



**UNIVERSIDAD DE CHILE**

FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS

ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS

DEPARTAMENTO DE MEDICINA PREVENTIVA ANIMAL

**ESTUDIO DEL POSIBLE EFECTO ANTIPARASITARIO DE LA  
PLACENTA HUMANA: *Trypanosoma cruzi* Y DIFERENCIACIÓN  
CELULAR EN UNA LÍNEA CELULAR DE TROFOBLASTO (BeWo)**

**ANA ISABEL LIEMPI MANQUEL**

Memoria para optar al Título  
Profesional de Médico Veterinario.  
Departamento de Medicina  
Preventiva Animal

**PROFESORA GUIA: ULRIKE KEMMERLING, MSc, PhD.**

Financiamiento: Proyectos FONDECYT 1120230 y ANILLO ACT-112

**SANTIAGO, CHILE**

**2014**

## INDICE

RESUMEN .....	1
SUMMARY .....	2
INTRODUCCION .....	3
REVISION BIBLIOGRAFICA .....	4
Antecedentes históricos .....	4
<i>Trypanosoma cruzi</i> .....	4
Ciclo biológico de <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	5
Vías de transmisión.....	6
Epidemiología de la enfermedad de Chagas .....	7
Características clínicas de la enfermedad de Chagas.....	8
Enfermedad de Chagas congénita.....	8
Placenta .....	9
Diferenciación del citotrofoblasto (sincialización) .....	12
Regulación de la diferenciación del trofoblasto .....	14
Modelos de estudio de trofoblasto .....	15
HIPÓTESIS .....	17
OBJETIVO GENERAL .....	17
OBJETIVO ESPECÍFICOS .....	17
MATERIALES Y MÉTODOS.....	18
RESULTADOS .....	24
DISCUSIÓN .....	28
CONCLUSIÓN .....	32
FIGURA 1. Ciclo de vida de <i>Trypanosoma cruzi</i> . .....	33
FIGURA 2. Estimación de la población mundial infectada con <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	34
FIGURA 3. Barrera placentaria .....	35
FIGURA 4. Diferenciación en el trofoblasto .....	36
FIGURA 5. Diferencias morfológicas entre células BeWo y amastigotes de <i>T. cruzi</i> .....	37

FIGURA 6. Procesamiento de las imágenes con DAPI para el conteo automático de células BeWo y parásito intracelulares usando el software MATLAB®.....	38
FIGURA 7. Determinación de células BeWo infectadas y no infectadas a través del uso del software MATLAB®.....	39
FIGURA 8. Cuantificación manual y automática de la infección de células BeWo con <i>T. cruzi</i> .....	40
FIGURA 9. Determinación de la concentración óptima de tripomastigotes <i>T. cruzi</i> en la infección de células BeWo .....	41
FIGURA 10. Determinación del tiempo mínimo de contacto entre células BeWo y tripomastigotes <i>T. cruzi</i> .....	42
FIGURA 11. Determinación del porcentaje de células BeWo infectadas de acuerdo a la cantidad de parásitos intracelulares .....	43
FIGURA 12. <i>T. cruzi</i> aumenta la secreción de hCG- $\beta$ en células BeWo.....	44
FIGURA 13. Bajas concentraciones de <i>T. cruzi</i> induce aumento en la expresión de hCG- $\beta$ en células BeWo .....	45
FIGURA 14. Inmunofluorescencia para hCG.....	46
FIGURA 15. <i>T. cruzi</i> induce fusión en células BeWo, ensayo de fusión de dos colores .....	47
FIGURA 16. <i>T. cruzi</i> induce fusión en células BeWo, análisis de re-distribución de desmoplaquina .....	48
BIBLIOGRAFIA .....	49
ANEXOS .....	58
ANEXO 1 .....	58

## RESUMEN

La enfermedad de Chagas es causada por *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*). Durante la transmisión congénita el parásito alcanza al feto atravesando la barrera placentaria formada por trofoblasto, tejido conectivo fetal y láminas basales. La tasa de transmisión congénita es baja, por lo que podrían existir factores antiparasitarios locales. El trofoblasto, epitelio de revestimiento en contacto con la sangre materna, experimenta proliferación, diferenciación y muerte celular durante su recambio; este proceso es considerado parte de la inmunidad innata. En la presente Memoria de Título, hemos analizado la diferenciación celular del trofoblasto en respuesta al parásito *T. cruzi*.

Para determinar si el recambio epitelial es un mecanismo antiparasitario local, hemos estandarizado la infección con *T. cruzi* en una línea celular de trofoblasto, BeWo. Así, hemos determinado que las condiciones óptimas de infección son por una parte una incubación de 24 horas y concentraciones de parásitos en una relación 1:0,1 y 1:1.

En estas células se analizó la diferenciación celular mediante la determinación de la secreción y expresión de la hormona gonadotrofina coriónica humana mediante espectrofotometría, *Western blot* e inmunofluorescencia. Adicionalmente se analizó la fusión celular mediante ensayo de fusión de dos colores y re-distribución de desmoplaquina. El parásito induce diferenciación celular en el trofoblasto. Estos resultados, juntos con resultados previos realizados en el mismo laboratorio sugieren que *T. cruzi* induce aceleramiento del recambio del trofoblasto, lo que podría constituir un mecanismo antiparasitario local de la placenta humana.

## SUMMARY

Chagas disease is caused by *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*). During congenital transmission, the parasite reaches the fetus breaking the placental barrier formed by the trophoblast, fetal connective tissue and basal laminae. The rate of congenital transmission is low, therefore local antiparasitic factors might exist. The trophoblast, a lining epithelium, is in contact with maternal blood and undergoes proliferation, differentiation and cell death during its turnover. The latter process is considered part of innate immunity. In the present thesis we analyzed the cellular differentiation of the trophoblast in response to the parasite.

To determine if the trophoblast turnover is a local antiparasitic mechanism, we have standardized infection with *T. cruzi* in a trophoblast cell line, BeWo. We conclude, that the optimal conditions for infection with the parasite is: 1) an incubation time of 24 hrs and 2) Parasite:cell ratio of 0.1:1 and 1:1.

Cellular differentiation was performed in the BeWo cells by measuring the secretion and expression of the human chorionic gonadotropin hormone by spectrophotometry, western blotting and immunofluorescence. Additionally, we performed the two-color fusion assay and analyzed desmoplakin re-distribution. The parasite induces cellular differentiation in the trophoblast. These results suggest, together with previous results of our laboratory, that trophoblast turnover could be a local antiparasitic mechanism of the human placenta.

## INTRODUCCION

La enfermedad de Chagas o Tripanosomiasis americana fue descrita por primera vez por Carlos Chagas en 1909 y corresponde a una zoonosis compleja cuyo agente etiológico es el protozoo hemoflagelado *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*).

El parásito posee un ciclo de vida indirecto, cuyos vectores biológicos son insectos hematófagos del género *Triatomidae* (comúnmente conocidas como vinchucas), y los hospederos definitivos son mamíferos, incluido el ser humano. La vía de transmisión más importante es la vectorial. Sin embargo, el parásito también puede transmitirse mediante transfusiones sanguíneas, trasplante de órganos, consumo de alimentos contaminados y por vía placentaria.

En los últimos años la transmisión vectorial ha ido en descenso debido a distintos programas de control de vectores. Por el contrario, las otras formas de transmisión, tal como la congénita, han adquirido cada vez más importancia epidemiológica a pesar de que las tasas de transmisión congénita sean bajas.

La probabilidad de transmisión congénita depende del parásito, del sistema inmune materno y fetal/recién nacido en desarrollo así como de la placenta, siendo este último factor el menos estudiado.

El mecanismo fisiopatológico exacto de la de transmisión congénita es poco conocido. Se sabe que el parásito debe atravesar la barrera placentaria, compuesta por trofoblasto, tejido conectivo fetal, endotelio de los vasos fetales y por las láminas basales que sustentan al trofoblasto y al endotelio fetal.

El trofoblasto es un epitelio que está en contacto con la sangre materna y el primer tejido en contacto con el parásito. Durante el recambio epitelial las células del trofoblasto experimentan proliferación, posterior diferenciación y formación de nodos apoptóticos que se descaman hacia la sangre materna. El recambio epitelial es considerado parte de la inmunidad innata, pero no se ha considerado como posible factor antiparasitario local.

En estudios previos, se demostró que el parásito induce apoptosis en el trofoblasto y otros antecedentes del laboratorio indican que también induce proliferación celular. En esta Memoria de Título se analizó el efecto del parásito sobre la diferenciación celular en una línea celular de trofoblasto.

## REVISION BIBLIOGRAFICA

### Antecedentes históricos

*Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*) es el agente causal de la enfermedad de Chagas o Tripanosomiasis Americana, la que fue descrita en Brasil en 1909 por el Doctor Carlos Chagas. Este destacado médico brasileño descubrió y describió al parásito en sus tres formas morfológicas (tripomastigote, amastigote y epimastigote), al insecto vector y a los hospederos; además detalló las manifestaciones clínicas describiendo la transmisión vectorial e incluso sugirió la posible transmisión congénita de la enfermedad (Chagas, 1909; Clayton, 2010). Esta enfermedad está presente en el continente americano al menos desde el periodo Paleoindio (aproximadamente 9.000 años atrás) (Aufderheide *et al.*, 2004). En Chile, según la evidencia antropológica, se ha documentado la presencia de esta enfermedad en comunidades precolombinas al norte del país hace más de 2.500 años atrás (Rothhammer *et al.*, 1985).

### *Trypanosoma cruzi*

*T. cruzi* es un parásito protozoo hemoflagelado, perteneciente orden *Kinetoplastida*, familia *Trypanosomatidae* y género *Trypanosoma*. Presenta un ciclo de vida indirecto que comprende insectos hematófagos como vectores biológicos, y mamíferos, incluido el hombre, como hospederos definitivos (Chagas, 1909; WHO, 2012). El parásito presenta múltiples diferencias genéticas, biológicas y bioquímicas, por ende se han identificados diferentes cepas y clones que se clasifican en 6 DTUs (*Discrete Units of Typification*) (Zingales, *et al.*, 2009).

El insecto vector de *T. cruzi* pertenece a la subfamilia *Triatominae* (Hemiptera: *Reduviidae*) y se reconocen unas 126 especies, los que se caracterizan por su hábito hematófago (Schfield y Galvão, 2009). En Chile, el principal vector es el *Triatoma infestans* (*T. infestans*), que coloniza viviendas rurales, suburbanas o urbanas describiéndose además otras tres especies con potencial importancia como vectores: *Mepraia spinolai*, *Mepraia parapatrica* y *Mepraia gajardoi* (Frias, 2010). Estos insectos se conocen tradicionalmente como “vinchucas” (WHO, 2010).

Muchas especies de mamíferos son susceptibles a la infección por *T. cruzi*, incluidos animales silvestres, domésticos y el ser humano (Fujita *et al.*, 1994). Los animales domésticos, generalmente, se encuentran cerca o en el interior de las viviendas humanas y constituyen una fuente de alimentación importante para *T. infestans*. Diversos estudios han demostrado que *T. infestans* prefiere alimentarse de la sangre de perros, que son los principales reservorios domésticos del *T. cruzi* debido a de su alta tasa de infección y por presentar parasitemia elevada (Gürtler *et al.*, 2009).

### **Ciclo biológico de *Trypanosoma cruzi***

El ciclo biológico de *T. cruzi* es complejo y comprende tres formas celulares (epimastigote, tripomastigote y amastigote,) presentes en el insecto vector y el hospedero mamífero (**Fig.1**). El tripomastigote sanguíneo, que es la forma infectante no replicativa extracelular, y el amastigote, la forma replicativa intracelular, son encontrados en los hospederos mamíferos; mientras que el epimastigote, forma no infectante replicativa extracelular y el tripomastigote metacíclico infectante para el mamífero se encuentran en el insecto vector (Rassi y Marin-Neto, 2010). Estas formas celulares se identifican por su morfología característica (posiciones relativas del flagelo, kinetoplasto y núcleo) y estado funcional (Prata, 2001; Yoshida, 2006).

**Tripomastigote:** El tripomastigote representa el estado extracelular infectante no replicativo del parásito, se caracteriza por ser fusiforme, medir unos 20  $\mu\text{m}$  largo y 2  $\mu\text{m}$  de diámetro, presentar un kinetoplasto anterior al núcleo. Los tripomastigotes se encuentran en: (a) el sistema circulatorio de los hospederos mamíferos, (b) en el intestino posterior y deyecciones de los triatominos (Prata, 2001; De Souza, 2002; Yoshida, 2006).

**Epimastigote:** El epimastigote es también fusiforme, mide unos 20 – 40  $\mu\text{m}$  de largo y presenta un kinetoplasto anterior al núcleo. Corresponde al estadio extracelular replicativo y no es infectante. El epimastigote se encuentra en el intestino medio del triatomino donde se multiplica, para luego diferenciarse a tripomastigote metacíclico infectante en intestino posterior del mismo (Prata, 2001; De Souza, 2002; Yoshida, 2006).

**Amastigote:** La forma amastigote corresponde a la forma intracelular replicativa en el hospedero mamífero, donde puede experimentar hasta 8-9 divisiones celulares. Es de forma redondeada, de unos 2 micrómetros de diámetro y sin flagelo emergente. El amastigote se diferencia intracelularmente a tripomastigote y como tal provoca la ruptura de la célula hospedera (lisis celular) y entra al torrente sanguíneo para infectar a las células de los órganos blancos o cualquier otra célula nucleada o ser ingerido por un triatomino (Prata, 2001; De Souza, 2002; Yoshida, 2006).

Cuando el insecto triatomino se alimenta de la sangre de un mamífero infectado con *T. cruzi*, los tripomastigotes sanguíneos del mamífero ingresan al tracto digestivo del insecto, y en su intestino medio se diferencian a epimastigotes, éstos a medida que avanzan por el lumen intestinal, se replican y luego se diferencian a tripomastigotes metacíclicos (altamente infectivos). El insecto vector, en el momento de alimentarse de la sangre de un mamífero, deposita sus deyecciones contaminadas con tripomastigotes metacíclicos (Tyler y Engman, 2001) sobre la piel o mucosas del hospedero mamífero. El ingreso al organismo estaría facilitado por las lesiones provocadas por rasguños en la zona de la picadura y por enzimas proteolíticas de la saliva del insecto. Una vez en el organismo del mamífero, los tripomastigotes son fagocitados por células presentadoras de



antígenos (principalmente macrófagos), entre otras células nucleadas, diferenciándose a amastigotes. Tras cierto número de divisiones, los amastigotes se diferencian a tripomastigotes, lisan las células infectadas, ingresan a la circulación e infectan a distintos tejidos blanco, como miocardio, músculo esquelético, músculo liso visceral y células de la glía del sistema nervioso central (Prata, 2001; Kemmerling *et al.*, 2010). Si este mamífero infectado es utilizado como alimento por la misma u otra vinchuca, los tripomastigotes circulantes ingresan al tracto digestivo del insecto vector, completando así el ciclo biológico de *T. cruzi* (**Fig. 1**). La vinchuca parece no ser afectada por la infección del parásito (Rassi y Marin-Neto, 2010).

### **Vías de transmisión**

La transmisión de *T. cruzi* a través de las deyecciones de chinches infectadas es la principal vía de transmisión que se observa en países endémicos. Sin embargo, esta vía de infección ha ido disminuyendo, al igual que la infección por transfusión de sangre y trasplante de órganos de personas infectadas, principalmente por el control de los insectos vectores y los programas de salud pública a través de detecciones serológicas (WHO, 2010; WHO, 2012; OPS, 2006). La transmisión materno-fetal (vertical), que da lugar a la forma congénita de la enfermedad, es en algunas zonas de Latinoamérica más común que la infección causada por el insecto vector (Azogue, 1993; Bittencourt, 1992; Frank *et al.*, 2000; Gürtler *et al.*, 2003).

El riesgo de transmisión de la enfermedad de Chagas por transfusión de sangre de un donante infectado es menor al 20%, además depende de varios factores, como la concentración de parásitos en la sangre del donante, el componente de la sangre transfundida, y la cepa del parásito (Schmunis, 1999; Bern *et al.*, 2008).

En regiones no endémicas de EE.UU. y Canadá, y en algunos lugares de Europa, se han reportados casos de infección a través de transfusiones y trasplantes (Leiby *et al.*, 1999; CDC, 2006). Pero el número puede ser sustancialmente mayor debido al aumento de los inmigrantes desde áreas endémicas de Latino América (Rassi y Marin-Neto, 2010) y a que no todos los países no-endémicos practican el tamizaje del parásito.

Son raros los casos en que *T. cruzi* puede ser adquirido por ingestión de alimentos o líquidos contaminados con el parásito, o a través de accidentes de laboratorio. La transmisión oral de la enfermedad de Chagas a través del consumo de alimentos contaminados, como jugo de caña de azúcar o carne cruda, está asociada generalmente con una infección parasitaria masiva, que se traduce en una presentación aguda severa y de alta mortalidad (Pereira *et al.*, 2009).

## **Epidemiología de la enfermedad de Chagas**

La enfermedad de Chagas presenta una importante morbilidad y mortalidad, además de producir importantes pérdidas económicas (Parker y Sethi, 2011). Actualmente, existen por lo menos 28 millones de personas expuestas al riesgo de la infección, estimándose un total de 10 millones de casos (WHO, 2010; Araújo *et al.*, 2009). Esta patología es, después de la malaria, la enfermedad ligada a vectores de mayor prevalencia y mortalidad (WHO, 2010). En tanto, los casos de Chagas congénito en 2006 fueron 14.385 lo que representa el 35% de los casos nuevos de este año. Por ende, la transmisión congénita adquiere cada vez más importancia epidemiológica (WHO, 2010), siendo parcialmente responsable de la “globalización de la enfermedad de Chagas” (Fig. 2) (Schmunis, 2007).

La enfermedad de Chagas se distribuye en el continente americano, desde el sur de California (Estados Unidos) hasta el centro sur de Chile (Región de Arica y Parinacota hasta la Región del Libertador Bernardo O'Higgins) y de Argentina, ya que esta zona corresponde al hábitat de los vectores biológicos del parásito. Sin embargo, en las últimas décadas, la presencia de la Enfermedad de Chagas en países no endémicos como Canadá, Estados Unidos, Japón, Australia y en los países europeos ha aumentado progresivamente (WHO, 2010). La aparición de esta patología fuera de los países endémicos es el resultado de la movilidad de la población (migraciones, adopciones, turismo desde zonas endémicas) (Schmunis, 2007; Gascon *et al.*, 2010). En estas regiones, el parásito puede transmitirse vía vertical y por la infección mediante transfusión sanguínea o trasplante de órganos. Se estima que más de 10.000 muertes al año son producidas a causa de la enfermedad de Chagas, a esto se suman sus efectos discapacitantes, por lo cual es considerada uno de los principales problemas de Salud Pública en América Latina (Rassi *et al.*, 2006).

En Chile la transmisión vectorial se considera accidental. Sin embargo, se estima que más de 100.000 personas están infectadas (WHO, 2010). La tasa de incidencia de la enfermedad de Chagas se ha mantenido relativamente estable en los últimos años. Un informe del Ministerio de Salud sobre la enfermedad de Chagas en Chile, concluye que la notificación de ésta va en aumento. El aumento de la notificación, se debe a que ésta es obligatoria, al igual que el tamizaje de los donantes, ya que en los países de Cono Sur se ha estimulado la creación de diversos programas de control de la transmisión vectorial y transfusional (MINSAL, 2012).

