GA, Brombacher F (1998). Defective nitric oxide effector functions lead to extreme susceptibility of *Trypanosoma cruzi*-infected mice deficient in gamma interferon receptor or inducible nitric oxide synthase. *Infect Immun*.;66(3):1208-15.
- Houston-Ludlam GA, Belew AT, El-Sayed NM (2016). Comparative Transcriptome Profiling of Human Foreskin Fibroblasts Infected with the Sylvio and Y Strains of *Trypanosoma cruzi*. *PLoS One*. 9;11(8):e0159197.
- Hovsepian E, Penas F, Siffo S, Mirkin GA, Goren NB (2013). IL-10 inhibits the NF-κB and ERK/MAPK-mediated production of pro-inflammatory mediators by up-regulation of SOCS-3 in *Trypanosoma cruzi*-infected cardiomyocytes. *PLoS One*. 18;8(11):e79445.
- Hovsepian, E., Mirkin, G. A., Penas, F., Manzano, A., Bartrons, R., Goren, N. B. (2011). Modulation of inflammatory response and parasitism by 15-deoxy-delta (12,14) prostaglandin J(2) in *Trypanosoma cruzi*-infected cardiomyocytes. *Int J Parasitol* 41, 553–562.

- Howard EJ, Xiong X, Carlier Y, Sosa-Estani S, Buekens P. (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.
- 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.
- Jimenez-Coello M, Shelite T, Castellanos-Gonzalez A, Saldarriaga O, Rivero R, Ortega-Pacheco A, Acevedo-Arcique C, Amaya-Guardia K, Garg N, Melby P, Travi BL (2018). Efficacy of Recombinase Polymerase Amplification to Diagnose *Trypanosoma cruzi* Infection in Dogs with Cardiac Alterations from an Endemic Area of Mexico. *Vector Borne Zoonotic Dis.*; 18(8):417-423.
- Juiz NA, Torrejón I, Burgos M, Torres AMF, Duffy T, Cayo NM, Tabasco A, Salvo M, Longhi SA, Schijman AG (2018). Alterations in Placental Gene Expression of Pregnant Women with Chronic Chagas Disease. *Am J Pathol.*; 188(6):1345-1353.
- Junqueira C, Caetano B, Bartholomeu DC, Melo MB, Ropert C, Rodrigues MM, Gazzinelli RT (2010). The endless race between *Trypanosoma cruzi* and host immunity: lessons for and beyond Chagas disease. *Expert Rev Mol Med.* 15;12:e29.
- Kawai T, Akira S (2007). Signaling to NF-kappaB by Toll-like receptors. *Trends Mol Med.*; 13(11):460-9.
- Kayama H, Takeda K (2010). The innate immune response to *Trypanosoma cruzi* infection. *Microbes Infect.*; 12(7):511-7.
- Kemmerling U, Osuna A, Schijman AG, Truyens C (2019). Congenital Transmission of *Trypanosoma cruzi*: A Review About the Interactions Between the Parasite, the Placenta, the Maternal and the Fetal/Neonatal Immune Responses. *Front Microbiol.* 14;10:1854
- Kiss H, Schneeberger C, Tschugguel W, Lass H, Huber JC, Husslein P, Knöfler M (1998). Expression of endothelial (type III) nitric oxide synthase in cytotrophoblastic cell lines: regulation by hypoxia and inflammatory cytokines. *Placenta.* 19(8):603-11.
- Koo SJ, Szczesny B, Wan X, Putluri N, Garg NJ (2018). Pentose Phosphate Shunt Modulates Reactive Oxygen Species and Nitric Oxide Production Controlling *Trypanosoma cruzi* in Macrophages. *Front Immunol.* 16;9:202.
- Kropf P, Baud D, Marshall SE, Munder M, Mosley A, Fuentes JM, Bangham CR, Taylor GP, Herath S, Choi BS, Soler G, Teoh T, Modolell M, Müller I (2007). Arginase activity mediates reversible T cell hyporesponsiveness in human pregnancy. *Eur J Immunol.*;37(4):935-45.

- Laemmli UK. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 15;227(5259):680-5.
- Lappas M, Permezel M, Georgiou HM, Rice GE (2002). Nuclear factor kappa B regulation of pro-inflammatory cytokines in human gestational tissues in vitro. *Biol Reprod*;67:668e73.
- Lappas M, Permezel M, Ho PW, Moseley JM, Wlodek ME, Rice GE (2004). Effect of nuclear factor-kappa B inhibitors and peroxisome proliferator-activated receptor-gamma ligands on PTHrP release from human fetal membranes. *Placenta*.;25(8-9):699-704.
- Lawrence T (2009). The nuclear factor NF-kappaB pathway in inflammation. *Cold Spring Harb Perspect Biol*.;1(6):a001651.
- Li Y, Shah-Simpson S, Okrah K, Belew AT, Choi J, Caradonna KL, Padmanabhan P, Ndegwa DM, Temanni MR, Corrada Bravo H, El-Sayed NM, Burleigh BA (2016). Transcriptome Remodeling in *Trypanosoma cruzi* and Human Cells during Intracellular Infection. *PLoS Pathog*. 2016 5; 12(4):e1005511
- Liempi A, Castillo C, Carrillo I, Muñoz L, Droguett D, Galanti N, Maya JD, Kemmerling U (2016). A local innate immune response against *Trypanosoma cruzi* in the human placenta: The epithelial turnover of the trophoblast. *Microb Pathog*.; 99:123-129
- Liempi A, Castillo C, Duaso J, Droguett D, Sandoval A, Barahona K, Hernández A, Galanti N, Maya JD, Kemmerling U (2014). *Trypanosoma cruzi* induces trophoblast differentiation: a potential local antiparasitic mechanism of the human placenta? *Placenta*.; 35(12):1035-42.
- Liempi A, Castillo C, Medina L, Rojas M, Maya JD, Parraguez VH, Kemmerling U (2019). Ex vivo infection of human placental explants with *Trypanosoma cruzi* and *Toxoplasma gondii*: Differential activation of NF kappa B signaling pathways. *Acta Trop*.;199:105153.
- Lim R, Barker G, Lappas M (2014). TREM-1 expression is increased in human placentas from severe early-onset preeclamptic pregnancies where it may be involved in syncytialization. *Reprod Sci*.;21(5):562-72.
- Lindström TM, Bennett PR. (2005) 15-Deoxy- $\Delta^{12,14}$ -prostaglandin j_2 inhibits interleukin-1 β -induced nuclear factor- κ b in human amnion and myometrial cells: mechanisms and implications. *J Clin Endocrinol Metab*.; 90(6):3534-43.
- Liu L, Chen J, Cao M, Wang J, Wang S (2019). NO donor inhibits proliferation and induces apoptosis by targeting PI3K/AKT/mTOR and MEK/ERK pathways in hepatocellular carcinoma cells. *Cancer Chemother Pharmacol*. 25.

- Liu X, Jiang M, Ren L, Zhang A, Zhao M, Zhang H, Jiang Y, Hu X (2018). Decidual macrophage M1 polarization contributes to adverse pregnancy induced by *Toxoplasma gondii* PRU strain infection. *Microb Pathog.*;124:183-190.
- Londero AP, Orsaria M, Marzinotto S, Grassi T, Fruscalzo A, Calcagno A, Bertozzi S, Nardini N, Stella E, Lellé RJ, Driul L, Tell G, Mariuzzi L (2016). Placental aging and oxidation damage in a tissue micro-array model: an immunohistochemistry study. *Histochem Cell Biol.*; 146(2):191-204.
- Long M, Park SG, Strickland I, Hayden MS, Ghosh S (2009). Nuclear factor- κ B modulates regulatory T cell development by directly regulating expression of Foxp3 transcription factor. *Immunity*; 31:921–31.
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 193(13), p. 265.
- Lucafò M, Pugnelli L, Bramuzzo M, Curci D, Di Silvestre A, Marcuzzi A, Bergamo A, Martellosi S, Villanacci V, Bozzola A, Cadei M, De Iudicibus S, Decorti G, Stocco G (2019). Long Non-Coding RNA GAS5 and Intestinal MMP2 and MMP9 Expression: A Translational Study in Pediatric Patients with IBD. *Int J Mol Sci.* 24;20(21).
- Luquetti AO, Tavares SB, Siriano Lda R, Oliveira RA, Campos DE, de Moraes CA, de Oliveira EC. (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.
- Martinez FO, Gordon S (2014). The M1 and M2 paradigm of macrophage activation: time for reassessment. *F1000Prime Rep.* 3;6:13. Review.
- Martins-Melo FR, Lima Mda S, Ramos AN Jr, Alencar CH, Heukelbach J. (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.
- Mathew DJ, Newsom EM, Guyton JM, Tuggle CK, Geisert RD, Lucy MC (2015). Activation of the transcription factor nuclear factor-Kappa B in uterine luminal epithelial cells by interleukin 1 Beta 2: a novel interleukin 1 expressed by the elongating pig conceptus1. *Biol Reprod*; 92:107, 1-107,13.
- Mayer JP, Biancardi M, Altcheh J, Freilij H, Weinke T, Liesenfeld O (2010). Congenital infections with *Trypanosoma cruzi* or *Toxoplasma gondii* are associated with decreased serum concentrations of interferon- γ and interleukin-18 but increased concentrations of interleukin-10. *Ann Trop Med Parasitol.*; 104(6):485-92.
- Medina L, Castillo C, Liempi A, Herbach M, Cabrera G, Valenzuela L, Galanti N, de Los Angeles Curto M, Schijman AG, Kemmerling U (2018). Differential infectivity of two *Trypanosoma cruzi* strains in placental cells and tissue. *Acta Trop*;186:35-40.