Las áreas endémicas en Chile incluyen a la Región Metropolitana, donde reside el 67% de la población del país. Aunque es una enfermedad de prevalencia rural y periurbana, la población expuesta en Chile correspondería a 850.000 personas (Apt y Zulantay, 2011; Apt *et al.*, 2008).

### **Características clínicas de la enfermedad de Chagas**

La enfermedad de Chagas se manifiesta en dos fases clínicas (aguda y crónica) pudiendo causar la muerte del individuos en cada una de estas (Apt *et al.*, 2008).

**Fase aguda:** Esta fase comienza inmediatamente después de la inoculación del parásito y es generalmente asintomática. Se caracteriza por una elevada parasitemia (detectable por microscopía directa). Los casos sintomáticos (porcentaje menor de los pacientes) presentan manifestaciones de infección generalizada, edema en la zona de la picadura, también llamado chagoma de inoculación (en seres humanos si es en la zona periorcular, se conoce como signo de Romaña) y miocarditis. Sin tratamiento, el 5-10% de los pacientes sintomáticos muere a causa de encefalomielitis o falla cardíaca severa y, raramente por muerte súbita (Prata, 2001).

**Fase crónica:** El 60-70% de los pacientes no presentan síntomas clínicos evidentes ni tampoco se detecta la presencia de parásitos circulantes. Se caracteriza por la ausencia de evidencia clínico-patológica y generalmente los pacientes presentan un electrocardiograma normal o pequeñas alteraciones en el ritmo cardíaco. Sin embargo, mediante técnicas más sensibles como Holter de ritmo cardíaco o ecocardiografía, se ha descrito que prácticamente la totalidad de los pacientes tienen algún grado de compromiso cardíaco (Punukollu *et al.*, 2007; Rassi y Marin-Neto, 2010; Muñoz-Saravia *et al.*, 2012). A esta etapa también se la denomina fase indeterminada.

El 30-40% de los pacientes crónicos, se vuelven sintomáticos y sufren de alteraciones cardíacas y/o digestivas. Esta sintomatología puede aparecer incluso 10 a 30 años post-infección. El 90% de los pacientes sintomáticos presentan compromiso cardíaco con síntomas y signos derivados de una falla cardíaca conocida como cardiomiopatía chagásica crónica. El 10% restante desarrolla enfermedad digestiva, principalmente mega-esófago y mega-colón, y alteraciones en el sistema nervioso periférico (Muñoz-Saravia *et al.*, 2012).

### **Enfermedad de Chagas congénita**

La enfermedad de Chagas congénita en Chile es cada vez más importante epidemiológicamente, debido a la interrupción de la transmisión por el insecto vector en zonas endémicas y al control de las transfusiones de sangre y trasplantes. Estudios realizados entre 2005-2009 en áreas endémicas de nuestro país indican una prevalencia de la infección con *T. cruzi* en mujeres embarazadas de un 3,4% con una transmisión congénita de 4,7% (Apt, *et al.*, 2013; Garcia, *et al.*, 2001). En el resto de Sudamérica la tasa de infección congénita por *T. cruzi* varía en un rango de 1 a 12% (Apt, *et al.*, 2010; Carlier y Torrico, 2003; Jercic, *et al.*, 2010).

La infección congénita implica una transmisión prenatal *in utero* o una transmisión perinatal (al momento del parto) de parásitos vivos que persisten después del nacimiento. Se excluye la transmisión post-natal de parásitos (principalmente a través de la leche materna), la transmisión de parásitos muertos, DNA parasitario, u otras moléculas liberadas de los parásitos a la madre que pueden ser encontradas en sangre fetal (Carlier y Truyens, 2010).

La transmisión congénita no puede ser prevenida debido a que las drogas disponibles para el tratamiento de la enfermedad de Chagas son teratogénicas (Benznidazole y Nifurtimox) (Castro *et al.*, 2006). Sin embargo, la detección temprana y el tratamiento de los recién nacidos infectados congénitamente alcanzan tasas de cura cercanas al 100% (Apt y Zulantay, 2011; Piat *et al.*, 2009; WHO, 2012). Lamentablemente, como el tamizaje de la enfermedad de Chagas en las mujeres embarazadas y en los recién nacidos no se realiza habitualmente en la mayoría de los países (endémicos y no endémicos) la magnitud de la transmisión congénita de este agente patógeno es un problema de Salud Pública (Gürtler *et al.*, 2003).

Se ha sugerido que mujeres en la fase aguda de la enfermedad de Chagas tendrían mayores probabilidades de transmitir la infección, debido a que una alta parasitemia se asocia a una reducción de la producción de IFN- $\gamma$ . En la fase crónica, la baja parasitemia podría reducir al mínimo las posibilidades de transmisión trans-placentaria (Fragata-Filho *et al.*, 2008). También se ha correlacionado las cepas implicadas, factores placentarios, y la respuesta inmune materna como la del feto en desarrollo con el riesgo de la transmisión congénita de *T. cruzi* (Castillo *et al.*, 2012; Riera *et al.*, 2006). Por ende, actualmente se sugiere, que la enfermedad de Chagas congénita es producto de una interacción compleja entre el parásito, las respuestas inmunes de la madre y el feto/recién nacido, además de la placenta (Castillo *et al.*, 2012; Castillo *et al.*, 2013a; Duaso *et al.*, 2010; Duaso *et al.*, 2011; Duaso *et al.*, 2012), siendo los factores placentarios los menos estudiados.

Durante la infección congénita con *T. cruzi*, el parásito debe atravesar la barrera placentaria para alcanzar el feto (Castillo *et al.*, 2012; Castillo *et al.*, 2013a; Duaso *et al.*, 2011; Duaso *et al.*, 2012; Kemmerling *et al.*, 2010). Es importante destacar, que las bajas tasas de transmisión congénita sugieren la presencia de posibles factores antiparasitarios locales.

## **Placenta**

La placenta es el principal lugar de intercambio de nutrientes y gases entre la madre y el feto (Moore *et al.*, 2008), presenta un rol importante en la síntesis de hormonas, péptidos y esteroides fundamentales para un embarazo exitoso (Syme *et al.*, 2004). La placenta humana es clasificada como hemocorial vellositaria y se compone de una porción fetal desarrollada a partir del corión

frondoso y una porción materna o decidua basal que procede del endometrio (Moore *et al.*, 2008) (**Fig. 3**). La unidad funcional básica de la placenta humana corresponde a la vellosidad coriónica libre, en la cual se encuentra la barrera placentaria formada por el trofoblasto y el estroma vellositario que contiene los vasos fetales y láminas basales que sustentan a los distintos epitelios (trofoblasto y endotelio fetal). El contacto con la sangre materna es a nivel del trofoblasto en el espacio intervelloso (Benirschke *et al.*, 2012) (**Fig. 3A y B**). Posterior a las 20 semanas la placenta sufre adaptaciones que mejoran el intercambio metabólico, las células del citotrofoblasto disminuyen, los núcleos del sinciotrofoblasto se acumulan formando nodos y los capilares fetales se acercan al trofoblasto (Benirschke *et al.*, 2012; Kemmerling *et al.*, 2010). Esta re-estructuración favorece el intercambio metabólico por la formación de delgadas zonas citoplasmáticas sin núcleos y de esta manera la membrana placentaria se transforma en una barrera de menor grosor (Kemmerling *et al.*, 2010; Benirschke *et al.*, 2012; Moore *et al.*, 2008) (**Fig. 3C y D**).

La barrera placentaria actúa solamente como tal cuando las moléculas tienen cierto tamaño, configuración y carga. La mayor parte de los fármacos y otras sustancias presentes en el plasma sanguíneo materno atraviesan esta barrera y pasan a la sangre fetal (Moore *et al.*, 2008).

Se han descrito diversos agentes patógenos que son capaces de atravesar la barrera placentaria e infectar tanto a la placenta como al feto. Entre estos se cuentan virus de la inmunodeficiencia adquirida humana (VIH), hepatitis B y C, varicella zoster, rubéola, parvovirus B19 y citomegalovirus (Koi *et al.*, 2001). También se han descrito otros parásitos, además de *T. cruzi*, entre éstos destacan las infecciones por *Plasmodium falciparum*, agente causal de la malaria (Rogerson *et al.*, 2007), *Schistosoma* (Friedman *et al.*, 2007), *Toxoplasma gondii* (Correa *et al.*, 2007) y *Trypanosoma brucei* (Rocha *et al.*, 2004).

### **Trofoblasto**

El trofoblasto es el tejido más abundante de la placenta humana, y es además el primer tejido que se diferencia durante el desarrollo embrionario. Entre las etapas de mórula y blastocito, el trofoblasto forma una cobertura alrededor del embrión temprano (embrioblasto) (Huppertz y Borges, 2008). El trofoblasto humano se diferencia en dos subtipos: a) Células que invaden el tejido uterino materno y se diferencian a trofoblasto extravellositario, y b) Células que se mantienen unidas a la placenta y se diferencian a trofoblasto vellositario formando el epitelio que cubre las vellosidades placentarias y que forman parte de la barrera placentaria (Kemmerling *et al.*, 2010). El trofoblasto vellositario se compone de dos capas celulares: el sinciotrofoblasto (ST) y el citotrofoblasto (CT). El CT dispone de altas propiedades proliferativas, mientras que el ST diferenciado pierde esta capacidad mitótica y no es capaz de proliferar. El ST es una capa multinucleada que forma la superficie externa de la vellosidad placentaria y se encuentra en

contacto directo con la sangre materna. Esta capa celular es un típico sincicio con membrana plasmática sólo en la parte basal y apical. El ST es continuo y normalmente ininterrumpido, cubriendo todas las ramificaciones de las vellosidades placentarias humanas. Es generado y mantenido por medio de fusión sincicial por incorporación de células del CT (Huppertz y Gauster, 2011). Se ha postulado, que el trofoblasto, como epitelio de revestimiento, forma una barrera física para los patógenos. Por otra parte, el recambio epitelial ha sido considerado parte del sistema inmune innato debido al hecho de que los patógenos previa invasión celular, deben adherirse a la superficie celular. Como estas células son constantemente removidas, los patógenos asociadas a ellas también lo son (Janeway y Traver, 2004). Sorprendentemente, hasta ahora, el mecanismo normal de recambio del trofoblasto no ha sido considerado como un posible mecanismo de defensa contra patógenos y menos contra *T. cruzi*.

**Recambio del Trofoblasto:** El recambio del trofoblasto involucra una coordinación precisa de diferentes procesos celulares que incluyen la proliferación del CT, diferenciación (lo que significa fusión sincicial por incorporación de células del CT a un ST no replicativo y diferenciación de células del CT previo a la fusión con el ST) y muerte celular. La muerte celular en el trofoblasto se evidencia por la formación de nódulos apoptóticos en el ST que son liberados a la sangre materna (Huppertz y Gauster, 2011).

**Proliferación celular:** Las células del CT son las únicas que poseen capacidad proliferativa. Cabe destacar que el crecimiento, expansión y mantención del ST a lo largo del embarazo depende principalmente de la continua incorporación de células del CT al ST (Huppertz y Gauster, 2011). Por lo tanto, la proliferación del CT es fundamental para el recambio del trofoblasto en salud y enfermedad. Resultados de nuestro laboratorio indican que existe un incremento en la proliferación celular del CT en la infección de explantes de vellosidades con *T. cruzi*, particularmente en células bajo las áreas donde el ST se ha separado y destruido (Duaso *et al.*, 2012).

**Apoptosis:** En el trofoblasto, la diferenciación celular y la muerte celular por apoptosis se encuentran estrechamente relacionadas (Drewlo *et al.*, 2008; Huppertz y Gauster, 2011). Aunque parezca paradójico, hay fuerte evidencia de que caspasas iniciadoras, especialmente la caspasa-8, se encuentran involucradas no sólo en apoptosis, sino también en diferenciación de diversos tipos celulares y tejidos.

La muerte celular programada en el trofoblasto presenta la mayoría, pero no todas las características clásicas de la apoptosis. La diferencia más destacada entre la “apoptosis clásica” y la “apoptosis del trofoblasto” es que en el último, es un proceso prolongado de apoptosis (tres a cuatro semanas) (Huppertz y Gauster, 2011).

Interesantemente, distintos patógenos, incluido *T. cruzi* (en bajas concentraciones), inducen apoptosis en la placenta, especialmente en el trofoblasto (Duaso *et al.*, 2011).

### **Diferenciación del citotrofoblasto (sincialización)**

La formación y la mantención del ST es esencial durante todo el embarazo, siendo necesario para una implantación embrionaria exitosa, transporte de oxígeno y nutrientes, y la secreción de hormonas específicas necesarias para el desarrollo fetal, entre otros (Malassinè y Cronier, 2002). Variados estudios han demostrado que para el mantenimiento de un embarazo saludable se requiere una estricta coordinación y control adecuado de la fusión sincicial. Alteraciones y, especialmente, la desregulación de la fusión sincicial en el trofoblasto se puede relacionar directamente con condiciones patológicas tales como la restricción del crecimiento intrauterino y la pre-eclampsia (Huppertz *et al.*, 2002). El mantenimiento funcional y morfológico del ST durante todo el embarazo depende completamente de la fusión continua de células del CT con el ST. Esta fusión de células implica una secuencia coordinada de eventos, que conduce a la salida del ciclo celular, la desintegración de las membranas celulares, y la incorporación del citoplasma, núcleo y organelos al sincicio (Gauster y Huppertz, 2010). A pesar de que el proceso de fusión es fundamental para el crecimiento de la placenta, se sabe poco acerca de su control, algunos autores postulan que la regulación de la sincialización proviene del ST y/o de las células CT e incluso se postula que podría ser por otras células como los macrófagos presentes en el estroma vellositario (Benirschke *et al.*, 2012).

Durante este proceso, las células del CT en proceso de fusión se separan de la membrana basal. Aunque los mecanismos moleculares exactos que sustentan y regulan la fusión del trofoblasto aún no se entienden completamente, se sabe que el aumento en los niveles de adenosina de monofosfato cíclico (AMPC) y la activación de la proteína quinasa A (PKA) son fundamentales para inducir la fusión (Cronier, *et al.*, 1997). En la fusión de células del CT con el ST participan múltiples factores dentro de los cuales se cuentan proteínas fusogénicas, proteasas y proteínas del citoesqueleto, así como también citoquinas, hormonas y factores de transcripción (Benirschke *et al.*, 2012; Gauster y Huppertz, 2010). Entre los factores considerados como marcadores de diferenciación o marcadores de fusión se destacan:

(a) Proteínas de la familia de las Sincitinas, que son codificadas por genes fusogénicos de retrovirus endógenos humanos (Sincitina-1 es codificada por el gen HERV-W y Sincitina-2, por HERV-FRD) (Mi, *et al.*, 2000).

(b) Factor de transcripción GCM-1 (*Glial Cell Missing Homolog-1*), que es un factor de transcripción específico de la placenta, se ha demostrado que está directamente relacionado con el inicio de la fusión del trofoblasto, regulando la expresión de las sincitinas. Al mismo tiempo, la actividad de

GCM-1 sólo se inicia cuando una célula del CT ha abandonado el ciclo celular. Así, la actividad GCM-1 se correlaciona negativamente con la proliferación del trofoblasto (Baczyk, *et al.*, 2009).

(c) Proteínas de membrana: La presencia de uniones comunicantes “nexo” (*Gap Junction*) se considera como un requisito previo a la sincialización del trofoblasto. Las uniones nexa son grupos de canales de transmembrana compuestas de hexámeros de conexinas (Cx), que proporcionan una vía para la difusión de los iones y moléculas pequeñas tales como cAMP, cGMP, inositol trifosfato y  $Ca^{2+}$ . En el trofoblasto se ha demostrado la expresión de mRNA de la Cx43 así como su localización entre células del CT y entre las células del CT y ST. Adicionalmente, la inhibición de la expresión de Cx43 detiene la fusión celular en cultivos primarios trofoblasto (Frendo, *et al.*, 2003). Una vez formado el sincicio las uniones comunicantes y proteínas de las uniones adherentes tales como desmoplaquina y E-cadherina son degradadas. Por lo tanto, la desaparición de estas proteínas de membrana son considerados marcadores de fusión (Douglas y King, 1990).

(d) Marcadores bioquímicos: la producción de la hormona gonadotrofina coriónica humana (hCG) ocurre únicamente en el ST. Es una glicoproteína compuesta de una subunidad alfa ( $\alpha$ -hCG), que es común con las gonadotropinas de la pituitaria, tales como LH, FSH y TSH, siendo la subunidad beta ( $\beta$ -HCG) la que confiere la especificidad biológica a esta hormona (Handsuh *et al.*, 2007). La mantención del embarazo durante el primer trimestre depende de la síntesis de la hCG, que impide la regresión del cuerpo lúteo, lo que permite el mantenimiento de la secreción de progesterona ovárica. La hCG aumenta su propia síntesis en una forma autocrina mediante la inducción de la formación de ST a través del receptor de LH/CG y PKA dependiente de cAMP (Cronier *et al.*, 1997). La secreción de hCG y de lactógeno placentario (hPL) son los principales marcadores bioquímicos de la diferenciación de trofoblasto *in vitro*.

La fusión de las células del trofoblasto se comprueba generalmente mediante la demostración de la desaparición de la desmoplaquina y/o midiendo la liberación de producto del ST, como la hCG (Drewlo *et al.*, 2008),

Por el contrario, el factor de necrosis tumoral (TNF- $\alpha$ ) (Leisser *et al.*, 2006), así como factor de crecimiento transformante beta (*Transforming Growth Factor beta*, TGF- $\beta$ ) disminuyen la formación de sincicio en explantes de vellosidades coriónicas *ex vivo* e inhibe la secreción de hCG y hPL (Huppertz y Gauster, 2011; Huppertz *et al.*, 2002).

Una de las señales iniciadoras de fusión es la activación de la caspasa-8, proteasa cisteína-aspartato específica y que tiene un rol crucial en la cascada de la apoptosis, actuando como iniciador. La activación inicial de la caspasa-8 tiene lugar en células del CT justo antes de la fusión (**Fig. 4A**), se mantiene activa durante un corto tiempo y luego se vuelve inactiva (Huppertz y Gauster, 2011). Una de las funciones asociadas a la caspasa-8 es la escisión de las proteínas del citoesqueleto, como la alfa-fodrina (Gauster *et al.*, 2010). La alfa-fodrina es un constituyente



importante del citoesqueleto sub-membranoso, que se localiza en las membranas de las células apicales y laterales de células CT, pero no en el ST (**Fig. 4A**). La escisión de la alfa-fodrina permite la reorganización del citoesqueleto mediante el aumento de la movilidad de sus componentes y consiguiente reducción de la tensión en la membrana (Gauster y Huppertz, 2010). Por otra parte, la activación de la caspasa-8 media la traslocación de la fosfatidilserina (PS) desde la cara interna a la cara externa de la membrana plasmática (**Fig. 4A**). La PS es el fosfolípido más abundante en la membrana plasmática que, en circunstancias normales, predomina (casi en un 100%) en la cara interna de la célula (Daleke, 2007). La exposición de PS en la cara externa de la membrana plasmática no sólo se ha asociado al proceso de muerte celular tipo apoptosis sino también a la fusión celular (Gauster y Huppertz, 2010). La remodelación del citoesqueleto por parte de caspasas (inicialmente caspasa-8, luego caspasas efectoras 3, 6 ó 7) junto con la expresión de proteínas fusogénicas, causarían la formación de un poro de fusión entre el CT y el ST suprayacente (**Fig. 4B**). A partir de esto, los componentes celulares del CT como el núcleo, organelos y las proteínas citoplasmáticas, son incorporadas al ST. Posteriormente, la actividad de la caspasa-8 es inhibida por la acción de proteínas anti-apoptóticas (**Fig. 4C**) como Bcl-2 (*B-cell lymphoma-2*) y MCL-1 (*Myeloid Cell Leukemia sequence-1*), que se expresan en el ST a lo largo de la gestación (Gauster y Huppertz, 2010; Huppertz y Gauster, 2011). La caspasa-8 activa también es modulada por c-Flip (*celular FLICE inhibitory protein*). Este inhibidor está presente en dos variantes y actúa directamente sobre la caspasa-8, induciendo la activación o inhibición de la misma (Chang *et al.*, 2002). Por lo tanto, en el ST la caspasa-8 disminuye su actividad después de la fusión sincicial por acción de bcl-2 y c-Flip.