- Miller SC, Huang R, Sakamuru S, Shukla SJ, Attene-Ramos MS, Shinn P, Van Leer D, Leister W, Austin CP, Xia M (2010). Identification of known drugs that act as inhibitors of NF-kappaB signaling and their mechanism of action. *Biochem Pharmacol.* 1; 79(9):1272-80.
- Mills, C. D., Kincaid, K., Alt, J. M., Heilman, M. J. y Hill, A. M (2000). M-1/M-2 macrophages and the Th1/ Th2 paradigm. *J. Immunol.* 164, 6166–6173.
- Molina I, Salvador F, Sánchez-Montalvá A. (2016). [Update Chagas disease]. *Enferm Infecc Microbiol Clin.*;34(2):132-8.
- Montes-Rincón LM, Galaviz-Silva L, González-Bravo FE, Molina-Garza ZJ (2016). Trypanosoma cruzi seroprevalence in pregnant women and screening by PCR and microhaematocrit in newborns from Guanajuato, Mexico. *Acta Trop.*; 164:100-106.
- Mor G, Aldo P, Alvero AB (2017). The unique immunological and microbial aspects of pregnancy. *Nat Rev Immunol.*; 17(8):469-482.
- Mor G, Cardenas I (2010). The immune system in pregnancy: a unique complexity. *Am J Reprod Immunol.*; 63(6):425-33.
- Mor G, Cardenas I, Abrahams V, Guller S (2011). Inflammation and pregnancy: the role of the immune system at the implantation site. *Ann N Y Acad Sci.*; 1221:80-7.
- Moretti E, Basso B, Castro I, Carrizo Paez M, Chaul M, Barbieri G, Canal, Feijoo D, Sartori MJ, Carrizo Paez R.(2005) Chagas' disease: study of congenital transmission in cases of acute maternal infection. *Rev Soc Bras Med Trop.*; 38(1):53-5.
- Moser, D. R., Kirchhoff, L. V and Donelson, J. E. (1989). Detection of Trypanosoma cruzi by DNA Amplification Using the Polymerase Chain Reaction. *J. Clin. Microbiol*, 27(7), p. 1477.
- Moya P, Moretti E, Paolasso R, Basso B, Blanco S, Sanmartino C, Soich de Cura A. (1989). Neonatal Chagas disease: laboratory diagnosis during the first year of life. *Medicina*, 49(6), pp.595–9.
- Moya, P. y 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.
- Murcia L, Carrilero B, Saura D, Iborra MA, Segovia M (2013). [Diagnosis and treatment of Chagas disease]. *Enferm Infecc Microbiol Clin.*;31 Suppl 1:26-34.
- Nadeem U, Ye G, Salem M, Peng C (2014). MicroRNA-378a-5p targets cyclin G2 to inhibit fusion and differentiation in BeWo cells. *Biol Reprod.*;91(3):76

- Nakamura H, Kimura T, Ogita K, Koyama S, Tsujie T, Tsutsui T, Shimoya K, Koyama M, Kaneda Y, Murata Y (2004). Alteration of the timing of implantation by in vivo gene transfer: delay of implantation by suppression of nuclear factor kappaB activity and partial rescue by leukemia inhibitory factor. *Biochem Biophys Res Commun.* 3;321(4):886-92.
- Nathan CF, Murray HW, Wiebe ME, Rubin BY (1983). Identification of interferon gamma as the lymphokine that activates human macrophage oxidative metabolism and antimicrobial activity. *J Exp Med.* 158:670–89.
- Neira, I., Ferreira, A.T. y 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.
- Oliveira AC, de Alencar BC, Tzelepis F, Klezewsky W, da Silva RN, Neves FS, Cavalcanti GS, Boscardin S, Nunes MP, Santiago MF, Nóbrega A, Rodrigues MM, Bellio M. (2010). Impaired innate immunity in Tlr4(-/-) mice but preserved CD8+ T cell responses against *Trypanosoma cruzi* in Tlr4-, Tlr2-, Tlr9- or Myd88-deficient mice. *PLoS Pathog* 6(4): e1000870.
- Oliveira JG, Silva NM, Santos AA, Souza MA, Ferreira GL, Mineo JR, Ferro EA (2006). BeWo trophoblasts are unable to control replication of *Toxoplasma gondii*, even in the presence of exogenous IFN-gamma. *Placenta.*;27(6-7):691-8
- Orecchioni M, Ghosheh Y, Pramod AB, Ley K (2019). Macrophage Polarization: Different Gene Signatures in M1(LPS+) vs. Classically and M2(LPS-) vs. Alternatively Activated Macrophages. *Front Immunol.* 2019 24;10:1084.
- Ouaisi, A., E. Guilvard, et al. (2002). "The *Trypanosoma cruzi* Tc52-released protein induces human dendritic cell maturation, signals via Toll-like receptor 2, and confers protection against lethal infection." *J Immunol* 168(12): 6366–74.
- PAHO (2010) Guía de Diagnóstico, Tratamiento y Prevención de la Enfermedad de Chagas. Available at: https://www.paho.org/panaftosa/index.php?option=com_docman&view=download&category_slug=zoonosis-779&alias=207-guia-enfermedad-chagas-7&Itemid=518
- Paiva CN, Medei E, Bozza MT (2018). ROS and *Trypanosoma cruzi*: Fuel to infection, poison to the heart. *PLoS Pathog.* 19; 14(4):e1006928.
- Panis C, Victorino VJ, Tatakihara VLH, Cecchini R, Rizzo LV, Yamauchi LM, Yamada-Ogatta SF, Martins-Pinge MC, Pinge-Filho P (2019). Differences in cNOS/iNOS Activity during Resistance to *Trypanosoma cruzi* Infection in 5-Lipoxygenase Knockout Mice. *Mediators Inflamm.*:5091630.
- Pattillo RA, Gey GO, Delfs E, Mattingly RF. (1968) Human hormone production in vitro. *Science.* 29;159(3822):1467-9.
- Pérez Brandán C, Mesías AC, Parodi C, Cimino RO, Pérez Brandán C, Diosque P, Basombrío MÁ (2017). Effects of IFN-γ coding plasmid supplementation in the

- immune response and protection elicited by *Trypanosoma cruzi* attenuated parasites. *BMC Infect Dis.* 25;17(1):732.
- Pérez-Molina JA, Molina I (2018). Chagas disease. *Lancet.* 6;391(10115):82-94
- Perkins ND (2007). Integrating cell-signalling pathways with NF-kappaB and IKK function. *Nat Rev Mol Cell Biol.*;8(1):49-62.
- Petersen CA, Krumholz KA, Carmen J, Sinai AP, Burleigh BA (2006). *Trypanosoma cruzi* infection and nuclear factor kappa B activation prevent apoptosis in cardiac cells. *Infect Immun.*;74(3):1580-7.
- Piron M, Fisa R, Casamitjana N, López-Chejade P, Puig L, Vergés M, Gascón J, Gómez i Prat J, Portús M, Sauleda S. (2007). Development of a real-time PCR assay for *Trypanosoma cruzi* detection in blood samples. *Acta Tropica*, 103, pp. 195–200.
- Pong CK, Thévenon AD, Zhou JA, Taylor DW (2009). Influence of human chorionic gonadotropin (hCG) on in vitro growth of *Plasmodium falciparum*. *Malar J.* 14; 8:101.
- PrabhuDas M, Bonney E, Caron K, Dey S, Erlebacher A, Fazleabas A, Fisher S, Golos T, Matzuk M, McCune JM, Mor G, Schulz L, Soares M, Spencer T, Strominger J, Way SS, Yoshinaga K (2015). Immune mechanisms at the maternal-fetal interface: perspectives and challenges. *Nat Immunol.*; 16(4):328-34.
- Programa Nacional de Chagas (2012). GUÍAS PARA LA ATENCION AL PACIENTE INFECTADO CON (*Trypanosoma cruzi*). Available at: <http://www.msal.gob.ar/images/stories/bes/graficos/000000622cnt-03-guia-para-la-atencion-al-paciente-con-chagas.pdf>
- Qi XF, Kim DH, Yoon YS, Jin D, Huang XZ, Li JH, et al (2009). Essential involvement of cross talk between IFN-gamma and TNF-alpha in CXCL10 production in human THP-1 monocytes. *J Cell Physiol*;220:690–7.
- Qvarnstrom Y, Schijman AG, Veron V, Aznar C, Steurer F, da Silva AJ. (2012). Sensitive and specific detection of *Trypanosoma cruzi* DNA in clinical specimens using a multi-target real-time PCR approach. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 6(7).
- Racca AC, Ridano ME, Camolotto S, Genti-Raimondi S, Panzetta-Dutari GM (2015). A novel regulator of human villous trophoblast fusion: the Krüppel-like factor 6. *Mol Hum Reprod.*;21(4):347-58.
- Racicot K, Kwon JY, Aldo P, Silasi M, Mor G (2014). Understanding the complexity of the immune system during pregnancy. *Am J Reprod Immunol.*;72(2):107-16.
- Raghupathy R (2013). Cytokines as key players in the pathophysiology of preeclampsia. *Med Princ Pract.* 2013;22 Suppl 1:8-19.