### **Regulación de la diferenciación del trofoblasto**

Hay muchos factores que han sido identificados a través de experimentos *in vitro* utilizando cultivos primarios de CT o de líneas celulares como son las células BeWo (línea celular de coriocarcinoma humano). Diversos agentes tales como el Factor de crecimiento epidérmico (EGF), Factor Estimulante de Granulocitos y macrófagos, glucocorticoides, forskolina, estradiol, y la hCG todos pueden estimular la diferenciación *in vitro* de CT (Cronier *et al.*, 1998). Por el contrario, el TGF  $\beta$ -1, endotelinas (Morrish *et al.*, 1991) y el Factor Inhibidor de la Leucemia (LIF) (Nachtigall *et al.*, 1996) inhiben este proceso. Los factores que promuevan la diferenciación activan a PKA, vía fundamental para la inducción de la diferenciación del trofoblasto. Así, la administración de forskolina induce la fusión celular y la expresión de GCM-1 factor de transcripción en las células BeWo (Knerr *et al.*, 2005). En otros estudios (Daoud *et al.*, 2005), las proteínas quinasas activadas por mitógeno (*Mitogen-Activated Protein Kinases*, MAPKs), juegan un papel importante en la iniciación de la diferenciación del trofoblasto y la fusión, en las que incluyen las quinasas reguladas por señales extracelulares (*Extracellular Signal Regulated Kinases*, ERK1 y ERK2), además de la

proteína 38 (p38). En cambio, inhibidores específicos de ERK1/2 y de p38 alteran la diferenciación y sincialización en cultivos primarios de trofoblasto.

Interesantemente, bajas concentraciones de *T. cruzi* activan a ERK1/2 MAPK en explantes de vellosidades coriónicas placentarias humanos y con una alta concentración se inhibe esa vía MAPK (Castillo *et al.*, 2012; Castillo *et al.*, 2013a), lo que sugiere que una condición que se asemeja a la enfermedad de Chagas crónica estimula el recambio celular del trofoblasto. Por otra parte, experimentos que se asemejan a la infección aguda por *T. cruzi* demuestran que éste induce un daño a los tejidos, compatible con la observación clínica de extensa necrosis en la placenta (Duaso *et al.*, 2010), lo que aumentaría la probabilidad de infección congénita.

### **Modelos de estudio de trofoblasto**

Los sistemas más comúnmente utilizados para estudiar la biología del trofoblasto son: cultivos primarios de trofoblasto (Drewlo *et al.*, 2008), explantes de vellosidades coriónicas placentarias humanas (Duaso *et al.*, 2010) y líneas celulares, específicamente la línea celular BeWo (ATCC™ CCL-98) (Drewlo *et al.*, 2008; Huppertz y Gauster, 2011).

Los cultivos primarios de trofoblasto requieren placentas de primer trimestre y corresponde al sistema menos usado. Primero, hay un acceso limitado al tejido ya sea por la escasez de muestras o por impedimentos legales, especialmente en nuestro país. Segundo, el cultivo de éstas células primarias es de difícil manejo debido a la presencia de una población celular heterogénea; adicionalmente solo un pequeño número de células puede ser obtenida y presentan una vida limitada en cultivo (Drewlo *et al.*, 2008).

Contrariamente, explantes de vellosidades coriónicas placentarias humanas de placentas de término pueden ser mantenidas en cultivo por varios días y son un excelente modelo *ex vivo* (Duaso *et al.*, 2011; Fretes y Kemmerling, 2012), donde las células constituyentes están en condiciones más fisiológicas que sus homólogas aisladas. (Duaso *et al.*, 2011; Fretes y Kemmerling, 2012).

Por otro lado, la línea celular trofoblástica BeWo puede ser manipulada y mantenida en una etapa no diferenciada (CT). Éstas células pueden ser inducidas a experimentar diferenciación y fusión dentro de 48 a 72 horas por la adición de forskolina o AMPc al medio de cultivo (Drewlo *et al.*, 2008). Durante el proceso de fusión, las células BeWo muestran un incremento en la expresión de la mayoría de los marcadores de sincialización como Sincitina-1, GCM-1, hCG y otros, como también una disminución en la expresión de moléculas de adhesión celular como la desmoplaquina

y E-cadherina (Drewlo *et al.*, 2008). Es importante destacar que las células BeWo pueden ser infectadas *in vitro* con tripomastigotes de *T. cruzi* (Dolcini *et al.*, 2008).

Sin embargo, las condiciones óptimas para la infección por *T. cruzi* de las células BeWo deben ser establecidas ya que en estudios previos (Dolcini *et al.*, 2008) se utilizó una concentración muy alta de parásitos por célula. Por ello, es necesario determinar tanto la concentración mínima de parásitos a usar, así como el tiempo óptimo de contacto entre tripomastigotes y células BeWo para lograr una infección exitosa y reproducible

En base a los antecedentes expuestos, es esperable que durante la infección, con bajas concentraciones de parásitos, en células BeWo se induzca la diferenciación de ellas, lo que podría representar un incremento en el recambio del trofoblasto, lo que a su vez podría formar parte de los posibles mecanismos antiparasitarios locales.

## **HIPÓTESIS**

La infección con bajas concentraciones de *Trypanosoma cruzi* en la línea celular humana de coriocarcinoma (BeWo) induce su diferenciación

## **OBJETIVO GENERAL**

Estudiar el efecto del *Trypanosoma cruzi* sobre la diferenciación (sincialización o fusión) de células del trofoblasto.

## **OBJETIVO ESPECÍFICOS**

- 1) Determinar las condiciones óptimas de infección de células BeWo con tripomastigotes de *T. cruzi*.
- 2) Determinar el efecto de tripomastigotes de *T. cruzi* sobre la diferenciación de células del trofoblasto.

## MATERIALES Y MÉTODOS

**Cultivo de células Vero®:** Células Vero® (fibroblasto de riñón de mono verde africano (*Cercopithecus aethiops*) ATCC® CCL-81™) fueron cultivadas en frascos de cultivo celular de 75 cm<sup>2</sup> (250 ml) con medio de cultivo Roswell Park Memorial Institute 1640 (RPMI 1640, Gibco®) suplementado con bicarbonato de sodio (NaHCO<sub>3</sub>) 2mg/ml, estreptomycin 50µg/ml, penicilina 50 UI/ml y enriquecido con suero fetal bovino (SFB) al 10% para crecimiento o al 5% para mantenimiento a 37°C en un ambiente húmedo con 5% de CO<sub>2</sub>, reemplazando el medio cada 24 o 48 horas (Salas *et al.*, 2008)

**Obtención de tripomastigotes de *T. cruzi*:** Tripomastigotes cepa Ypsilon (Y) de *T. cruzi* fueron obtenidos desde cultivos de células Vero® infectadas con el parásito. Las células Vero® fueron cultivadas como se describió anteriormente y se esperó a que se encontraran en semi-confluencia, para posteriormente ser infectadas con 1 a 2 ml de medio con tripomastigotes provenientes de un cultivo anterior. Luego de 4-5 días se recolectó el medio de cultivo con tripomastigotes y se centrifugó a 500 g por 5 minutos para separar las células en suspensión. El centrifugado se dejó en reposo durante 30 minutos a 37°C de modo que los tripomastigotes asciendan hacia el sobrenadante. Este sobrenadante fue recolectado y centrifugado a 3.000 g durante 10 minutos a fin de obtener en el sedimento las formas infectivas de *T. cruzi*. Los tripomastigotes fueron re-suspendidos en medio RPMI y el número de células se determinó en una cámara de Neubauer (Duaso *et al.*, 2010).

**Cultivo de células BeWo:** Células BeWo (coriocarcinoma humano ATCC® CCL-98™) fueron cultivadas en frascos de cultivo celular de 75 cm<sup>2</sup> (250 ml) con medio Dulbecco's Modified Eagle Medium F-12 (DMEM/F-12, Gibco®) suplementado con 1,2mg/ml de NaHCO<sub>3</sub>, 50µg/ml de estreptomycin, 50 UI/ml de penicilina y enriquecido con SFB inactivado (carente de proteínas del complemento por calor a 56°C durante 30 minutos) al 10% incubadas a 37°C en un ambiente húmedo con 5% de CO<sub>2</sub> (Drewlo *et al.*, 2008). Para realizar los experimentos, las células BeWo fueron cosechadas por tripsinización, sedimentadas y re-suspendidas en medio de cultivo fresco. Luego fueron sembradas sobre cubreobjetos redondos en multiplacas de 24 pocillos con medio de cultivo DMEM/F-12 suplementado y enriquecido con SFB inactivado al 10%. Para inducir la diferenciación, las células BeWo fueron tratadas con forskolina 50µM. El número de células necesarias para cada experimento fue determinado mediante el conteo directo en una cámara de Neubauer (Drewlo *et al.*, 2008).

**Tinción nuclear DAPI para la detección microscópica de parásitos:** Las muestras en los cubreobjetos redondos fueron rociadas con fijador celular (Citospray C.C.G®), incubadas en concentraciones decrecientes de etanol (100%, 70% y 50%) por 5 minutos cada vez, seguido de 3

lavados con una solución buffer salina (PBS: NaCl 135 mM, KCl 2,7 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 10 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,8 mM) por 5 minutos entre cada concentración de etanol. Para luego ser teñidas con colorante nuclear DAPI (4',6- diamidino-2-fenilindol dicloridrato, Molecular Probes®, a una concentración de 1 µg/ml e incubado a temperatura ambiente por 5 minutos, seguido de 3 lavados con PBS por 5 minutos, luego se le agregó una gota de medio de montaje acuoso para fluorescencia VECTASHIELD® a cada muestra. Las muestras fueron observadas en un microscopio de epifluorescencia (Motic BA310; Hong Kong, China). Las imágenes fueron capturadas, en diferentes campos al azar, con la cámara acoplada al microscopio (Moticam 5, Hong Kong, China). Los parásitos fueron reconocidos por su diferencia de tamaño, morfología nuclear y presencia de núcleo y kinetoplasto (**Fig. 5**).

**Determinación de la concentración óptima de tripomastigotes *T. cruzi*:** Se sembraron 10<sup>5</sup> células BeWo por pocillo, a las 3 horas post-siembra se infectaron con tres concentraciones diferentes de tripomastigotes a una razón de células BeWo: tripomastigotes de 1:0,01; 1:0,1 y 1:1, además de un control sin infectar, las que fueron incubadas a 37°C en un ambiente húmedo con 5% de CO<sub>2</sub> por 48, 72 y 96 horas. Luego fueron fijadas y teñidas con DAPI, como fue descrito anteriormente. La captura de imágenes fue realizada al azar en cada condición a través de microscopía de fluorescencia, y posteriormente fueron analizadas a través del método de conteo automático MATLAB®.

**Determinación del tiempo óptimo de contacto de células BeWo con tripomastigotes de *T. cruzi*:** Se sembraron 10<sup>5</sup> células BeWo, a las 3 horas post-siembra fueron infectadas con dos concentraciones de tripomastigotes (BeWo: *T. cruzi* de 1:0,1 y 1:1) además de un control sin infectar, con un tiempo de interacción entre células y parásitos de 2, 4, 6, 12 y 24 hrs, al concluir cada tiempo de infección las muestras fueron lavadas para posteriormente adicionarle medio de cultivo fresco. Las muestras fueron analizadas a las 48 horas post-infección. Luego se fijaron y se teñieron con DAPI, según el protocolo mencionado anteriormente. La captura de imágenes fue realizada al azar en cada condición a través de microscopía de fluorescencia, y posteriormente fueron analizadas a través del método de conteo automático MATLAB®.

**Análisis de la infección mediante el uso del software MATLAB®:** Las imágenes obtenidas de los experimentos de determinación de concentración y tiempo óptimo procesadas con DAPI, fueron analizadas y evaluadas usando el software MATLAB®, los algoritmos fueron diseñados, a través de diferentes ensayos para este fin por los Dres. Steffen Härtel y Mauricio Cerda (Laboratorio SCIAN; Programa de Anatomía y Biología del Desarrollo, Instituto de Ciencias Biomédicas, Facultad de Medicina, Universidad de Chile), siguiendo los parámetros establecidos por la morfología y el tamaño de los núcleos celulares y parasitarios.

Conteo automático de núcleos células BeWo: Las imágenes originales fueron capturadas en formato “.tiff”, todas con el mismo formato y calidad (píxeles) (**Fig. 5**). Estas imágenes fueron transformadas a una escala de grises (**Fig. 6A**), aumentando el contraste (**Fig. 6B**) y binarizadas (**Fig. 6C**). Para el conteo de las células BeWo, los “objetos pequeños” (en este caso los amastigotes intracelulares) fueron eliminados digitalmente (**Fig. 6D**). Se aplicó al algoritmo *watershed* (Gudla *et al.*, 2008; Nandy *et al.*, 2011) del software MATLAB® (**Fig. 6E**) que separa las “cuencas” entre dos objetos muy cercanos y permite contabilizar a los núcleos (**Fig. 6F**). Posteriormente fueron cuantificados los parásitos intracelulares, los “objetos grandes” (en este caso los núcleos de las células BeWo) fueron eliminados digitalmente (**Fig. 6G**). Los parásitos se identificaron por la presencia de núcleo vecino al kinetoplasto que presenta una tinción muy brillante. Se calculó la varianza local (diferencia de tamaño y brillo) (**Fig. 6H**) y los parásitos fueron contabilizados (**Fig. 6I**). Para asignar a los parásitos a las distintas células BeWo se aplicó al “diagrama Voronoi” (**Fig. 7**) (Wakamatsu *et al.*, 2011; Yu *et al.*, 2010). Se consideró como células infectada, una célula con al menos 3 amastigotes perinucleares (**Fig. 7B**). Lo que permitió construir índices de número de células infectadas, no infectadas y además determinar la cantidad de parásitos por células infectada.

Adicionalmente se analizaron las mismas imágenes en forma manual y comparó con el análisis automático. El análisis demostró que no existen diferencias significativas entre ambos métodos (coeficiente de correlación  $r^2$  de 0,9159) (**Fig. 8**), siendo el análisis automático mucho más eficiente e independiente de variables humanas (operador, cansancio, etc.).

#### **Inducción de diferenciación de células BeWo infectadas con tripomastigotes de *T. cruzi*:**

Para cada experimento se sembraron  $10^5$  células BeWo por pocillo en multiplacas de 24 pocillos, a las 3 horas post-siembra fueron infectadas con las dos concentraciones de BeWo: *T. cruzi* (1:0,1 y 1:1) y tratadas en presencia y ausencia de forskolina 50  $\mu$ M (Sigma®) control positivo y negativo de fusión celular respectivamente (Drewlo *et al.*, 2008) a 37°C en un ambiente húmedo con 5% de CO<sub>2</sub>. Las muestras fueron procesadas 48 hrs post-infección. La sincicialización fue determinada mediante ensayo de fusión de dos colores, re-distribución de desmoplaquina, así como expresión y secreción de hCG.

- a) Determinación de fusión de células BeWo infectadas con tripomastigotes *T. cruzi* mediante ensayo de fusión de dos colores: Células BeWo fueron cosechadas por tripsinización, sedimentadas a 800 x g, y posteriormente re-suspendidas en medio DMEM/F-12 suplementado libre de SFB. Las células fueron cuantificadas y separados en dos tubos con una concentración de  $10^6$  células/ml, agregando un tipo colorante vital por tubo: CellTracker™ CMFDA Green 10  $\mu$ M/ml (5- Chloromethylfluorescein Diacetatey (verde)) y CellTracker™ CMTMR Orange (5- (and -6) - ((4-Chloromethyl) Benzoyl) Amino) Tetramethylrhodamine (rojo)) 10  $\mu$ M/ml (Molecular Probes®). Luego se incubaron por 20 minutos a 37°C en oscuridad, a continuación se

centrifugó a 800 x g por 5 minutos removiendo el sobrenadante y las células fueron re-suspendidas en 5 ml DMEM/F-12, repitiendo este proceso 3 veces. Después del último lavado se re-suspendió en medio DMEM/F-12 suplementado y enriquecido con SFB inactivo al 10% a una concentración de  $10^5$  células/ml, siendo inmediatamente sembradas  $10^5$  células por pocillo ( $5 \times 10^4$  células con CellT verde y  $5 \times 10^4$  teñida con CellT rojo) en multiplacas de 24 pocillos (Drewlo *et al.*, 2008).

Las células fueron fijadas con formalina al 4% durante 10 minutos, y lavadas 3 veces con PBS durante 5 minutos. Luego fueron teñidas con el colorante nuclear DAPI usando el método descrito anteriormente, y preservadas con medio para fluorescencia VECTASHIELD®. La obtención de imágenes se realizó al azar usando un microscopio de fluorescencia con 3 canales de fluorescencia, para la tinción nuclear se usó canal DAPI (azul) (nivel de emisión/excitación de 460/360 nm); para las células teñidas con el colorante rojo (nivel de emisión/excitación de 541/565 nm) se utilizó el canal TRIC-C (rojo) y para las células con el colorante verde (nivel de emisión/excitación de 492/517 nm) se utilizó el canal FITC-C (verde), obteniendo 3 imágenes del mismo campo.

La fusión fue evidenciada mediante la presencia de doble fluorescencia del citoplasma de las células (fluorescencia rojo y verde) al realizar la superposición digital, mientras que la ausencia de fusión intercelular se observó por la falta de colores mezclados. La confirmación de la fusión celular se determinó adicionalmente por la detección de 2 o más núcleos en zonas de doble fluorescencia (Drewlo *et al.*, 2008). El análisis se realizó con el software MATLAB®, estableciendo como parámetros el diámetro de los núcleos en píxeles (8 píxeles), la distancia mínima entre núcleos cercanos (20 píxeles) y como fracción mínima de superposición de ambos colores superior al 50%, para ser considerado como fusión, obteniéndose la cantidad de fusiones celulares y el número total de núcleos celulares.