- Ramírez JC, Cura CI, da Cruz Moreira O, Lages-Silva E, Juiz N, Velázquez E, Ramírez JD, Alberti A, Pavia P, Flores-Chávez MD, Muñoz-Calderón A, Pérez-Morales D, Santalla J, Marcos da Matta Guedes P, Peneau J, Marcet P, Padilla C, Cruz-Robles D, Valencia E, Crisante GE, Greif G, Zulantay I, Costales JA, Alvarez-Martínez M, Martínez NE, Villarroel R, Villarroel S, Sánchez Z, Bisio M, Parrado R, Maria da Cunha Galvão L, Jácome da Câmara AC, Espinoza B, Alarcón de Noya B, Puerta C, Riarte A, Diosque P, Sosa-Estani S, Guhl F, Ribeiro I, Aznar C, Britto C, Yadón ZE, Schijman AG (2015). Analytical Validation of Quantitative Real-Time PCR Methods for Quantification of *Trypanosoma cruzi* DNA in Blood Samples from Chagas Disease Patients. *J Mol Diagn*;17(5):605-15.
- Rassi A Jr, Rassi A, Marin-Neto JA. Chagas disease. *Lancet*. (2010) 17; 375(9723):1388-402.
- Rendell VR, Gilman RH, Valencia E, Galdos-Cardenas G, Verastegui M, Sanchez L, Acosta J, Sanchez G, Ferrufino L, LaFuente C, Abastoflor Mdel C, Colanzi R, Bern C (2015). *Trypanosoma cruzi*-infected pregnant women without vector exposure have higher parasitemia levels: implications for congenital transmission risk. *PLoS One*. 25;10(3):e0119527.
- Reyes JL, Terrazas LI, Espinoza B, Cruz-Robles D, Soto V, Rivera-Montoya I, Gómez-García L, Snider H, Satoskar AR, Rodríguez-Sosa M (2006). Macrophage migration inhibitory factor contributes to host defense against acute *Trypanosoma cruzi* infection. *Infect Immun.*; 74(6):3170-9.
- Rocha, G. M., Brandão, B. A., Mortara, R. A., Attias, M., de Souza, W., & Carvalho, T. M. U. (2006). The flagellar attachment zone of *Trypanosoma cruzi* epimastigote forms. *Journal of Structural Biology*, 154(1), 89–99.
- Romero R, Gotsch F, Pineles B, Kusanovic JP (2007). Inflammation in pregnancy: its roles in reproductive physiology, obstetrical complications, and fetal injury. *Nutr Rev.*; 65(12 Pt 2):S194-202.
- Ruiz RC, Favoreto S Jr, Dorta ML, Oshiro ME, Ferreira AT, Manque PM, Yoshida N. (1998). Infectivity of *Trypanosoma cruzi* strains is associated with differential expression of surface glycoproteins with differential Ca²⁺ signalling activity. *The Biochemical journal*, 330 (1), pp.505–11.
- Sakowicz A (2018). The role of NFκB in the three stages of pregnancy - implantation, maintenance, and labour: a review article. *BJOG.*;125(11):1379-1387.
- Salas Clavijo NA, Postigo JR, Schneider D, Santalla JA, Brutus L, Chippaux JP. (2012) Prevalence of Chagas disease in pregnant women and incidence of congenital transmission in Santa Cruz de la Sierra, Bolivia. *Acta Trop.*;124(1):87-91.
- Salas NA, Cot M, Schneider D, Mendoza B, Santalla JA, Postigo J, Chippaux JP, Brutus L. (2007). Risk factors and consequences of congenital Chagas disease in Yacuiba, south Bolivia. *Tropical Medicine and International Health*, 12(12), pp.1498–1505.

- Saleme AE, Yanicelli GL, Iñigo LA, Valperga SM, Alonso E, Paz de Erimbaue A, Moreno A, Zerdan AC, Hatem J, Garcia Toro A. (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.
- Sánchez Negrette O, Mora MC, Basombrío MA. (2005). High prevalence of congenital *Trypanosoma cruzi* infection and family clustering in Salta, Argentina. *Pediatrics*; 115(6):e668-72.
- Santa-Rita, R. M., Barbosa, H. S., & de Castro, S. L. (2006). Ultrastructural analysis of edelfosine-treated trypomastigotes and amastigotes of *Trypanosoma cruzi*. *Parasitology Research*, 100(1), 187–190.
- Sartori MJ, Lin S, Frank FM, Malchiodi EL, de Fabro SP. (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.
- Sartori MJ, Lin S, Fretes RE, Ruiz Moreno L, Goldemberg L, de Fabro SP. (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.
- Schijman AG, Bisio M, Orellana L, Sued M, Duffy T, Mejia Jaramillo AM, Cura C, Auter F, Veron V, Qvarnstrom Y, Deborggraeve S, Hajar G, Zulantay I, Lucero RH, Velazquez E, Tellez T, Sanchez Leon Z, Galvão L, Nolder D, Monje Rumi M, Levi JE, Ramirez JD, Zorrilla P, Flores M, Jercic MI, Crisante G, Añez N, De Castro AM, Gonzalez CI, Acosta Viana K, Yachelini P, Torrico F, Robello C, Diosque P, Triana Chavez O, Aznar C, Russomando G, Büscher P, Assal A, Guhl F, Sosa Estani S, DaSilva A, Britto C, Luquetti A, Ladzins J. (2011) International Study to Evaluate PCR Methods for Detection of *Trypanosoma cruzi* DNA in Blood Samples from Chagas Disease Patients. *PLoS Neglected Tropical Diseases*. 5(1), p. e931.
- Schijman, A. G. (2007). Congenital Chagas Disease. *Disease of the Newborn*, 7069(06).
- Schmuñis GA, Zicker F, Segura EL, del Pozo AE. (2000). Transfusion-transmitted infectious diseases in Argentina, 1995 through 1997. *Transfusion*, 40(9), pp.1048–53.
- Silva GK, Gutierrez FR, Guedes PM, Horta CV, Cunha LD, Mineo TW, Santiago-Silva J, Kobayashi KS, Flavell RA, Silva JS, Zamboni DS (2010). Cutting edge: nucleotide-binding oligomerization domain 1-dependent responses account for murine resistance against *Trypanosoma cruzi* infection. *J Immunol*. 1;184(3):1148-52.
- Solana ME, Celentano AM, Tekiel V, Jones M, González Cappa SM. (2002). *Trypanosoma cruzi*: effect of parasite subpopulation on murine pregnancy outcome. *The Journal of parasitology*, 88(1), pp.102–6.

- 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.
- 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, pp.953–958.
- Stein M, Keshav S, Harris N, Gordon S (1992). Interleukin 4 potently enhances murine macrophage mannose receptor activity: a marker of alternative immunologic macrophage activation. *J ExpMed*. 176:287– 92.
- Stempin C, Giordanengo L, Gea S, Cerbán F (2002). Alternative activation and increase of *Trypanosoma cruzi* survival in murine macrophages stimulated by cruzipain, a parasite antigen. *J Leukoc Biol*. ; 72(4):727-34.
- Stempin CC, Cerban FM (2007). Macrophages and arginase induction as a mechanism for parasite escape. *Medicina (B Aires)*.;67(6 Pt 2):737-46.
- Stempin CC, Garrido VV, Dulgerian LR, Cerbán FM (2008). Cruzipain and SP600125 induce p38 activation, alter NO/arginase balance and favor the survival of *Trypanosoma cruzi* in macrophages. *Acta Trop*. ;106(2):119-27.
- Stempin CC, Tanos TB, Coso OA, Cerbán FM (2004). Arginase induction promotes *Trypanosoma cruzi* intracellular replication in Cruzipain-treated J774 cells through the activation of multiple signaling pathways. *Eur J Immunol*.;34(1):200-9.
- Sturm NR, Degrave W, Morel C, Simpson L. (1989). Sensitive detection and schizodeme classification of *Trypanosoma cruzi* cells by amplification of kinetoplast minicircle DNA sequences: use in diagnosis of Chagas disease. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 33(3), pp. 205–214.
- Sturm NR, Vargas NS, Westenberger SJ, Zingales B, Campbell DA. (2003). Evidence for multiple hybrid groups in *Trypanosoma cruzi*. *International Journal for Parasitology*, 33(3), pp.269–279.
- Tanowitz HB, Kirchhoff LV, Simon D, Morris SA, Weiss LM, Wittner M. (1992). Chagas Disease. *Clinical Microbiology Reviews*, 5(4), pp.400–419.
- Tarleton RL, Reithinger R, Urbina JA, Kitron U, Gürtler RE. (2007).The challenges of Chagas disease - Grim outlook or glimmer of hope? *PLoS Medicine*, 4(12), pp.1852–1857.
- Tarleton, R. L. (2007). "Immune system recognition of *Trypanosoma cruzi*." *Curr Opin Immunol* 19(4): 430–4.
- Teixeira de Pinho RT, da Silva WS, de Castro Côrtes LM, da Silva Vasconcelos Sousa P, de Araujo Soares RO, Alves CR (2014). Production of MMP-9 and inflammatory cytokines by *Trypanosoma cruzi*-infected macrophages. *Exp Parasitol*.; 147:72-80.

- Telleria, J. y Tibayrenc, M. (2017). American Trypanosomiasis, 100 Years of Research Chagas Disease. 2nd edn.
- Telleria, J. y Tibayrenc, M. (2010). American Trypanosomiasis, Chagas Disease One Hundred Years of Research. 1st edn.
- Tibayrenc M, Ayala FJ. (1987). Trypanosoma cruzi populations: more clonal than sexual. Parasitol Today;3(6):189-90.
- Tomlinson MS, Lu K, Stewart JR, Marsit CJ, O'Shea TM, Fry RC (2019). Microorganisms in the Placenta: Links to Early-Life Inflammation and Neurodevelopment in Children. Clin Microbiol Rev. 1;32(3). pii: e00103-18.
- Torrice F, Alonso-Vega C, Suarez E, Rodriguez P, Torrico MC, Dramaix M, Truyens C, Carlier Y. (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
- Torrice F, Vega CA, Suarez E, Tellez T, Brutus L, Rodriguez P, Torrico MC, Schneider D, Truyens C, Carlier Y. (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.
- Triquell MF, Díaz-Luján C, Freilij H, Paglini P, Fretes RE. (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.
- Triquell MF, Díaz-Luján C, Romanini MC, Ramirez JC, Paglini-Oliva P, Schijman AG, Fretes RE (2018). Nitric oxide synthase and oxidative-nitrosative stress play a key role in placental infection by Trypanosoma cruzi. Am J Reprod Immunol.; 80(1):e12852
- Truyens, C., Hermann, E. (2005). Respuesta inmune en neonatos no infectados nacidos de madres infectadas por Trypanosoma cruzi. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical.
- Ucan-Euan F, Hernández-Betancourt S, Arjona-Torres M, Panti-May A, Torres-Castro M (2019). Histopathological study in cardiac tissue of rodents infected with Trypanosoma cruzi, captured in suburbs of Mérida, México. Biomedica. 1; 39(Supl. 2):32-43.
- Vago AR, Macedo AM, Oliveira RP, Andrade LO, Chiari E, Galvão LM, Reis D, Pereira ME, Simpson AJ, Tostes S, Pena SD. (1996). Kinetoplast DNA signatures of Trypanosoma cruzi strains obtained directly from infected tissues. The American journal of pathology, 149(6), pp. 2153–2159.
- Valentich, M. A. (2016). Interacciones Materno-fetal-neonatal: placenta y glándula mamaria', in 5 (ed.) Histología y Embriología Humanas: Bases celulares y