- b) Determinación de fusión de células BeWo infectadas con tripomastigotes mediante detección de la re-distribución de desmoplaquina por inmunofluorescencia: Las muestra fueron fijadas con metanol frío (-20°C) por 10 minutos, luego lavadas con PBS 3 veces por 5 minutos, enseguida se procedió a incubar con el anticuerpo anti-desmoploquina (CBL173, Millipore®) a una dilución 1:10 por 12 horas a 4°C. Posteriormente, se retiró el anticuerpo primario lavando 3 veces con PBS. El complejo antígeno-anticuerpo fue detectado mediante un anticuerpo secundario fluorescente verde anti-conejo IgG 1:100 (VECTOR®). Como control se sustituyó el anticuerpo primario con PBS. El contraste nuclear se realizó mediante tinción nuclear con Yoduro de Propidio (1mg/ml) por 5 minutos para luego ser lavadas 3 veces con PBS y preservadas con medio de montaje para fluorescencia VECTASHIELD®. Las imágenes fueron capturadas al azar en el canal de fluorescencia TRIC-C (rojo) para la tinción nuclear y FIT-C (verde) para la inmunodetección de la desmoplaquina (Drewlo *et al.*, 2008). Se efectuó el análisis de fusión



celular realizando la superposición de las imágenes del mismo campo usando el software *ImageJ*. El conteo de núcleos celulares y la fusión de membrana se realizó de manera manual.

- c) Determinación de fusión de células BeWo infectadas con tripomastigotes *T. cruzi* mediante cuantificación de secreción de hCG: La hormona fue evidenciada mediante la inmunodetección de hCG en el sobrenadante a las 2, 24 y 48 horas post-infección. El sobrenadante fue centrifugado a 1000 x g durante 15 minutos para eliminar detritus celular y parásitos. La detección de hCG se realizó mediante un ensayo ELISA con el kit  $\beta$ -hCG ELISA (DRG Diagnostics®) según instrucciones del fabricante y los valores de densidad óptica fueron obtenidas mediante un espectrofotómetro de placa a 450 nm (Varioskan Flash, Thermo Scientific®).
- d) Determinación de diferenciación de células BeWo infectadas con tripomastigotes *T. cruzi* mediante la detección de hCG por inmunofluorescencia: Las muestra fueron fijadas con metanol frío (-20°C) por 10 minutos, luego lavadas con PBS 3 veces por 5 minutos, enseguida se procedió a incubar con el anticuerpo anti-hCG $\beta$ , (hCG-61:sc-51606 Santa Cruz Biotechnology, Inc. ®) una dilución 1:100 por 12 horas a 4°C según instrucciones del fabricante. Posteriormente, se retiró el anticuerpo primario, lavando 3 veces con PBS, el complejo antígeno-anticuerpo fue detectado utilizando un anticuerpo secundario fluorescente verde anti-ratón IgG 1:100 (VECTOR®). Como control se sustituyó el anticuerpo primario con PBS. El contraste nuclear se realizó por tinción nuclear con Yoduro de Propidio (1mg/ml) por 5 minutos para luego ser lavadas 3 veces con PBS y preservadas con medio de montaje para fluorescencia VECTASHIELD®. Las imágenes fueron capturadas al azar en el canal de fluorescencia TRIC-C (rojo) para la tinción nuclear y FIT-C (verde) para la localización de la hCG.
- e) Detección de la expresión de hCG mediante Western blot: Las células fueron cosechadas a las 48 horas post-infección en 300  $\mu$ L de buffer RIPA (Tris 50mM, NaCl 150 mM, SDS 0.1 %, Deoxicolato de Na 0.5 %, Tritón X 100 1%, 1mM PMSF, inhibidor de proteasas Complete Mini Roche®) a 4° C, fueron agitadas a velocidad máxima por 1 minuto, el homogenado fue centrifugado a 15.000 x g por 15 minutos para remover detritus celulares. La cantidad total de proteína fue cuantificada mediante el kit *BCA protein assay* (Thermo scientific®) según las instrucciones del fabricante. Los sobrenadantes de los lisados fueron diluidos en un buffer de carga denaturante (glicerol 10%, dodecil sulfato de sodio (SDS) 4,5%,  $\beta$ -mercaptoetanol 5%, 62,5 mM Tris-HCL (pH 6,8) 1,5 mM EDTA y 0,1% azul de bromofenol) y hervidos durante 5 minutos. Las proteínas fueron separadas en geles por SDS-PAGE al 10% y luego transferidas a membranas de Nitrocelulosa (Milipore Corp.®) durante 2 horas a 100V. Se utilizó 50  $\mu$ g de proteínas para la detección de hCG. Las membranas se bloquearon durante dos horas a

temperatura ambiente con PBS *Tween*-BSA 5% para evitar marcaciones inespecíficas. Posteriormente, las membranas fueron incubadas con el anticuerpo primario anti-hCG $\beta$ , (hCG-61:sc-51606 Santa Cruz Biotechnology, Inc.®) durante toda la noche a 4°C. Al día siguiente, las membranas fueron lavadas tres veces durante 10 minutos con PBS *Tween* (PBS-T) e incubadas con el anticuerpo secundario conjugado con *Horseradish peroxidase* (HRP) durante 60 minutos. Las proteínas inmunoreactivas fueron detectadas mediante quimioluminiscencia según las instrucciones del fabricante (*Western Blotting Luminol Reagent*: sc-2048, Santa Cruz Biotechnology, Inc.®). Posteriormente las membranas se incubaron en una solución de *stripping* (62,5 mM Tris-HCl, pH 6,8, 2% SDS y 50mM  $\beta$ -mercaptoetanol) a 50°C durante 30 minutos, para desprender los anticuerpos de la membrana. Después las membranas fueron lavadas 3 veces durante 10 minutos en PBS-T, bloqueadas en PBST-BSA 5%, incubadas con el anticuerpo primario para la proteína Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH (10B8): sc-51905, Santa Cruz Biotechnology, Inc. ®) durante toda la noche a 4°C como control de carga (Castillo *et al.*, 2012). El tratamiento para la detección de GAPDH fue el mismo que el descrito anteriormente.

Las películas fueron digitalizadas en un sistema automático de barrido y se utilizó el programa *ImageJ* para el análisis densitométrico de las bandas. Los resultados se expresaron como la razón de hCG versus GADPH. Se normalizaron a 1 los valores de la razón hCG con los controles en los distintos *blots* de cada experimento y se expresaron los datos de las distintas condiciones experimentales en relación con sus controles respectivos.

**Análisis estadístico:** Cada experimento fue realizado en triplicado y al menos en tres oportunidades distintas. Los resultados se expresaron como promedio más desviación estándar o error estándar según corresponda. Las variables múltiples se analizaron mediante ANOVA *two-way* seguido por *Dunnett's post-test* (compara todas las columnas respecto al control). Se utilizó el programa computacional GraphPad Software PRISM 5.0 (GraphPad Software, San Diego, EE.UU.). Se consideró un  $p \leq 0,05$  como estadísticamente significativo.

**Bioseguridad:** El laboratorio se encuentra ubicado en el Instituto de Ciencias Biomédicas en la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile y cuenta con los requerimientos básicos de Bioseguridad, certificado por la "Unidad de Prevención de Riesgos y Bioseguridad de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile"<sup>1</sup>.

**Las formas infectivas del parásito fueron manipuladas por la profesora guía de la memoria de título.**

---

<sup>1</sup> Anexo 1

## RESULTADOS

Durante el proceso de transmisión congénita el parásito debe atravesar la barrera placentaria, y es el trofoblasto el primer tejido placentario que entra en contacto con el parásito, lo que constituye la primera defensa física contra el *T. cruzi*. La integridad y el recambio epitelial normal del trofoblasto son cruciales para el desarrollo de una gestación adecuada. La diferenciación del trofoblasto implica, entre otros, la fusión de células del CT con el ST.

### 1. ESTABLECIMIENTO DE LAS CONDICIONES ÓPTIMAS DE INFECCIÓN DE CÉLULAS BeWo CON TRIPOMASTIGOTES DE *T. cruzi*.

**1.1 Identificación de los parásitos intracelulares:** Los parásitos intracelulares (amastigotes) fueron identificados por sus diferencias morfológicas (**Fig. 5**) con las células BeWo. Así, se aprecia que los amastigotes presentan un núcleo claramente más pequeño que las células BeWo (**Fig. 5A** las puntas de flecha indican a los parásitos, las flechas señalan a los núcleos de las células BeWo). En la **Fig. 5B** se puede observar en forma más clara las diferencias morfológicas entre las células BeWo y los amastigotes. Se destaca la presencia del kinetoplasto en los amastigotes, organelo no presente en células de mamífero, que presentan una mucha mayor afinidad al colorante que los núcleos.

**1.2 Determinación de la concentración óptima de infección de células BeWo con tripomastigotes *T. cruzi*:** La concentración óptima de infección fue determinada mediante el análisis del porcentaje de células infectadas. Las células BeWo fueron incubadas con tripomastigotes a una razón de células:parásitos de 1:0,01 1:0,1 y 1:1, durante 24 horas y analizadas a las 48, 72 y 96 horas. El porcentaje de células infectadas fue proporcional a la cantidad de parásitos utilizados para el desafío (**Fig. 9**), siendo las diferencias estadísticamente significativas (**Cuadro 1** \*\*\*\* $p \leq 0,0001$ ). Los porcentajes de células infectadas con las razones BeWo: *T. cruzi* de con las 3 diferentes concentraciones fueron:

Porcentaje de células infectadas	1:0,01	1:0,1	1:1
48 horas	1,62% ± 0,02	5,13% ± 0,02	21,16% ± 0,63
72 horas	0,36% ± 0,30	2,37% ± 0,60	16,96% ± 2,00
96 horas	0,36% ± 0,51	3,82% ± 0,90	16,93% ± 7,02

**Cuadro 1.** Porcentaje de células infectadas con tripomastigotes a una razón de BeWo: *T. cruzi* de 1:0,01 1:0,1 y 1:1, durante 24 horas y analizadas a las 48, 72 y 96 horas.

**1.3 Determinación del tiempo óptimo de contacto con tripomastigotes *T. cruzi*:** El tiempo óptimo de contacto para infección fue determinado mediante el análisis del porcentaje de células infectadas. Las células BeWo fueron incubadas durante 2, 4, 6, 12 ó 24 horas con tripomastigotes en una razón célula:parásito de 1:0,1 (**Fig. 10A**) y 1:1 (**Fig. 10B**). El porcentaje de células infectadas fue proporcional al tiempo de exposición con el parásito para ambas concentraciones de tripomastigotes (1:0,01 en **Fig. 10A** y 1:1 en **Fig. 10B**) siendo las diferencias estadísticamente significativas (**Cuadro 2** \*\*\*\* $p \leq 0,0001$ ). Los porcentajes de células infectadas post-incubación utilizando las dos concentraciones durante 2, 4, 6, 12 y 24 horas fueron las siguientes:

Porcentaje de células infectadas	1:0,1	1:1
<b>2 horas</b>	0,50% ± 0,01	6,31% ± 0,03
<b>4 horas</b>	2,49% ± 0,02	8,26% ± 0,002
<b>6 horas</b>	4,91% ± 0,02	9,14% ± 0,03
<b>12 horas</b>	5,28% ± 0,001	9,82% ± 0,03
<b>24 horas</b>	5,45% ± 0,02	13,93% ± 0,03

**Cuadro 2.** Porcentajes de células infectadas según la proporción BeWo: *T. cruzi* de 1:0,1 y 1:1 a 4 diferentes tiempos.

Adicionalmente, se determinó la cantidad de amastigotes intracelulares por células BeWo desafiadas con ambas concentraciones de parásitos (1:0,01 y 1:1). Se agruparon los datos según cantidad de parásitos intracelulares: Grupo 1:  $\leq 10$  parásitos, Grupo 2: 11-29 parásitos; Grupo 3:  $\geq 30$  parásitos (**Cuadro 3**). Se observó que el número de amastigotes por célula aumenta en función de la concentración de parásitos en el momento de la infección (**Fig. 11**). Así, los porcentajes de células infectadas según número de parásitos intracelular para la concentración 1:0,1 y 1:1 fueron:

Porcentaje de células infectadas	1:0,1	1:1	p
<b>Grupo 1</b>	90% ± 9,90	45,5% ± 0,71	** $p \leq 0,01$
<b>Grupo 2</b>	6% ± 8,49	30,5% ± 4,95	** $p \leq 0,05$
<b>Grupo 3</b>	4% ± 1,41	23% ± 4,24	** $p \leq 0,01$

**Cuadro 3.** Porcentajes de células infectadas según número de amastigotes en las concentraciones 1:0,1 y 1:1, agrupados según cantidad de parásitos intracelulares.

Consideramos que un tiempo de incubación de 24 horas facilita el diseño experimental. Por ende, determinamos que las condiciones óptimas de infección son por una parte una incubación de 24 horas y concentraciones de parásitos en una relación 1:0,1 y 1:1. Estas dos condiciones podrían asimilar las condiciones de parasitemia de las fases crónica y aguda, respectivamente (Fretes y Kemmerling, 2012).

## **2. DETERMINAR EL EFECTO DE TRIPOMASTIGOTE DE *T. cruzi* SOBRE LA DIFERENCIACIÓN CELULAR EN CÉLULAS BeWo**

### **2.1 Determinación del aumento de la secreción de hCG en células BeWo mediada por *T.***

***cruzi***: La diferenciación de las células BeWo fue evidenciada mediante la identificación de hCG en el sobrenadante del medio de cultivo. Células BeWo fueron incubadas en presencia y ausencia de tripomastigotes en las relaciones célula:parásito 1:0,1 y 1:1 durante 48 horas. La hCG fue cuantificada espectrofotométricamente en el sobrenadante de los cultivos (**Fig. 12**). Ambas concentraciones de parásitos aumentan significativamente la secreción de la hormona respecto al control (1:0,1:  $268 \pm 1,01\%$  y 1:1:  $255 \pm 2,73\%$ ; \*\*\*\* $p \leq 0,0001$ ).

### **2.2 Determinación del aumento en la expresión de hCG en células BeWo por distintas**

**concentraciones de *T. cruzi***: Células BeWo fueron incubadas en presencia y ausencia de tripomastigotes en las relaciones célula:parásito 1:0,1 y 1:1 durante 48 horas. La hCG fue cuantificada mediante *Western blot* (**Fig. 13**) e inmunofluorescencia (**Fig. 14**). Sólo la baja concentración de parásitos aumenta significativamente la expresión de hCG respecto al control ( $225 \pm 7,82\%$ ;  $p \leq 0,05$ ) (**Fig. 13**). El aumento de la expresión de hCG fue confirmada mediante inmunofluorescencia (**Fig. 14**), las células desafiadas con una baja concentración de parásitos muestran una inmunoreactividad marcada (+++) (**Fig. 14D-F**) igual que las que fueron estimuladas con forskolina 50  $\mu$ M (**Fig. 14J-L**). Células BeWo controles (**Fig. 14A-C**) y desafiadas con una alta concentración de parásitos (**Fig. 14H-I**) muestran una baja inmunoreactividad (+).

### **2.3 Determinación de la fusión en células BeWo inducida por *T. cruzi***

Células BeWo fueron incubadas en presencia y ausencia de tripomastigotes en las relaciones célula:parásito 1:0,1 y 1:1 durante 48 horas. La fusión de las células BeWo fue evidenciada a través de la superposición digital de las imágenes capturadas en un microscopio de fluorescencia y el análisis fue realizado mediante el uso del software MATLAB® (**Fig. 15**). Células BeWo desafiadas con el parásito muestran un aumento significativo del índice de fusión respecto al control, aumentando a  $27,88\% \pm 5,30$  (\*\*\*\* $p \leq 0,0001$ ) y  $11,35\% \pm 4,51$  (\*\*\*\* $p \leq 0,01$ ) al usar bajas y altas concentraciones, respectivamente (**Fig. 15F**).

Adicionalmente se evaluó la fusión celular mediante análisis de las uniones intercelulares, detectando la expresión y distribución de desmoplaquina (**Fig. 16A-C**). Tanto las bajas como las altas concentraciones de parásito aumentan a  $21,65 \pm 2,396\%$  ( $****p \leq 0,0001$ ) y  $18,62 \pm 2,89\%$  ( $**p \leq 0,01$ ) el índice de fusión, respectivamente (**Fig. 16D**).

## DISCUSIÓN

Los principales factores que permiten la aparición y el desarrollo de una infección congénita son el patógeno en sí, la madre, y la capacidad de la placenta para responder a la invasión del agente infeccioso. En la transmisión congénita de *T. cruzi*, el parásito debe atravesar la barrera placentaria, traspasando al trofoblasto (ST y CT), las láminas basales y el endotelio de los capilares en el estroma vellositario (Duaso *et al.*, 2011; Kemmerling *et al.*, 2010).

La transmisión congénita de *T. cruzi* puede ocurrir tanto en fases aguda y crónica de la infección. Sin embargo, el riesgo de transmisión es mayor en la fase aguda, cuando la parasitemia es alta y persistente (Fretes y Kemmerling, 2012). En estudios histopatológicos realizados en placentas de madres con enfermedad de Chagas aguda (alta parasitemia) se ha observado necrosis, infiltrado inflamatorio y nidos de amastigotes (Altemani, *et al.*, 2000). Por el contrario, en las placentas de madre con enfermedad de Chagas crónica no se observan focos necróticos ni infiltrado inflamatorio, y los nidos de amastigotes tampoco se observan, sólo es posible observar escasos antígenos y detectar DNA parasitario mediante PCR (Duaso *et al.*, 2012). En investigaciones realizadas en explantes de vellosidades coriónicas placentarias humanas infectadas con *T. cruzi*, también se han podido detectar sólo antígenos y DNA parasitario (Duaso *et al.*, 2010). Estas evidencias, junto con las bajas tasas de transmisión (Apt *et al.*, 2013) sugieren la existencia de mecanismos antiparasitarios en la placenta de las mujeres que padecen la enfermedad de Chagas crónica.

Una alta parasitemia, como en la infección aguda, se correlaciona con una mayor tasa de transmisión (Fretes y Kemmerling, 2012). Así, la cantidad de parásitos podría ser un factor de riesgo importante para la madre en la transmisión de *T. cruzi* al feto. En los experimentos realizados *in vitro* en las células BeWo se observa una infección mayor con la concentración más alta de parásitos 1:1 (BeWo: *T. cruzi*) (**FIG. 9**), antecedentes que concuerdan con un mayor riesgo de transmisión del parásito.

Otro factor importante, aunque poco conocida, es el tiempo que el parásito permanece en el espacio intervelloso en contacto con el ST. La barrera placentaria debe ser atravesada por los parásitos, por lo tanto, el tiempo que tripomastigotes de *T. cruzi* se quedan en el espacio intervelloso, interactuando con el ST es de suma importancia. En la infección *ex vivo* de explantes de vellosidades coriónicas placentarias humanas se obtiene una infección reproducible después de 24 horas de incubación con el parásito (Duaso *et al.*, 2010). Sin embargo, en experimentos realizados en un modelo de doble perfusión placentaria se muestran que *T. cruzi* está presente en el espacio intervelloso al menos durante una hora y media (Shippey *et al.*, 2005). A pesar de este largo tiempo de interacción, *T. cruzi* no fue capaz de invadir o sobrevivir en la barrera de la

placenta, lo que indica un mecanismo de defensa de la barrera placentaria contra el parásito. Nosotros logramos tener infecciones en cultivo de células BeWo a un tiempo mínimo de exposición de 2 horas (**Fig. 10**). Es importante recordar, que las células BeWo corresponden a células germinativas del CT, las que serían las más susceptibles de ser infectadas. Así, se determinó que en explantes de vellosidades coriónicas existen diferencias de susceptibilidad en el trofoblasto, siendo el ST más resistente a la infección (Díaz-Luján *et al.*, 2012). Sin embargo, existen pocos estudios que analizan la supervivencia de *T. cruzi* en el ambiente placentario.

En estudios *ex vivo* de explantes de vellosidades coriónicas placentarias humanas se observa que el daño más importante que produce el parásito en el tejido es el desprendimiento y la destrucción del trofoblasto. La infección con el parásito induce desorganización selectiva de lámina basal, con la destrucción del colágeno (Duaso *et al.*, 2010), y apoptosis, especialmente en el trofoblasto (Duaso *et al.*, 2011). Estos resultados destacan la importancia de la integridad de la primera barrera de la placenta, el ST, con el fin de evitar la infección del CT o células del estroma de la vellosidad coriónica con *T. cruzi*.

El recambio y mantención del trofoblasto, no solo es un proceso fundamental para el desarrollo de una placenta funcional y saludable (Benirschke *et al.*, 2012), sino también cumple el rol de barrera anatómica el cual forma parte del sistema inmune innato contra diferentes patógenos en una infección de transmisión vertical (Janeway, 2004). Si se toma en cuenta que el veinte por ciento de la sangre materna se puede encontrar circulando en el espacio intervilloso de la placenta, bañando las vellosidades fetales (Benirschke *et al.*, 2012), es el trofoblasto, por lo tanto, el primer tejido que está en contacto con el parásito, convirtiéndolo en una potencial barrera para *T. cruzi*.

Otro factor crucial en la prevención, interrupción o en el desarrollo de la infección en el feto/recién nacido depende de la capacidad de la madre y el feto/recién nacido para inducir una respuesta inmune innata o adquirida contra el patógeno (Mor y Cardenas, 2010). La producción de citoquinas pro-inflamatorias es observada en niños no infectados nacidos de madres infectadas (Carlier, 2005). Por el contrario, los niveles de marcadores de inflamación y la activación de las células NK (Natural Killer) son más bien bajos en recién nacidos infectados congénitamente (Hermann *et al.*, 2010). Existen tres tipos de mecanismos de la inmunidad innata que participan en la defensa de la barrera placentaria: a) células que secretan diversos mediadores químicos; b) la respuesta inmune innata celular; y c) la respuesta inmune humoral. Una vez que los patógenos invasores vulneran la barrera anatómica, las células inmunes innatas se activan y secretan citoquinas y quimioquinas para controlar la replicación del patógeno (Castillo *et al.*, 2013b; Hazlett y Wu, 2011).

El recambio epitelial, en otros órganos, se considera un mecanismo de protección contra los agentes patógenos, como ocurre en piel y los tractos gastrointestinal y urogenital (Cliffe *et al.*, 2005; Kim *et al.*, 2010). Existe un nivel basal de recambio epitelial, que puede acelerarse o



disminuirse en respuesta a diversos estímulos. La infección generalmente acelera el recambio del epitelio (Kim *et al.*, 2010). Diversos estudios han demostrado la importancia del recambio en el epitelio intestinal, el cual aumenta rápidamente en presencia de diferentes patógenos (Kim *et al.*, 2005; Savage *et al.*, 1981).

El trofoblasto es considerado un epitelio biestratificado compuesta por el CT, células basales proliferativas, y en su superficie el ST no replicativo con células diferenciadas. Una vez que las células del CT proliferan, las células hijas se diferencian saliendo del ciclo celular. La diferenciación es rápida (2 a 3 días), ocurriendo la fusión de células altamente diferenciadas del CT con el ST suprayacente. Dentro del ST, se produce una mayor diferenciación y maduración, lo que deriva en una apoptosis tardía de los núcleos y organelos en sitios específicos del ST, donde el material celular extruye en forma de corpúsculos apoptóticos (nodos sinciciales) rodeados de membrana sincicial quedando en la sangre materna del espacio intervilloso (Huppertz *et al.*, 2013; Mayhew, 2014). En estudios de la infección *ex vivo* de explantes de vellosidades coriónicas placentarias humanas demostró que bajas concentraciones de *T. cruzi* inducen la muerte celular tipo apoptosis en el trofoblasto (Duaso *et al.*, 2011). Por lo tanto, el parásito, particularmente a una baja concentración como en la enfermedad de Chagas crónica, podría inducir recambio epitelial (proliferación y diferenciación) del trofoblasto.

El ST corresponde a la porción endocrina de la placenta, la que secreta hormonas proteicas, incluyendo la hCG. La hormona hCG- $\beta$  se considera uno de los principales marcadores de diferenciación del trofoblasto, su secreción se ve aumentada en las células del ST (Huppertz y Gauster, 2011). Después de la implantación, la hCG es la primera señal de la presencia de trofoblasto, siendo detectado en la sangre materna y utilizado como indicador de embarazo en mujeres (Handschuh *et al.*, 2007). La hCG es esencial para el mantenimiento del embarazo a través de su efecto luteotrófico, ampliando la función progestacional del cuerpo lúteo. Además de esta función principal, la hCG cumple un rol regulatorio de la función fetoplacentaria humana y de varios otros tejidos no gonadales (Malassiné *et al.*, 2002). Por otro lado, se ha demostrado que cambios en la oxigenación placentaria pueden alterar los niveles de secreción de hCG (Esterman *et al.*, 1996).

La expresión y secreción de hCG en la línea celular de coriocarcinoma BeWo pueden ser inducidas a través del tratamiento con forskolina, la cual estimula niveles altos de AMPc generando su diferenciación y sincialización (Wice *et al.*, 1990). El desafío con una baja concentración de *T. cruzi* induce un aumento de la secreción y la expresión de hCG- $\beta$  en cultivos de células BeWo (**Fig. 12 y 13**). En contraste, las altas concentraciones de parásitos no inducen aumento de la secreción y expresión de la hormona en las células BeWo. Cabe señalar que en experimentos *ex vivo* en explantes de vellosidades coriónicas placentarias humanas realizados en nuestro laboratorio presentan resultados similares. En otros estudios realizados en cultivos de tejido de vellosidades

de primer trimestre la producción de hCG aumento significativamente en mujeres infectadas con VIH (Amirhessami-aghili y Spector, 1991). Es interesante destacar que la infección experimental con VIH en trofoblasto de placenta humana *ex vivo* suele ser poco probable (Benirschke *et al.*, 2012).

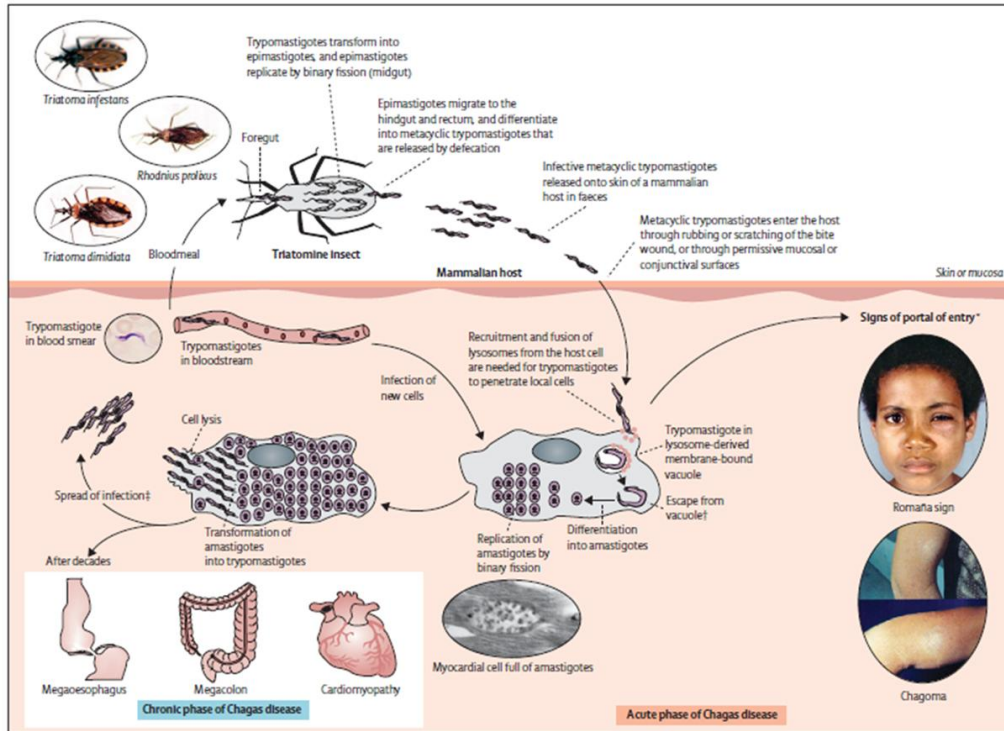
Además de la adaptación metabólica y endocrina del ST, la diferenciación también afecta la composición y disposición de la membrana citoplasmática. La fusión intercelular comprende la fusión de las membranas citoplasmáticas y su redistribución (Gauster y Huppertz, 2010). Una vez formado el sincicio las uniones intercelulares y sus componentes proteicos son degradadas, por lo tanto, la disminución y redistribución de estas proteínas son un indicador del proceso de fusión (Douglas y King, 1990). Los ensayos de fusión de dos colores (**Fig. 15**) y los del análisis de la redistribución de la desmoplaquina (**Fig. 16**) confirmaron que el parásito induce la diferenciación del trofoblasto, ya que *T. cruzi* aumenta significativamente el índice de fusión en las células BeWo.

Los resultados de la presente Memoria de Título muestran que la infección *in vitro* de la línea celular de coriocarcinoma humano (BeWo) con tripomastigotes de *T. cruzi* cepa Y induce un incremento en la diferenciación (sincicialización), observándose un aumento de la secreción y expresión de hCG- $\beta$ , así como también un aumento en los índices de fusión que fue determinado mediante el análisis de fusión de dos colores además de la redistribución de desmoplaquina. Estos resultados, juntos con los resultados previos del laboratorio sugieren que *T. cruzi* induce una aceleración del recambio del trofoblasto, lo que podría constituir un mecanismo antiparasitario local en la placenta humana.

## CONCLUSIÓN

*Trypanosoma cruzi* induce la diferenciación celular en células BeWo, lo que podría representar un aumento en el recambio del trofoblasto, que a su vez podría ser un mecanismo antiparasitario local de la placenta humana.

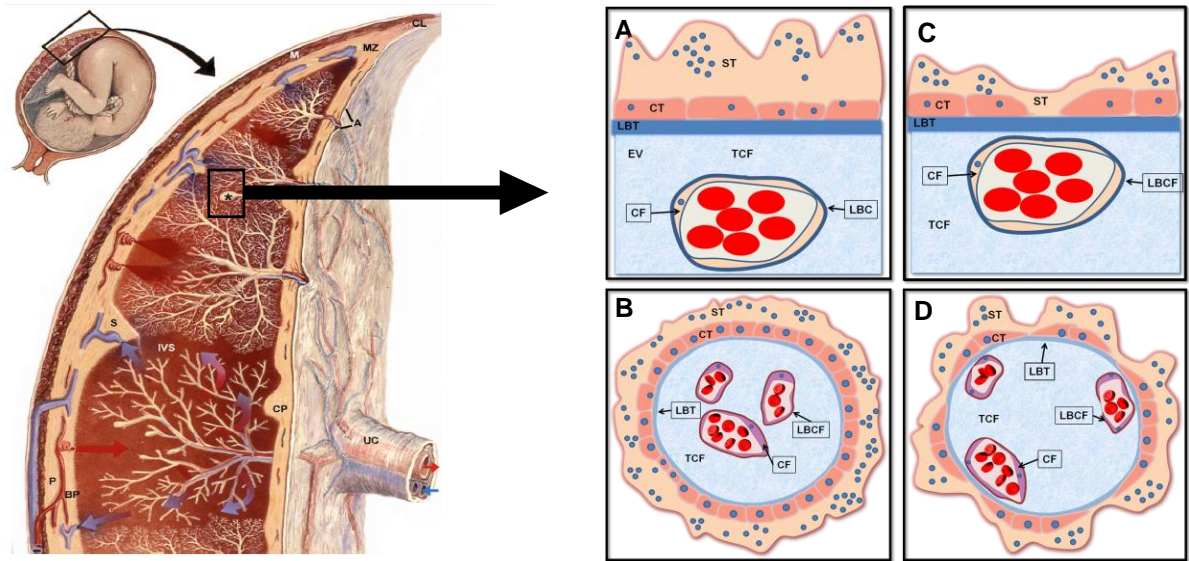
## FIGURAS



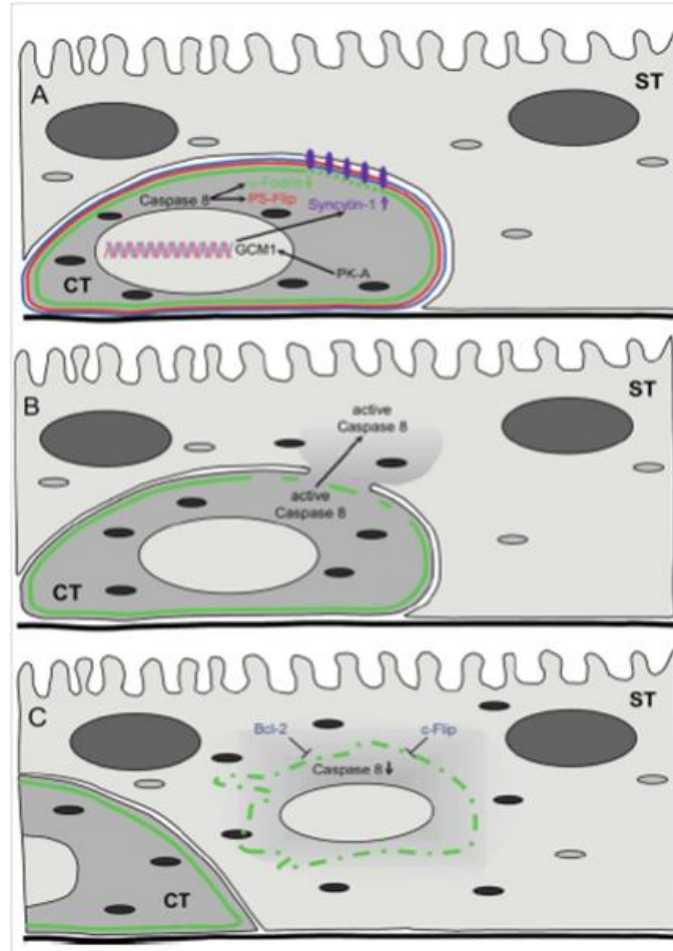
**FIGURA 1. Ciclo de vida de *Trypanosoma cruzi*.** El insecto vector (triatomino) ingiere tripomastigotes sanguíneos al alimentarse de la sangre de un mamífero infectado con el parásito. A medida que los parásitos avanzan por el tracto digestivo del insecto vector, éstos se diferencian a epimastigotes, la forma replicativa extracelular del parásito. En el intestino posterior del insecto vector los epimastigotes se diferencian nuevamente a tripomastigotes metacíclicos. El insecto al alimentarse nuevamente, deyeecta inmediatamente sus desechos contaminados con parásitos que ingresan al nuevo hospedero a través del sitio de la picadura o a través de las mucosas. Los tripomastigotes penetran células nucleadas y se diferencian a amastigotes multiplicándose repetidas veces intracelularmente. Posteriormente se diferencian a tripomastigotes, lisan células, alcanzan la circulación sanguínea y se diseminan por todo el organismo, quedando expuestos para que sean ingeridos por un insecto vector, cerrando así el ciclo biológico.

Adaptado: Rassi y Marin-Neto, 2010.

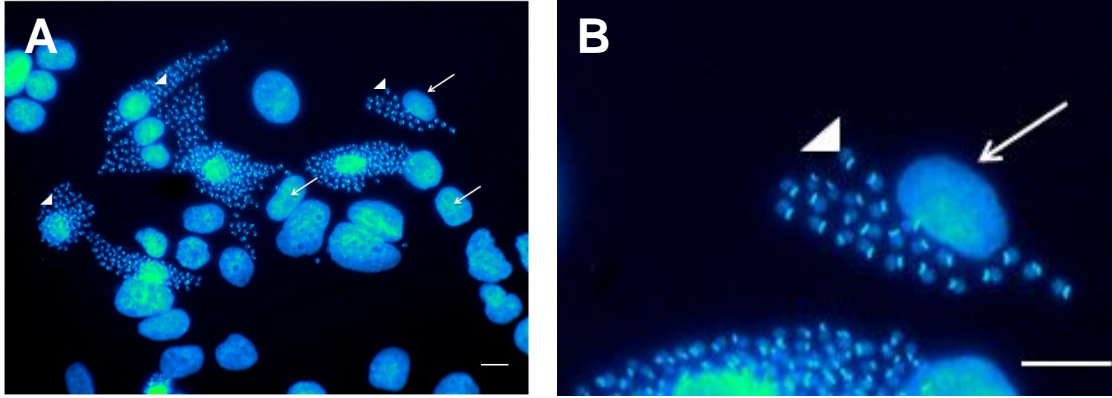




**FIGURA 3. Barrera placentaria.** La barrera placentaria está compuesta por sinciotrofoblasto (ST), citotrofoblasto (CT), tejido conectivo fetal (TCF), capilares fetales (CF) y láminas basales entre el tejido conectivo fetal y trofoblasto (LBT) y alrededor de los capilares fetales (LBCF) (**A-D**). Primer trimestre de gestación (**A y B**), después de la semana 20 de gestación, la placenta sufre modificaciones para favorecer el intercambio metabólico. Las células del CT disminuyen, los núcleos del ST se agrupan formando nodos y los capilares del tejido conectivo fetal se acercan al trofoblasto, adelgazándose la barrera placentaria (**C y D**). Adaptado: Benirschke *et al.*, 2012.

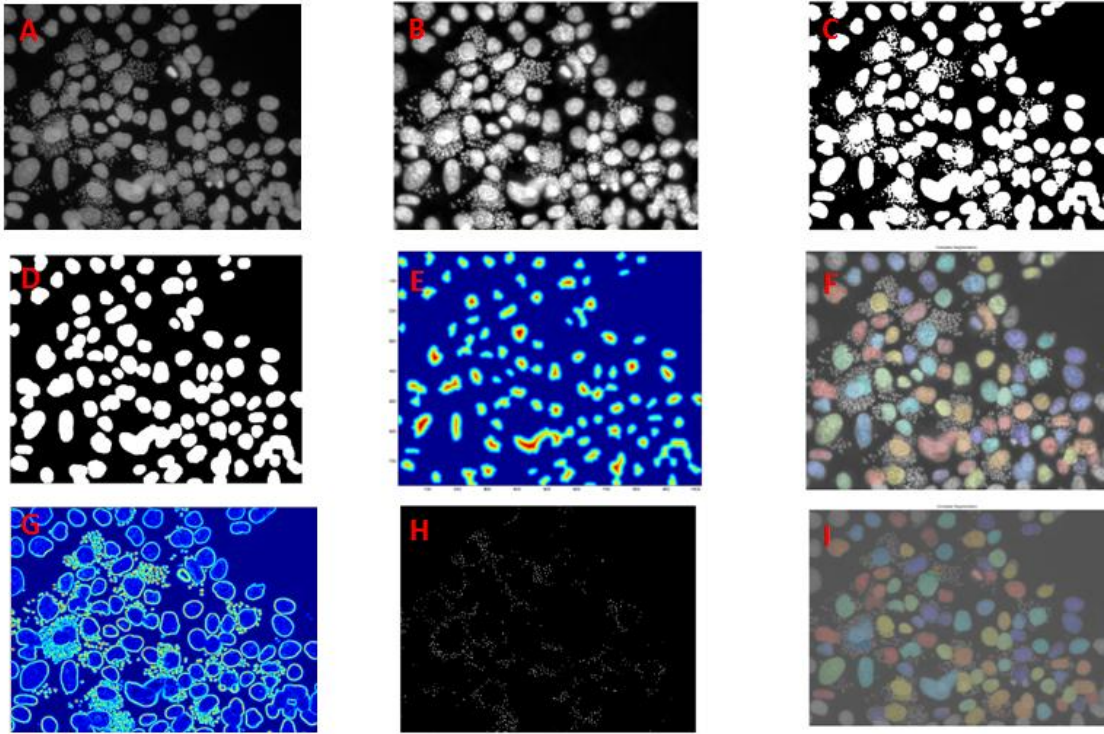


**FIGURA 4. Diferenciación en el trofoblasto.** (A) Previa fusión de células del CT con el ST, la pro-caspasa 8 pasa a su forma activa que lleva a la escisión de la alfa-fodrina, proteína del citoesqueleto sub-membranosa (línea verde **A-C**). Por otra parte, la caspasa-8 puede mediar directa o indirectamente en la translocación de la PS desde la capa interna (rojo en **A**) hacia la capa externa (azul en **A**) de la membrana plasmática. La activación de la PKA deriva en la activación del factor de transcripción GCM-1 que a su vez regula positivamente la expresión de la proteína fusogénica sincitina-1 (violeta en **A**). (B) Durante la fusión se produce disgregación de la alfa-fodrina lo que lleva a la remodelación del citoesqueleto, en combinación con las proteínas fusogénicas tales como sincitina-1. (C) Posteriormente la actividad de la caspasa-8 es inhibida por la acción de las proteínas anti-apoptóticas Bcl-2 y por c-Flip en el ST. A partir de esto, los componentes celulares del CT como el núcleo, organelos y las proteínas citoplasmáticas, son incorporadas al ST. Adaptado: Huppertz y Gauster, 2011.