- moleculares con orientación clínico-patológicas. Médica Pan. Buenos Aires, Argentina: 2016, pp. 633–662.
- Vásquez AM, Segura C, Blair S (2013). Induction of pro-inflammatory response of the placental trophoblast by Plasmodium falciparum infected erythrocytes and TNF. Malar J. 15; 12:421.
- Vekemans J, Truyens C, Torrico F, Solano M, Torrico MC, Rodriguez P, Alonso-Vega C, Carlier Y. (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.
- Virreira M, Alonso-Vega C, Solano M, Jijena J, Brutus L, Bustamante Z, Truyens C, Schneider D, Torrico F, Carlier Y, Svoboda M. (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.
- Virreira M, Truyens C, Alonso-Vega C, Brutus L, Jijena J, Torrico F, Carlier Y, Svoboda M. (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.
- Volta BJ, Bustos PL, Cardoni RL, De Rissio AM, Laucella SA, Bua J. (2016). Serum Cytokines as Biomarkers of Early Trypanosoma cruzi infection by Congenital Exposure. The Journal of Immunology, 196(11), pp. 4596–4602.
- White DA, Fang L, Chan W, Morand EF, Kiriazis H, Duffy SJ, Taylor AJ, Dart AM, Du XJ, Gao XM (2013). Pro-inflammatory action of MIF in acute myocardial infarction via activation of peripheral blood mononuclear cells. PLoS One.;8(11):e76206.
- WHO (2007). Reporte sobre la enfermedad de Chagas. Edited by F. Guhl and J. K. Lazdins-Helds. Buenos Aires, Argentina. Available at: http://whqlibdoc.who.int/hq/2007/TDR_SWG_09_spa.pdf.
- WHO (2015). Chagas disease in Latin America: an epidemiological update based on 2010 estimates, World Health Organization.
- WHO (2019). La enfermedad de Chagas (tripanosomiasis americana) Available at: [https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/chagas-disease-\(american-trypanosomiasis\)](https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/chagas-disease-(american-trypanosomiasis)).
- Xu J, Qian J, Xie X, Lin L, Zou Y, Fu M, Huang Z, Zhang G, Su Y, Ge J (2012). High density lipoprotein protects mesenchymal stem cells from oxidative stress-induced apoptosis via activation of the PI3K/Akt pathway and suppression of reactive oxygen species. Int J Mol Sci. 13;13(12):17104-20.
- Yeo M, Acosta N, Llewellyn M, Sánchez H, Adamson S, Miles GA, López E, González N, Patterson JS, Gaunt MW, de Arias AR, Miles MA. (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.
- Yu, X., Lin, S.-G., Huang, X. R., Bacher, M., Leng, L., Bucala, R., & Lan, H. Y. (2007). Macrophage Migration Inhibitory Factor Induces MMP-9 Expression in Macrophages via The MEK-ERK MAP Kinase Pathway. *Journal of Interferon & Cytokine Research*, 27(2), 103–110.
- Zhu JY, Pang ZJ, Yu YH (2012). Regulation of trophoblast invasion: the role of matrix metalloproteinases. *Rev Obstet Gynecol*;5:e137–43.
- Zingales B, Andrade SG, Briones MR, Campbell DA, Chiari E, Fernandes O, Guhl F, Lages-Silva E, Macedo AM, Machado CR, Miles MA, Romanha AJ, Sturm NR, Tibayrenc M, Schijman AG (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.
- Zingales B, Souto RP, Mangia RH, Lisboa CV, Campbell DA, Coura JR, Jansen A, Fernandes O. (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., Miles, M. A., Campbell, D. A., Tibayrenc, M., Macedo, A. M., Teixeira, M. M., Schijman, A. G., Llewellyn, M. S., Lages-Silva, E., Machado, C. R., Andrade, S. G., & Sturm, N. R. (2012). The revised *Trypanosoma cruzi* subspecific nomenclature: rationale, epidemiological relevance and research applications. *Infection, genetics and evolution: journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases*, 12(2), 240–253.

ANEXOS



CONSENTIMIENTO INFORMADO

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

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

____/____/____

Fecha

Firma voluntaria

Nombre y Apellido

Firma del Investigador

Nombre y Apellido

RESOLUCIÓN COMITÉ ETICA HOSPITAL DE CLÍNICAS



HNE
Hospital Nacional de Clínicas
COMITE DE ETICA
N° DE ROPIS
2710

Resolución final

1. Datos y características del estudio

1	Título de la investigación	Caracterización inmunológica de la resistencia o susceptibilidad placentaria ante la infección por Trypanosoma Cruzi, agente causal de la transmisión congénita del Chagas.
2	Institución donde se llevara a cabo el estudio	Instituto de Biología Celular, INICSA - CONICET, FCM - UNC
3	Autoridad responsable de la institución o Director de tesis (según corresponda)	Prof. Dr. Aldo R. Eynard
4	Investigador responsable	Prof. Dr. Ricardo Fretes
5	Tipo de investigación	Investigación básica experimental

2. Resolución final

El CEHNC, en reunión plenaria, ha decidido aprobar el protocolo de referencia registrado según consta en el Libro de Actas de este comité con fecha 27 de agosto de 2015.

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

Se comunica al investigador principal deberá notificar a este Comité:

- o El inicio de la ejecución del estudio dentro de las 72 horas (mediante el formulario correspondiente).
- o Los eventos adversos serios dentro de los 10 (diez) días hábiles de ocurrido el evento.
- o La suspensión o cancelación del estudio de manera inmediata.
- o El reporte de avance anual donde incluirá el estado de progreso del protocolo y cualquier otra situación que modifique el curso de la investigación y/o revista mayor seguridad para los participantes.
- o Las enmiendas al protocolo de manera oportuna y para su aprobación.