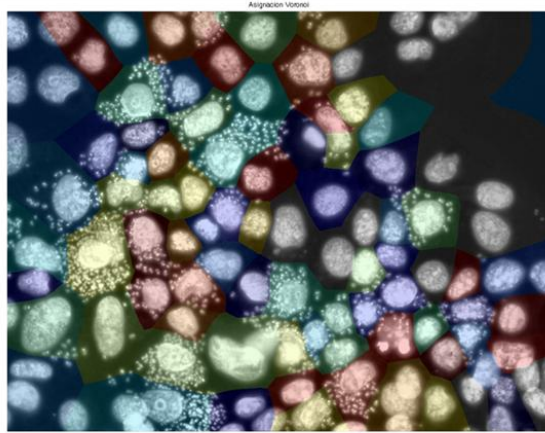


**FIGURA 5. Diferencias morfológicas entre células BeWo y amastigotes de *T. cruzi*.** Se sembraron  $10^5$  células BeWo que fueron incubadas durante 48 horas con tripomastigotes cepa Y en una relación célula:parásito de 1:1 y teñida con el colorante nuclear DAPI. En (A) se observan los núcleos de las células BeWo (flecha) y la ubicación peri-nuclear de los amastigotes (punta de flecha). En (B) se observa, con un mayor aumento, la diferencia en tamaño de los núcleos de las células BeWo y de los amastigotes y la presencia del kinetoplasto, al lado del núcleo del parásito, que se destaca por presentar una mayor afinidad al colorante. Barras de aumento:  $5\mu\text{m}$

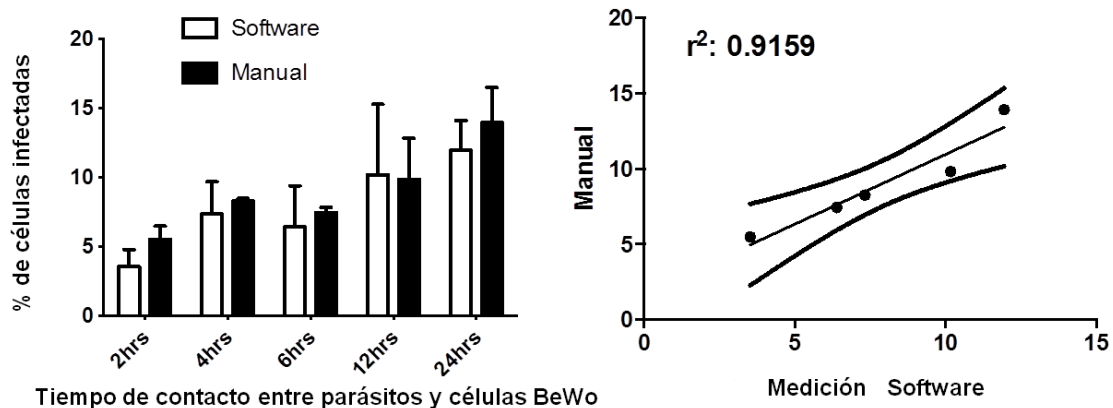




**FIGURA 6. Procesamiento de las imágenes con DAPI para el conteo automático de células BeWo y parásito intracelulares usando el software MATLAB®.** Las imágenes se convierten a escala de grises (**A**), se ecualiza el brillo y el contraste (**B**) y es convertido en blanco o negro (binarización) (**C**). Posteriormente son eliminados digitalmente los objetos pequeños de la imagen (los parásitos) (**D**) para finalmente aplicar el algoritmo *watershed* (**E**), a los núcleos se les asigna un color para contabilizarlas (**F**). Finalmente son eliminados digitalmente los “objetos grandes” (núcleos de células BeWo) (**G**) y los parásitos son identificados por la presencia de núcleos pequeños con un kinetoplasto vecino más brillante, el programa calcula la varianza local (diferencia entre tamaño y brillo) (**H**) y los parásitos intracelular son cuantificados (**I**).



**FIGURA 7. Determinación de células BeWo infectadas y no infectadas a través del uso del software MATLAB®.** Imágenes de los archivos, que muestran la cuantificación de los núcleos de las células BeWo luego de cuantificar el número de células BeWo y parásitos (ver **FIGURA 6**). Se aplica el diagrama de Voronoi para la asignación de parásitos intracelulares a las células que hipotéticamente están infectadas.

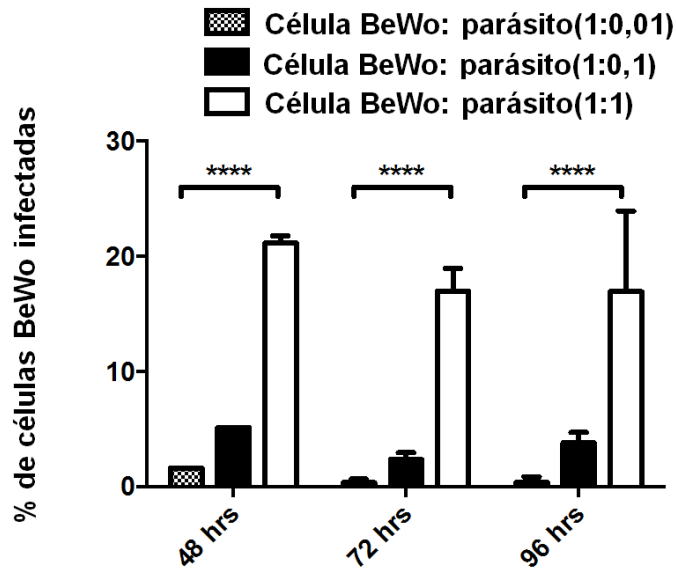


**FIGURA 8. Cuantificación manual y automática de la infección de células BeWo con *T. cruzi*.**

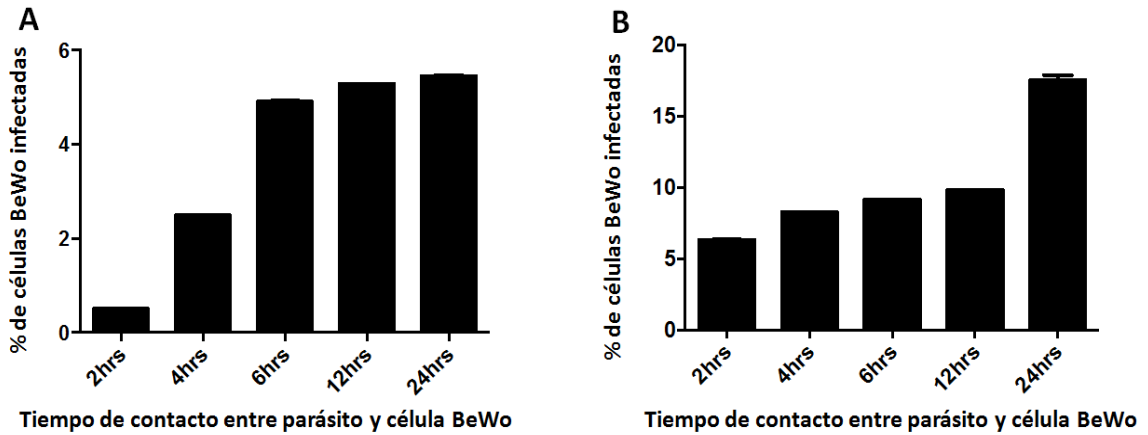
Células BeWo se desafiaron con tripomastigotes en una proporción BeWo: *T. cruzi* de 1:0,1 durante 2, 4, 6, 12 y 24 horas. Después de 48 horas fueron procesadas y teñidas con DAPI.

**A:** Se muestra en la cuantificación del porcentaje de células infectadas a diferentes tiempos de incubación mediante el software MATLAB® (barras blancas) y manual (barras negras).

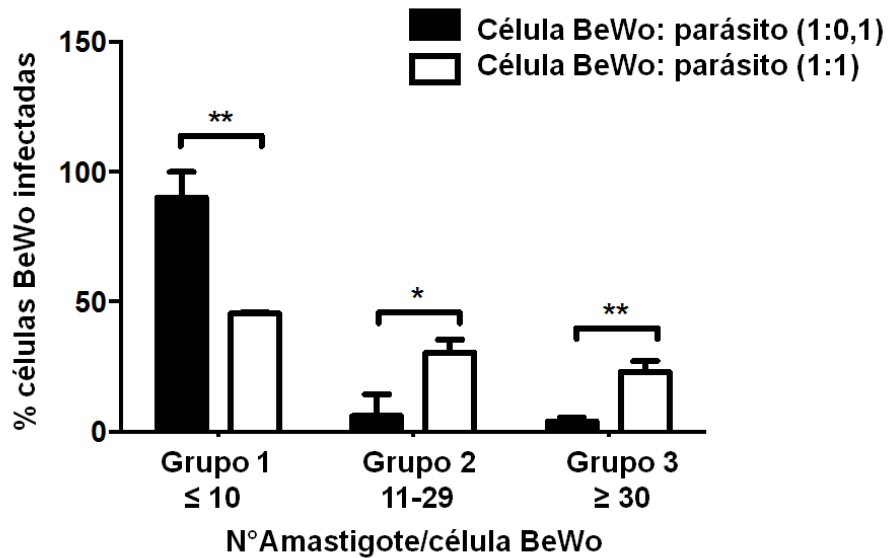
**B:** El análisis de correlación entre los resultados obtenidos con los métodos observados en A no muestra diferencias estadísticamente significativas entre ambos. Los datos fueron analizados mediante la prueba de t de *Students*.



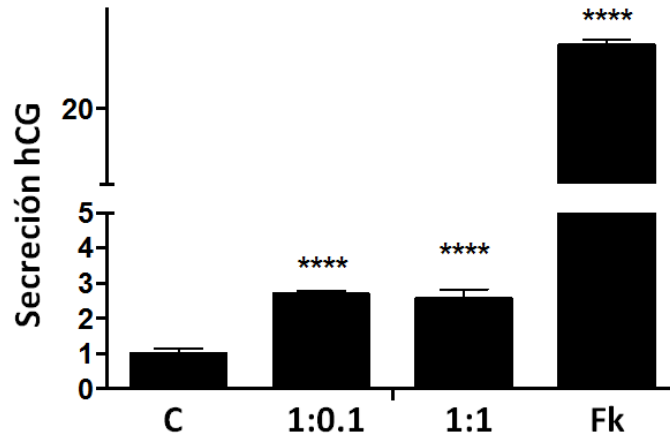
**FIGURA 9. Determinación de la concentración óptima de tripomastigotes *T. cruzi* en la infección de células BeWo.** Células BeWo fueron infectadas con tres concentraciones diferentes de tripomastigotes a una razón de BeWo: *T. cruzi* de 1:0,01; 1:0,1 y 1:1, las que fueron incubadas durante 48, 72 y 96 horas. La infección de las células fue identificada con tinción nuclear DAPI. Los porcentajes de células infectadas fueron determinadas analizando 1000 células por condición en 3 experimentos independientes. \*\*\*\* $p \leq 0,0001$



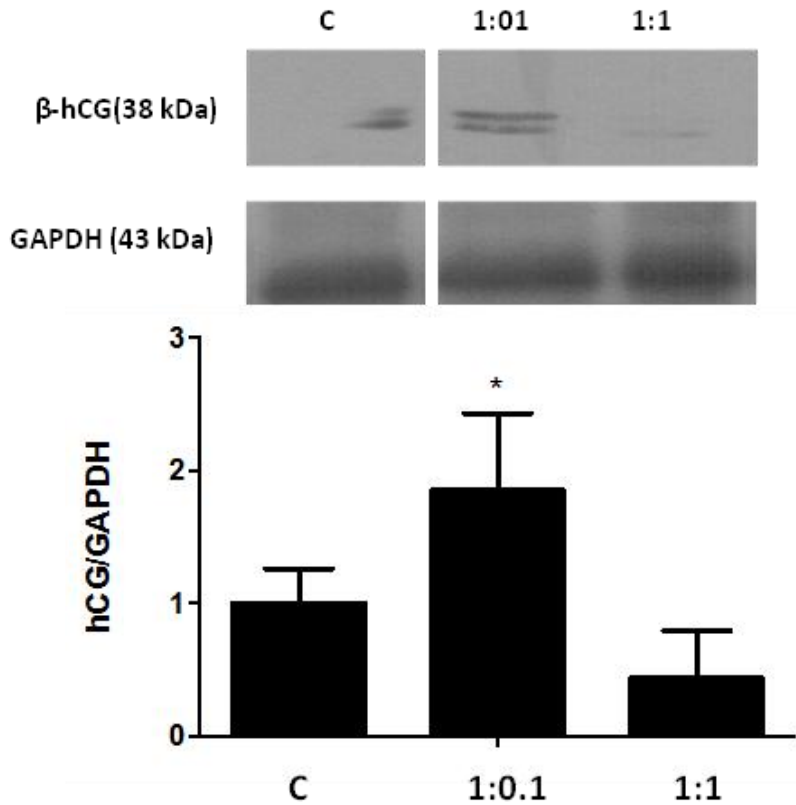
**FIGURA 10. Determinación del tiempo mínimo de contacto entre células BeWo y tripomastigotes *T. cruzi*.** Células BeWo fueron infectadas con dos concentraciones de tripomastigotes a una razón de BeWo: *T. cruzi* de 1:0,1 en **A** y 1:1 en **B**, con un tiempo de interacción entre células y parásitos de 2, 4, 6, 12 y 24 hrs. Al concluir cada tiempo de infección las muestras fueron lavadas para posteriormente recibieron medio de cultivo fresco, completando un total de 48 horas post-infección. La infección de las células fue identificada mediante la tinción nuclear DAPI. Los porcentajes de células infectadas fueron determinadas analizando 1000 células por condición en 3 experimentos independientes.



**FIGURA 11. Determinación del porcentaje de células BeWo infectadas de acuerdo a la cantidad de parásitos intracelulares.** Células BeWo fueron infectadas con tripomastigotes a una razón BeWo: *T. cruzi* de 1:0,1 (barras negras) y 1:1 (barras blancas) con un tiempo de incubación de 24 horas. Después del tiempo de incubación con el parásito, se retiró el medio y se adicionó medio fresco sin tripomastigotes, procesando las muestras a las 48 horas post-infección. Las células infectadas fueron identificadas por tinción nuclear DAPI. Los porcentajes de células BeWo infectadas fueron divididas en 3 grupos: **1)** 10 o menos amastigotes por célula, **2)** 11 a 29 amastigotes por célula y **3)** 30 o más amastigotes por célula. El número de amastigotes por célula aumenta en función de la concentración de parásitos en el momento de la infección. Los datos fueron analizados con prueba de t de *Student's*. \*p ≤ 0,05; \*\*p ≤ 0,01.

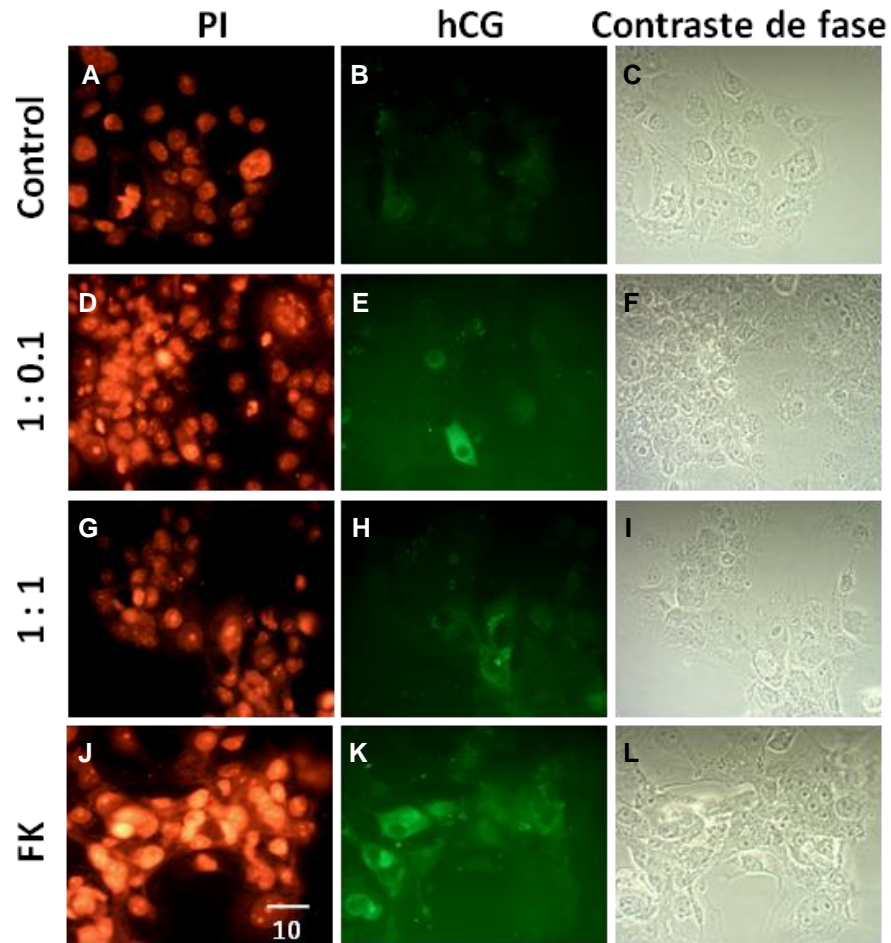


**FIGURA 12. *T. cruzi* aumenta la secreción de hCG- $\beta$  en células BeWo.** Células BeWo fueron infectadas con tripomastigotes a una razón BeWo: *T. cruzi* de 1:0,1 y 1:1, y procesadas a las 48 horas post-infección. Se observa un aumento significativo en la secreción de hCG en ambas concentraciones de parásitos con respecto al control negativo. La detección se realizó por ensayo de ELISA y la medición fue cuantificada espectrofotométricamente en el sobrenadante de los cultivos. Los datos fueron analizados mediante el test de ANOVA seguido por *Dunnnett's post test* \*\*\*\* $p \leq 0,0001$ .

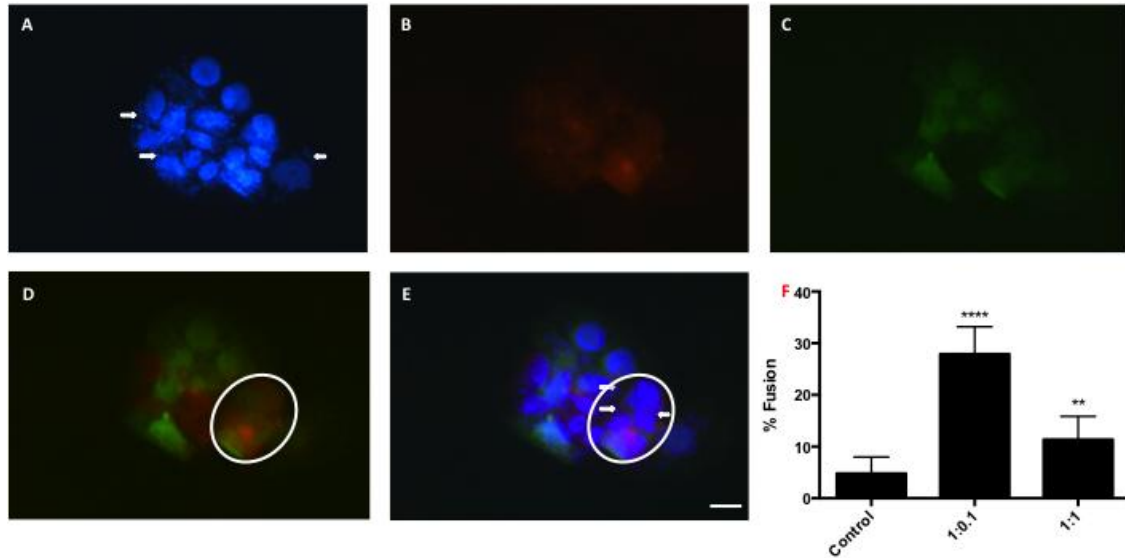


**FIGURA 13. Bajas concentraciones de *T. cruzi* induce aumento en la expresión de hCG- $\beta$  en células BeWo.** Células BeWo fueron infectadas con tripomastigotes a una razón BeWo: *T. cruzi* de 1:0,1 y 1:1, y procesadas a las 48 horas post-infección. Las células BeWo incubadas con la concentración baja de *T. cruzi* muestran un aumento significativo en la expresión de hCG respecto al control (\* $p \leq 0,05$ ) detectado mediante *Western Blot* expresado como la razón hCG/GAPDH. Los datos fueron analizados mediante el test de ANOVA seguido por *Dunnnett's post test* \* $p \leq 0.05$ .



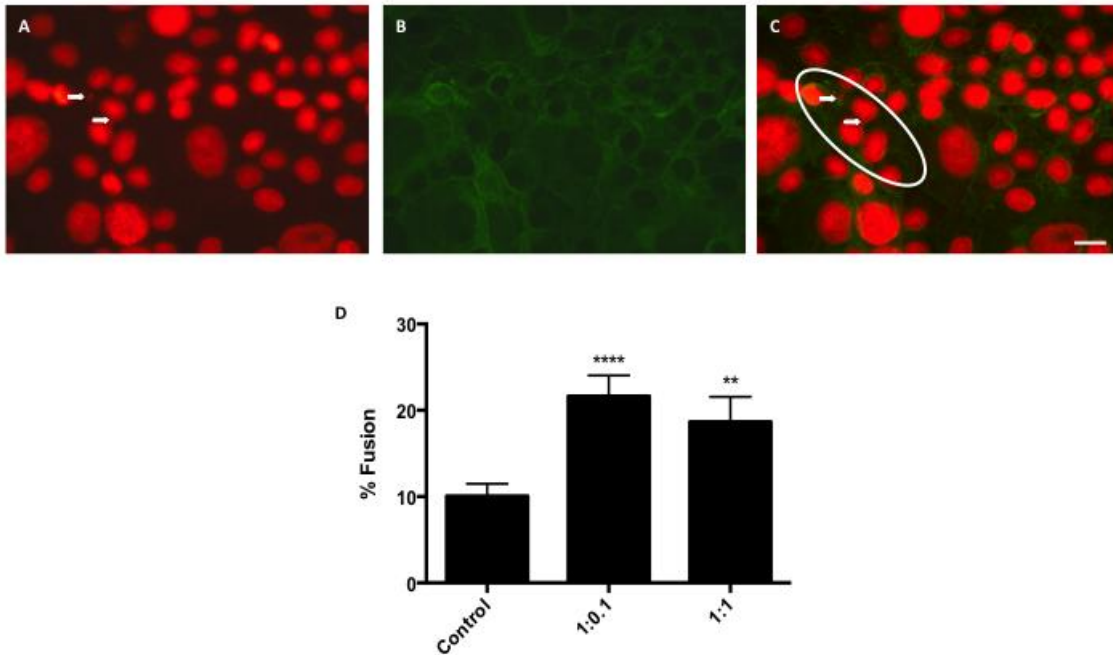


**FIGURA 14. Inmunofluorescencia para hCG.** Células BeWo fueron infectadas con tripomastigotes en una razón BeWo: *T. cruzi* de 1:0,1 y 1:1, y procesadas a las 48 horas post-infección. Se observa un franco aumento de la inmunoreactividad para hCG en las muestras incubadas con la baja concentración de parásitos (**D-F**) al igual que el control positivo tratadas con Fk 50µM (**J-L**), en comparación con la concentración de BeWo: *T. cruzi* de 1:1 (**G-I**) donde se distingue una menor inmunofluorescencia para hCG. Las muestras fueron procesadas para inmunofluorescencia de rutina. Barra de aumento: 10µm.



**FIGURA 15. *T. cruzi* induce fusión en células BeWo, ensayo de fusión de dos colores.** Se sembraron células BeWo teñidas con CT naranja (**B**) y CT verde (**C**) que fueron incubadas con tripomastigotes a una razón BeWo: *T. cruzi* de 1:0,1 y 1:1 durante 48 horas. En **A** se observa células infectadas con amastigotes (flecha blanca) y teñidas con el colorante nuclear DAPI. La fusión entre células marcadas con CT naranja (**B**) y CT verde (**C**) se evidencia con doble fluorescencia (circulo en **D**) y más de dos núcleos (flecha en **E**) que determinó el porcentaje de células fusionadas.

El parásito aumenta significativamente (**F**) el índice de fusión entre las células BeWo. Todos los valores corresponden al promedio más desviación estándar y al menos 3 experimentos independientes hechos en duplicado y/o triplicado. Los resultados se expresan como promedio más desviación estándar y analizadas mediante ANOVA seguido por *Dunnnett's post test*. \*\* $p \leq 0,01$  \*\*\*\* $p \leq 0,0001$ .



**FIGURA 16. *T. cruzi* induce fusión en células BeWo, análisis de re-distribución de desmoplaquina:** Células BeWo fueron incubadas con tripomastigotes a una razón célula:parásito de 1:0.1 y 1:1 durante 48 horas. Se analizó la fusión celular mediante la re-distribución de desmoplaquina (**A-C**) y se determinó el porcentaje de células fusionadas. Las muestras fueron procesadas para inmunofluorescencia de rutina (**B**) y teñidos con el colorante nuclear ioduro de propidio (**A**). Barra de aumento: 10  $\mu$ M.

Nótese en la imagen (**C**) que células infectadas con el parásito (**A** y **C** parásitos indicados con flechas blancas) son células que experimentan fusión.

El parásito aumento significativamente el índice de fusión en las células BeWo (**D**). Todos los valores corresponden al promedio más desviación estándar y al menos 3 experimentos independientes en duplicado o triplicado. Los resultados fueron expresado como promedio más desviación estándar y analizadas mediante ANOVA seguido por *Dunnnett's post test*. \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\*\* $p < 0,001$ .

## BIBLIOGRAFIA

- ALTEMANI A.M.; BITTENCOURT, A.L. AND LANA, A.M.A.** 2000. Immunohistochemical Characterization of the Inflammatory Infiltrate in Placental Chagas' Disease: a Qualitative and Quantitative Analysis. *Am J Trop Med Hyg.* 62 (2):319–324.
- AMIRHESSAMI-AGHILI, N. AND SPECTOR, S.A.** 1991. Human Immunodeficiency Virus Type 1 Infection of Human Placenta: Potential Route for Fetal Infection. *J Virol.* 65:2231–2236.
- APT, W.; HEITMANN, I.; JERCIC, M.; JOFRÉ, L.; MUÑOZ DEL V, P.; NOEMÍ, I.; SAN MARTÍN, A.; SAPUNAR, J.; TORRES, M. AND ZULANTAY, I.** 2008. Guías Clínicas de La Enfermedad de Chagas 2006: Parte V. Diagnóstico de Laboratorio. *Rev Chil Infectol.* 25(5):378–383.
- APT, W.; ZULANTAY, I.; SOLARI, A.; ORTIZ, S.; ODDÓ, D.; CORRAL, G.; TRUYENS, C.; CARLIER, Y.** 2010. Vertical Transmission of *Trypanosoma cruzi* in the Province of Choapa, IV Región, Chile. Preliminary Report (2005–2008). *Biol Res.* 43:269–274.
- APT, W. AND ZULANTAY, I.** 2011. Estado Actual En El Tratamiento de La Enfermedad de Chagas. *Rev Med Chile.* 139(2):247–257.
- APT, W.; ZULANTAY, I.; ARNELLO, M.; ODDO, D.; GONZALEZ, S.; RODRIGUEZ, J.; KEMMERLING, U.; TRUYENS, C AND CARLIER, Y.** 2013. Congenital Infection by *Trypanosoma cruzi* in an Endemic Area of Chile: a Multidisciplinary Study. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 107: 98–104.
- ARAÚJO, A.; JANSEN, A.M.; REINHARD, K. AND FERREIRA, L. F.** 2009. Paleoparasitology of Chagas Disease: a Review. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 104 (July): 9–16.
- AUFDERHEIDE A.C.; SALO, W.; MADDEN, M.; STREITZ, J.; BUIKSTRA, J.; GUHL, F.; ARRIAZA, B.; RENIER, C.; WITTMERS JR, L.E; FORNACIARI, G. AND ALLISON, M.** 2004. A 9,000-Year Record of Chagas' Disease. *Proc Natl Acad Sci.* 101(7):2034 - 2039.
- AZOGUE, E.** 1993. Women and Congenital Chagas' Disease in Santa Cruz, Bolivia: Epidemiological and Sociocultural Aspects. *Soc. Sci Med.* 37:503–11.
- BACZYK, D.; DREWLO, S.; PROCTOR, L.; DUNK, C.; LYE, S.; KINGDOM, J.** 2009. Glial Cell Missing-1 Transcription Factor is Required for the Differentiation of the Human Trophoblast. *Cell Death Differ.* 16:719–727
- BENIRSCHKE, K.; KAUFMANN, P. AND BAERGEN, R.N.** 2012. Pathology of the Human Placenta. Springer. 6<sup>a</sup> edición. NY, USA. pp. 55–100.

**BERN, C.; MONTGOMERY, S.P.; KATZ, L.; CAGLIOTI, S.; STRAMER, S.L.** 2008. Chagas Disease and the US Blood Supply. *Curr Opin Infect Dis.* 21:476–82.**BITTENCOURT, A.L.** 1992. Possible Risk Factors for Vertical Transmission of Chagas' Disease. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 34(5):403-8.

**BITTENCOURT, A.** 1992. Possible Risk Factors for Vertical Transmission of Chagas' Disease. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 34(5): 403 – 408.

**CARLIER, Y. AND TORRICO, F.** 2003. Congenital Infection with *Trypanosoma cruzi*: from Mechanisms of Transmission to Strategies for Diagnosis and Control. *Rev Soc Bras Med Trop.* 36:767–71.

**CARLIER Y.** 2005. Factors and Mechanisms Involved in the Transmission and Development of Congenital Infection with *Trypanosoma cruzi*. *Rev Soc Bras Med Trop.* 38(2):105-7.

**CARLIER, Y. AND TRUYENS, C.** 2010. Maternal-fetal Transmission of *Trypanosoma cruzi* to Congenital Chagas Disease: Definitions and Limits. In: Telleira, J. and Tibayrenc, M. *American Trypanosomiasis Chagas Disease: One Hundred Years of Research.* Elsevier. Londres, Inglaterra. pp. 539–565.

**CASTILLO, C.; LÓPEZ-MUÑOZ, R.; DUASO, J.; GALANTI, N.; JAÑA, F.; FERREIRA, J.; CABRERA, G.; MAYA, J.D. AND KEMMERLING, U.** 2012. Role of Matrix Metalloproteinases 2 and 9 in *Ex Vivo Trypanosoma cruzi* Infection of Human Placental Chorionic Villi. *Placenta.* 33 (12):991–7.

**CASTILLO, C.; VILLARROEL, A.; DUASO, J.; GALANTI, N.; CABRERA, G.; MAYA, J.D. AND KEMMERLING, U.** 2013a. Phospholipase C Gamma and ERK1/2 Mitogen Activated Kinase Pathways Are Differentially Modulated by *Trypanosoma cruzi* During Tissue Invasion in Human Placenta. *Exp Parasitol.* 133(1):12–7.

**CASTILLO, C.; RAMÍREZ, G.; VALCK, C.; AGUILAR, L.; MALDONADO, I.; ROSAS, C.; GALANTI, N.; KEMMERLING, U.; FERREIRA, A.** 2013b. The Interaction of Classical Complement Component C1 with Parasite and Host Calreticulin Mediates *Trypanosoma cruzi* Infection of Human Placenta. *PLoS Negl Trop Dis.* 7(8):e2376.

**CASTRO, J.A.; DE MECCA, M.M. AND BARTEL, L.C.** 2006. Toxic Side Effects of Drugs Used to Treat Chagas' Disease (American Trypanosomiasis). *Hum Exp Toxicol.* 25(8):471–479.

**CENTERS FOR DISEASE CONTROL (CDC).** 2006. Chagas Disease After Organ Transplantation—Los Angeles, California, 2006. *Morb Mortal Wkly Rep.* 55:798–800.

- CHAGAS, C.** 1909. Nova Tripanosomiase Humana. Estudos Sobre la Morfología e o Ciclo Evolutivo do *Schizotrypanum cruzi* n.gen, n.sp., Agente Etiológico do Nova Entidae Mórbida do Homen. Mem Inst Oswaldo Cruz. 1:159 – 128.
- CHANG, D.W.; XING, Z.; PAN, Y.; ALGECIRAS-SCHIMNICH, A.; BARNHART, B.C.; YAISH-OHAD, S.; PETER, M.E.; YANG, X.** 2002. c-FLIP(L) is a Dual Function Regulator for Caspase-8 Activation and CD95-Mediated Apoptosis. *Embo J.* 21:3704–3714.
- CLAYTON, J.** 2010. Chagas Disease 101. *Nature.* 465(7031):S4–S5.
- CLIFFE, L.J.; HUMPHREYS, N.E.; LANE T.E.; POTTEN, C.S. BOOTH, C.; GRENCIS, R.K.** 2005. Accelerated Intestinal Epithelial Cell Turnover: a New Mechanism of Parasite Expulsion. *Science.* 308:1463-1465.
- CORREA, D.; CAÑEDO-SOLARES, I.; ORTIZ-ALEGRÍA, L.B.; CABALLERO-ORTEGA, H. AND RICO-TORRES, C.P.** 2007. Congenital and Acquired Toxoplasmosis: Diversity and Role of Antibodies in Different Compartments of the Host. *Parasite Immunol.* 29(12):651–60.
- CRONIER, L.; HERVE, J.C.; DELEZE, J.; MALASSINE, A.** 1997. Regulation of Gap Junctional Communication During Human Trophoblast Differentiation. *Microsc Res Tech.* 38:21–28.
- CRONIER, L.; ALSAT, E.; HERVE, J.C.; DELEZE, J.; MALASSINE, A.** 1998. Dexamethasone Stimulates Gap Junctional Communication, Peptide Hormone Production and Differentiation of Human Term Trophoblast. *Trophoblast Res.* 11:35–49.
- DALEKE, D.L.** 2007. Phospholipid Flippases. *J Biol Chem.* 282:821–825.
- DAOUD, G.; AMYOT, M.; RASSART, E.; MASSE, A.; SIMONEAU, L.; LAFOND, J.** 2005. ERK1/2 and p38 regulate trophoblasts differentiation in human term placenta. *J Physiol.* 566(2):409-23
- DE SOUZA, W.** 2002. Basic Cell Biology of *Trypanosoma cruzi*. *Curr Pharm Des.* 8:269 – 285.
- DÍAZ-LUJÁN, C.; TRIQUELL, M.F.; SCHIJMAN, A.; PAGLINI, P.; FRETES, R.E.** 2012. Differential Susceptibility of Isolated Human Trophoblasts to Infection by *Trypanosoma cruzi*. *Placenta.* 33:264–270.
- DOLCINI, G.L.; SOLANA, M.E.; ANDREANI, G.; CELENTANO, A.M.; PARODI, L.M.; DONATO, A.M.; ELISSONDO, N.; CAPPA, S.M.G.; GIAVEDONI, L.D. AND PERALTA, L.M.** 2008. *Trypanosoma cruzi* (Chagas' disease agent) Reduces HIV-1 Replication in Human Placenta. *Retrovirology.* 5:53.
- DOUGLAS, G.C. AND KING, B.F.** 1990. Differentiation of Human Trophoblast Cells *In Vitro* as Revealed by Immunocytochemical Staining of Desmoplakin and Nuclei. *J Cell Sci.* 96:131–141.

**DREWLO, S.; BACZYK, D.; DUNK, C.; KINGDOM, J.** 2008. Fusion Assays and Models for the Trophoblast. *Methods. Mol Biol.* 475:363–382.

**DUASO, J.; ROJO, G.; CABRERA, G.; GALANTI, N.; BOSCO, C.; MAYA, J.D.; MORELLO, A. AND KEMMERLING, U.** 2010. *Trypanosoma cruzi* Induces Tissue Disorganization and Destruction of Chorionic Villi in an *Ex Vivo* Infection Model of Human Placenta. *Placenta.* 31(8):705–11.

**DUASO, J.; ROJO, G.; JAÑA, F.; GALANTI, N.; CABRERA, G.; BOSCO, C.; LÓPEZ-MUÑOZ, R.; MAYA, J.D.; FERREIRA, J. AND KEMMERLING, U.** 2011. *Trypanosoma cruzi* Induces Apoptosis in *Ex Vivo* Infected Human Chorionic Villi. *Placenta.* 32(5):356–61.

**DUASO, J.; CASTILLO, C. AND KEMMERLING, U.** 2012. Mechanism of Congenital Chagas Disease: Effective Infection Depends on the Interplay Between *Trypanosoma cruzi* and the Different Tissue Compartments in the Chorionic Villi of the Human Placenta. **In:** Zheng, J. (Ed) *Research on the human Placenta.* InTech. Rijeka. Croacia. pp. 149–164.