Prof. Dra. HILDA L. MONTRUI

Coordinadora del Comité de Ética

CIEH-HNE

Firma del Presidente / Coordinador



PRESENTACIONES A CONGRESOS DE RESULTADOS DE TESIS DOCTORAL

PRESENTACIONES ORALES

XXX Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Protozoología y Enfermedades Parasitarias. SIMPOSIO Internacional de Biología Celular y Molecular de la Enfermedad de Chagas (SAP 2018).

Lugar y fecha: 1 al 3 de noviembre de 2016, Resistencia, Argentina.

Título trabajo: "Trypanosoma cruzi infection in human placentas in vitro ex vivo induces the production of pro-inflammatory cytokines"

Autores: **Benizio, E**; Triquell, MF; Moreira-Espinoza, MJ; Mezzano, L ; Piegari, M; Díaz-Luján, C; Fretes, RE

XXVIII Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Protozoología y Enfermedades Parasitarias. SIMPOSIO Internacional de Biología Celular y Molecular de la Enfermedad de Chagas (SAP 2016).

Lugar y fecha: 26 al 28 de noviembre de 2016, Santa Fe, Argentina.

Título trabajo: "INFECCIÓN POR *Trypanosoma cruzi* EN PLACENTAS HUMANAS IN VITRO EX VIVO INDUCE LA PRODUCCIÓN DE MIF, MMP-9 Y TNF α "

Autores: **BENIZIO, Evangelina**; TRIQUELL, María Fernanda; MOREIRA ESPINOZA, Maria Jose; VARA-MESSLER, Marianela; MEZZANO, Luciana; PIEGARI, Mariana; CORRAL, Ricardo; FRETES, Ricardo; DÍAZ- LUJÁN, Cintia M.

PRESENTACIÓN DE POSTERS

I Congreso Internacional de Avances en Salud Humana

Lugar y fecha: 25 y 26 de octubre de 2018, Villa Maria, Argentina

Título trabajo: "AUMENTO DE LA PRODUCCIÓN MMP-9 Y TNF α EN CULTIVO DE PLACENTAS HUMANAS *IN VITRO EX VIVO* FRENTE A *TRYPANOSOMA CRUZI*"

Autores: **Benizio, Evangelina**; Triquell, María F.; Moreira-Espinoza, María J.; Díaz-Luján, Cintia; Fretes, Ricardo

Reunión conjunta de las sociedades de Biociencias 2017.

Lugar y fecha: 13 al 17 de noviembre de 2017, Buenos Aires, Argentina.

Título trabajo: "EFFECT OF *Trypanosoma cruzi* INFECTION IN TROPHOBLAST CELLS (BEWO CELL LINE)."

Autores: **Benizio, E**; Triquell, MF; Moreira-Espinoza, MJ; Vara-Messler, M; Mezzano, L; Piegari, M; Díaz-Luján, C; Fretes, R.

Publicado en Revista medicina 2017. BUENOS AIRES VOL. 77 Supl. I - 2017. ISSN 1669-9106

SLIMP 2017- Latin American Society for Maternal Fetal Interaction and Placenta.

Lugar y fecha: 11 al 13 de abril 2017, Puerto Varas, Chile.

Título trabajo: “*TRYPANOSOMA CRUZI* INFECTION IN HUMAN PLACENTAS *IN VITRO EX VIVO* INDUCES THE PRODUCTION OF MMP-9 AND PROINFLAMMATORY CYTOKINES”

Autores: **BENIZIO, Evangelina**; TRIQUELL, María Fernanda; MOREIRA ESPINOZA, Maria Jose; VARA-MESSLER, Marianela; MEZZANO, Luciana; PIEGARI, Mariana; CORRAL, Ricardo; FRETES, Ricardo; DÍAZ- LUJÁN, Cintia M.

Publicado en *Placenta*. 2017. 51: 124-125.

DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.placenta.2017.01.089>

VII Jornada de Investigación Científica JIC 2016 (JIC 2016).

Lugar y fecha: 19 de octubre de 2016, Córdoba, Argentina.

Título trabajo: RESPUESTA PRO-INFLAMATORIA FRENTE A INFECCIÓN POR *Trypanosoma cruzi* EN MODELO DE PLACENTAS HUMANAS *in vitro ex vivo*.

Autores: **Benizio, E**; Moreira Espinoza, MJ; Triquell, MF; Mezzano, L; Piegari, M; Díaz-Luján, C; Fretes, R.

Tercer Reunión Conjunta de Sociedades de Biología de la República Argentina

Lugar y fecha: 9,10 y 11 de septiembre de 2015, San Miguel de Tucumán, Argentina.

Título trabajo: Respuesta de células trofoblásticas (línea celular BeWo) en presencia de infección por *Trypanosoma cruzi*.

Autores: **BENIZIO, Evangelina**; MOREIRA ESPINOZA, Maria Jose; TRIQUELL, María Fernanda; MEZZANO, Luciana; PIEGARI, Mariana; DÍAZ-LUJÁN, Cintia; FRETES, Ricardo E.