**ESTERMAN, A.; FINLAY, T.H. AND DANCIS, J.** 1996. The Effect of Hypoxia on Term Trophoblast: Hormone Synthesis and Release. *Placenta.* 17:217–222.

**FRAGATA-FILHO, A.A.; DE BARROS CORREIA, E.; BORGES FILHO, R.; DE OLIVEIRA VASCONCELOS, M.; JANCZUK, D. AND SOARES DE SOUZA MARTINS, C.** 2008. Sequência de Transmissões Não Habituais Da Infecção Chagásica Em Uma Mesma Família: Transfusional Para a Mãe e Congênita Para o Filho, de Cepa de *Trypanosoma cruzi* Resistente Ao Tratamento. *Rev Soc Bras Med Trop.* 41(1):73–75.

**FRANK, F.; SARTORI, M.J.; ASTEGGIANO, C.; LIN, S.; DE FABRO, S.P.; FRETES, R.E.** 2000. The Effect of Placental Subfractions on *Trypanosoma cruzi*. *Exp Mol Pathol.* 69:144–51.

**FRENDO, J.L.; CRONIER, L.; BERTIN, G.; GUIBOURDENCHE, J.; VIDAUD, M.; EVAIN- BRION, D.; MALASSINE, A.** 2003. Involvement of Connexin 43 in Human Trophoblast Cell Fusion and Differentiation. *J Cell Sci.* 116:3413–3421.

**FRETES, R.E. AND KEMMERLING, U.** 2012. Mechanism of *Trypanosoma cruzi* Placenta Invasion and Infection: The Use of Human Chorionic Villi Explants. *J Trop Med.* 2012:614820.

**FRÍAS, D.** 2010. A New Species and Karyotype Variation in the Bordering Distribution of *Mepraia spinolai* (Porter) and *Mepraia gajardo* Frías *et al.* (Hemiptera: Reduviidae: *Triatominae*) in Chile and its Parapatric Model of Speciation. *Neotrop Entomol.* 39(4):572–583.

**FRIEDMAN, J.F.; MITAL, P.; KANZARIA, H.K.; OLDS, G.R. AND KURTIS, J.D.** 2007. Schistosomiasis and Pregnancy. *Trends Parasitol.* 23(4):159–64.

- FUJITA, O.; SANABRIA, L.; INCHAUSTTI, A.; DE ARIAS, A.R.; TOMIZAWA, Y.; OKU, Y.** 1994. Animal Reservoirs for *Trypanosoma cruzi* Infection in an Endemic Area in Paraguay. *J. Vet Med Sci.* 56:305–308.
- GARCIA, A.; BAHAMONDE, M.I.; VERDUGO, S.; CORREA, J.; PASTENE, C.; SOLARI, A. AND LORCA, M.** 2001. *Trypanosoma cruzi* Transplacental Infection. Situation in Chile. *Rev Med Chile.* 129:330–332.
- GASCON, J.; BERN, C.; PINAZO, M.J.** 2010. Chagas disease in Spain, the United States and other non-endemic countries. *Acta Trop.* 115:22–27.
- GAUSTER, M. AND HUPPERTZ, B.** 2010. The paradox of caspase-8 in human villous trophoblast fusion. *Placenta.* 31:82–88.
- GUDLA, P.R.; NANDY, K.; COLLINS, J.; MEABURN, K.J.; MISTELI, T.; LOCKETT, S.J.** 2008. A High-Throughput System for Segmenting Nuclei Using Multiscale Techniques. *Cytometry A.* 73:451–66.
- GÜRTLER, R.E.; SEGURA, E.L.; COHEN, J.E.** 2003. Congenital Transmission of *Trypanosoma cruzi* in Argentina. *Emerg Infect Dis.* 9:29–35.
- GÜRTLER, R.E.; CEBALLOS, L.A.; ORDÓÑEZ-KRASNOWSKI, P.; LANATI, L.A.; STARIOLO, R.; KITRON, U.** 2009. Strong Host-feeding Preferences of the Vector *Triatoma infestans* Modified by Vector Density: Implications for the Epidemiology of Chagas Disease. *PLoS Negl Trop Dis.* 3(5):e447
- HANDSCHUH, K.; GUIBOURDENCHE, J.; TSATSARIS, V.; GUESNON, M.; LAURENDEAU, I.; EVAIN-BRION, D.; FOURNIER, T.** 2007. Human Chorionic Gonadotropin Produced by the Invasive Trophoblast but not the Villous Trophoblast Promotes Cell Invasion and is Down-Regulated by Peroxisome Proliferator-Activated Receptor-Gamma. *Endocrinology.* 148:5011–501.
- HAZLETT, L. AND WU, M.** 2011. Defensins in innate immunity. *Cell Tissue Res.* 343(1):175-88.
- HUPPERTZ, B.; KAUFMANN, P AND KINGDOM, J.C.P.** 2002. Trophoblast Turnover in Health and Disease. *Fetal Maternal Med Rev.* 13:17–32
- HUPPERTZ, B. AND BORGES, M.** 2008. Placenta Trophoblast Fusion. *Methods Mol Biol.* 475:135–147.
- HUPPERTZ, B. AND GAUSTER, M.** 2011. Trophoblast Fusion. *Adv Exp Med Biol.* 713:81-95.



- HUPPERTZ, B.; GHOSH, D.; SENGUPTA, J.** 2013. An Integrative View on the Physiology of Human Early Placental Villi. Progress in biophysics and molecular biology. Prog Biophys Mol Biol. 114(1):33-48.
- JANEWAY, C. AND TRAVER, P.** 2004. Immunobiology: The Immune System in Health and Disease. Garland Science. 6ª edición. N Y. USA. pp. 264-275.
- JERCIC, M.I.; MERCADO, R.; VILLARROEL, R.** 2010. Congenital *Trypanosoma cruzi* Infection in Neonates and Infants from Two Regions of Chile Where Chagas' Disease Is Endemic. J Clin Microbiol. 48(10):3824–6.
- KEMMERLING, U.; BOSCO, C.; GALANTI, N.** 2010. Infection and Invasion Mechanisms of *Trypanosoma cruzi* in the Congenital Transmission of Chagas' Disease: A Proposal. Biol Res. 43(3):307–316.
- KIM, M.; ASHIDA, H.; OGAWA, M.; YOSHIKAWA, Y.; MIMURO, H.; SASAKAWA, C.** 2010. Bacterial interactions with the host epithelium. Cell Host Microbe. 8(1):20–35.
- KOI, H.; ZHANG, J.; PARRY, S.** 2001. The mechanisms of placental viral infection. Ann N Y Acad Sci. 943:148-56.
- KNERR, I.; SCHUBERT, S. W.; WICH, C.; AMANN, K.; AIGNER, T.; VOGLER, T.; JUNG, R.; DÖTSCH, J.; RASCHER, W. & HASHEMOLHOSSEINI, S.** 2005. Stimulation of GCMA and Syncytin via cAMP Mediated PKA Signaling in Human Trophoblastic Cells Under Normoxic and Hypoxic Conditions. FEBS Lett 579(18), 3991—3998.
- LEIBY, D.A.; LENES, B.A.; TIBBALS, M.A.; TAMES-OLMEDO, M.T.** 1999. Prospective Pvaluation of a patient with *Trypanosoma cruzi* Infection Transmitted by Transfusion. N Engl J Med. 341:1237–39.
- LEISSER, C.; SALEH, L.; HAIDER, S.; HUSSLEIN, H.; SONDEREGGER, S.; KNÖFLER, M.** 2006. Tumour Necrosis Factor-Alpha Impairs Chorionic Gonadotrophin Beta-Subunit Expression and Cell Fusion of Human Villous Cytotrophoblast. Mol Hum Reprod. 12:601–609.
- MALASSINÉ, A. AND CRONIER, L.** 2002. Hormones and Human Trophoblast Differentiation: A Review. Endocrine. 19(1):3–11.
- MAYHEW, T.M.** 2014. Turnover of Human Villous Trophoblast in Normal Pregnancy: What Do We Know and What Do We Need to Know?. Placenta. 35:229-40.

**MI, S.; LEE, X.; LI, X.; VELDMAN, G.M.; FINNERTY, H.; RACIE, L.; LAVALLIE, E.; TANG, X.Y.; EDOUARD, P.; HOWES, S.; KEITH, J.C.; JR. MCCOY, J.M.** 2000. Syncytin is a Captive Retroviral Envelope Protein Involved in Human Placental Morphogenesis. *Nature*. 403:785–789.

**MINSAL.** 2012. Informe Situación Epidemiológica de la Enfermedad de Chagas 2007-2012. Departamento de Epidemiología. Ministerio de Salud. Gobierno de Chile.

**MOR, G. AND GARDENAS, I.** 2010. The Immune System in Pregnancy: a Unique Complexity. *Am J Reprod Immunol*. 63:425-33.

**MOORE, K.; PERSAUD, T.; TORCHIA M.** 2008. *The Developing Human: Clinically Oriented Embryology*. 7ª Edición. Elsevier. Madrid, España. 7:120-131.

**MORRISH, D.W.; BHARDWAJ, D.; PARAS, M.T.** 1991. Transforming Growth Factor Beta-1 Inhibits Placental Differentiation and Human Chorionic Gonadotropin and Human Placental Lactogen Secretion. *Endocrinology*. 129:22–26.

**MUÑOZ-SARAVIA, S.G.; HABERLAND, A.; WALLUKAT, G.; SCHIMKE, I.** 2012. Chronic Chagas' Heart Disease: a Disease on Its Way to Becoming a Worldwide Health Problem: Epidemiology, Etiopathology, Treatment, Pathogenesis and Laboratory Medicine. *Heart Fail Rev*. 17(1):45–64.

**NACHTIGALL, M.J.; KLIMAN H.J.; FEINBERG, R.F.; OLIVE, D.L.; ENGIN, O.; ARICI, A.** 1996. The Effect of Leukemia Inhibitory Factor (LIF) on Trophoblast Differentiation: a Potential Role in Human Implantation. *J Clin Endocrinol Metab*. 81:801–806.

**NANDY, K.; GUDLA, P.R.; AMUNDSEN, R.; MEABURN, K.J.; MISTELI, T.; LOCKETT, S.J.;** 2011. Supervised learning framework for screening nuclei in tissue sections. *Conf Proc IEEE Eng Med Biol Soc*. 2011:5989–92.

**ORGANIZACIÓN PANAMERICANA DE LA SALUD (OPS).** 2006. Estimación Cuantitativa de la Enfermedad de Chagas en las Américas. Organización Panamericana de la Salud. Montevideo, Uruguay. pp. 6 – 8.

**PARKER, E.R. AND SETHI, A.** 2011. Chagas Disease: Coming to a Place Near You. *Dermatologic Clinics*. 29(1):53–62.

**PEREIRA, K.S.; SCHMIDT, F.L.; GUARALDO, A.M.; FRANCO, R.M.; DIAS, V.L.; PASSOS, L.A.** 2009. Chagas Disease as a Foodborne Illness. *J Food Prot*. 72:441–46.

- PIAT, G.L.; ALMIRÓN, J.F.; ROMANO, J.R. Y ROMANO, M.F.** 2009. Chagas Congénito Revisión de Una Enfermedad Curable y Subestimada. *Revista de Posgrado de La VIª Cátedra de Medicina.* 10:16–21.
- PRATA, A.** 2001. Clinical and Epidemiological Aspects of Chagas Disease. *Lancet Infect Dis.* 1(2):92–100.
- PUNUKOLLU, G.; GOWDA, R.M.; KHAN, I.A.; NAVARRO, V.S. AND VASAVADA, B.C.** 2007. Clinical Aspects of the Chagas' Heart Disease. *Int J Cardiol.* 115(3):279–83.
- RASSI, A. AND MARIN-NETO, J.A.** 2010. Chagas Disease. *Lancet.* 375(9723):1388–402.
- RASSI, A. JR.; RASSI, A.; LITTLE W.C; XAVIER, S.S.; RASSI, S.G.; RASSI, A.G.; RASSI, G.G.; HASSLOCHER-MORENO, A.; SOUSA, A.S. AND SCANAVACCA, M.I.** 2006. Development and Validation of a Risk Score for Predicting Death in Chagas' Heart Disease. *N Engl J Med.* 355(8):799–808.
- RIERA, C.; GUARRO, A.; KASSAB, H.E.; JORBA, J.M.; CASTRO, M.; ANGRILL, R.; GALLEGO, M.** 2006. Congenital Transmission of *Trypanosoma cruzi* in Europe (Spain): A Case Report. *Am J Trop Med Hyg.* 75(6):1078–1081.
- ROCHA, G.; MARTINS, A.; GAMA, G.; BRANDÃO, F. AND ATOUGUIA, J.** 2004. Possible Cases of Sexual and Congenital Transmission of Sleeping Sickness. *Lancet.* 363(9404):247.
- ROGERSON, S.J.; HVIID, L.; DUFFY, P.E.; LEKE, R.F.G AND TAYLOR, D.W.** 2007. Malaria in Pregnancy: Pathogenesis and Immunity. *Lancet Infect Dis.* 7(2):105–17.
- ROTHAMMER, F.; ALLISON, M.; NUÑEZ, L.** 1985. Chagas Disease in Pre-Columbian South America American. *J Physical Anthropol.* 68:495–498.
- SALAS, C.; TAPIA, R.A.; CIUDAD, K.; ARMSTRONG, V.; ORELLANA, M.; KEMMERLING, U.; FERREIRA, J.; MAYA, J.D.; MORELLO, A.** 2008. *Trypanosoma cruzi*: Activities of Lapachol and alpha- and beta-Lapachone Derivatives Against Epimastigote and Trypomastigote Forms. *Bioorg Med Chem.* 16:668–74.
- SAVAGE, D.C.; SIEGEL, J.E.; SNELLEN, J.E; WHITT, D.D.** 1981. Transit Time of Epithelial Cells in the Small Intestines of Germfree Mice and Ex-Germfree Mice Associated with Indigenous Microorganisms. *Appl Environ Microbiol.* 42(4):996-1001.
- SCHFIELD, C.J. AND GALVÃO, C.** 2009. Classification, Evolution, and Species Groups Within the *Triatominae*. *Acta Trop.* 110:88–100.

- SCHMUNIS, G.A.** 1999. Prevention of Transfusional *Trypanosoma cruzi* Infection in Latin America. Mem Inst Oswaldo Cruz. 94 (1): 93–101.
- SCHMUNIS, G.A.** 2007. Epidemiology of Chagas Disease in Non-endemic Countries: The Role of International Migration. Mem Inst Oswaldo Cruz . 102(1):75–85.
- SHIPPEY, S.H.; ZAHN, C.M.; CISAR, M.M.; WU, T.J. AND SATIN, A.J.** 2005. Use of the placental perfusion model to evaluate transplacental passage of *Trypanosoma cruzi*. Am J Obstet Gynecol. 192 (2):586–591.
- SYME, M.R.; PAXTON, J.W.; KEELAN, J.A.** 2004. Drug Transfer and Metabolism by the Human Placenta. Clin Pharmacokinet. 43(8):487–514.
- TYLER, K.M. AND ENGMAN, D.M.** 2001. The Life Cycle of *Trypanosoma cruzi* Revisited. Int J Parasitol. 31(5-6): 472–481.
- WAKAMATSU, M.; KIKUCHI, A.; TAMARU, S.; ONO, K.; HORIKOSHI, T.; TAKAGI, K.; OGISO, Y.; TANEMURA, M.** 2011. Voronoi diagram description of the maternal surface of the placenta: preliminary report. J Obstet Gynaecol Res. 37:792–9.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO).** 2010. First WHO Report on Neglected Tropical Diseases 2010: Working to Overcome the Global Impact of Neglected Tropical Diseases. World Health Organization. Ginebra, Suiza. pp.75 – 81.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO).** 2012. Research Priorities for Chagas Disease, Human African Trypanosomiasis and Leishmaniasis. World Health Organization. Ginebra, Suiza. pp.11–14.
- WICE, B.; MENTON, D.; GEUZE, H.; SCHWARTZ, A.L.** 1990. Modulators of Cyclic AMP Metabolism Induce Syncytiotrophoblast Formation *In Vitro*. Exp Cell Res. 186:306–316.
- YOSHIDA, N.** 2006. Molecular Basis of Mammalian Cell Invasion by *Trypanosoma cruzi*. An Acad Bras Cienc. 78(1):87–111.
- YU, W.; LEE, H.K.; HARIHARAN, S.; BU, W.; AHMED, S.** 2010. Evolving generalized Voronoi diagrams for accurate cellular image segmentation. Cytometry A. 77:379–86.
- ZINGALES, B.; ANDRADE, S.G.; BRIONES, M.R.S.; CAMPBELL, D.A.; CHIARI, E.; FERNANDES, O.; GUHL, F.; LAGES-SILVA, E.; MACEDO, A.M.; MACHADO, C.R.; MILES, M.A.; ROMANHA, A.J.; STURM, N.R.; TIBAYRENC, M.; SCHIJMAN, A.G.** 2009. A New Consensus for *Trypanosoma cruzi* Intraspecific Nomenclature: Second Revision Meeting Recommends TcI to TcVI. Mem Inst Oswaldo Cruz. 104:1051–1054.

## ANEXOS

### ANEXO 1



UNIDAD DE PREVENCIÓN DE RIESGOS & BIOSEGURIDAD  
FACULTAD DE MEDICINA  
UNIVERSIDAD DE CHILE

Santiago, May 05<sup>th</sup> 2011.-

To:  
**FONDECYT PROGRAM**  
**PRESENT**

Dear Sirs

The Risk Prevention and Biosafety Unit of the Faculty of Medicine, University of Chile hereby certifies that it received for its study, from responsible investigator Dr. Ulrike Kemmerling head of the laboratory "Mechanism of Parasite Infection", Program of Anatomy and Developmental Biology, Institute for Biomedical Sciences (ICBM), Faculty of Medicine, University of Chile the project proposal titled as "**Mechanism of congenital Chagas disease: Effective infection depends on the interplay between *T. cruzi* and the trophoblast in the human placenta**". The project satisfies all basic Biosafety requirements to be carried out. It also meets every demand established on manuals: CONICYT "Biosafety 1<sup>st</sup> edition 1994" and "Manual of Safety Standards, 2<sup>nd</sup> edition 2008", "Center for Control and Prevention of Diseases, CDC, 4<sup>a</sup> edition, "Safety in Laboratories Manual", World Health Organization WHO, Geneva 2005, reasons why this unit approves its eventual execution.

Responsible investigator Dr. Ulrike Kemmerling, is committed to meet all biosafety standards established in the formerly cited manuals and those established in the Internal Regulations for the functioning of the Laboratories, Risk Prevention and Biosafety Unit, Faculty of Medicine, University of Chile. Concomitantly she is responsible for the proper complying of established biosafety regulations, of all participants of the aforementioned project

Receiving acknowledgement: **Dr. Ulrike Kemmerling**

  
  
**Professor Mónica Acuña Patzke**  
**Risk Prevention and Biosafety Unit Director**

\* Attached Annex IX.1 Fondecyt Project

c.c.

- Dean, Doctor, Cecilia Sepúlveda C.
- Vice-Dean, Dr. Ennio Vivaldi
- Biomedical Sciences Institute Director ICBM, Dr. Benjamín Suárez
- Responsible Investigator, Dra. Ulrike Kemmerling
- Archives

Av. Independencia 1027, Teléfono (56) 2 9786564 e-mail: [biosegur@med.uchile.cl](mailto:biosegur@med.uchile.cl), [unr@med.uchile.cl](mailto:unr@med.uchile.cl)