

UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE MEDICINA
ESCUELA DE POSTGRADO



ESTUDIO DEL ROL DE LA CASPASA 8 EN LA INFECCIÓN POR
***Trypanosoma cruzi* EN UNA LINEA CELULAR DE TROFOBLASTO**
HUMANO (BeWo)

Ileana Vanessa V. Carrillo Werner

TESIS PARA OPTAR AL GRADO DE MAGISTER EN BIOMEDICINA CELULAR Y
MOLECULAR

Director de Tesis: Dra. Ulrike Kemmerling

2016

AGRADECIMIENTOS

Quisiera dar mi más profundo agradecimiento a mi tutora, la Dra. Ulrike Kemmerling, por la confianza, dedicación y el apoyo brindado durante el desarrollo de esta tesis. También, agradecer al grupo del laboratorio por la colaboración, paciencia y por su compañía.

Quiero agradecer también a mi familia y amigos que a pesar de la distancia sé que están ahí para mí, apoyándome en todo momento.

Y quiero agradecer enormemente a mi esposo, por ser un pilar fundamental en esta aventura maravillosa que decidimos vivir, siempre complaciente y amoroso.

INDICE

	Pág.
RESUMEN.....	1
SUMMARY.....	2
INTRODUCCIÓN.....	3
El Parásito.....	3
Ciclo de Vida y Vías de Transmisión	3
Enfermedad de Chagas Congénito.....	4
La Placenta Humana.....	5
Respuesta Inmunológica de la Madre y Feto/Recién Nacido.....	6
Posibles Mecanismos Antiparasitarios de la Placenta Humana.....	6
Recambio del Trofoblasto	7
Esquema 1. Recambio epitelial del trofoblasto.....	8
Caspasas.....	9
Caspasa 8.....	9
Efectos de la Infección de <i>T. cruzi</i> sobre el Trofoblasto.....	11
HIPÓTESIS.....	12
OBJETIVOS.....	13
General.....	13
Específicos.....	13
MATERIALES Y MÉTODOS.....	14
Cultivos Celulares.....	14
Cultivo de células Vero.....	14
Cultivo de células BeWo.....	14
Obtención de formas infectivas de <i>T. cruzi</i>	14
Infección de células BeWo con tripomastigotes de <i>T. cruzi</i>	15
Western Blot.....	15
Inmunofluorescencia.....	16
Tinción nuclear DAPI	16
Amplificación de DNA por PCR en tiempo real.....	17
Inhibición de la actividad de caspasa 8 en células BeWo.....	18

Actividad enzimática.....	18
Determinación de la proliferación celular por incorporación de Bromodesoxiuridina	18
Determinación de la diferenciación celular por detección de β -hCG	19
Análisis estadístico	19
Bioseguridad.....	19
Financiamiento.....	19
RESULTADOS.....	20
<i>T. cruzi</i> induce la activación de caspasa 8 en células BeWo.....	20
La inhibición de caspasa 8 incrementa la infección por <i>T. cruzi</i>	21
Inhibición de la actividad de caspasa 8 no altera la incorporación de Bromodesoxiuridina como marcador de proliferación celular.....	21
Inhibición de la actividad de caspasa 8 disminuye la secreción de β -hCG como marcador de diferenciación celular.....	22
Inhibición de la actividad de caspasa 8 previene el aumento de actividad de caspasa 3 en las células BeWo co-cultivadas con <i>T. cruzi</i>	22
Inhibición de la actividad de caspasa 8 no previene el aumento de apoptosis por vía intrínseca en las células BeWo co-cultivadas con <i>T. cruzi</i>	23
DISCUSIÓN.....	24
CONCLUSIÓN.....	30
FIGURAS.....	31
FIGURA 1. <i>T. cruzi</i> induce clivaje de la procaspasa 8 en células BeWo.....	31
FIGURA 2. <i>T. cruzi</i> no altera el porcentaje de células BeWo inmunorreactivas para procaspasa 8.....	32
FIGURA 3. <i>T. cruzi</i> induce activación de la caspasa 8 en células BeWo....	33
FIGURA 4. Inhibición de caspasa 8 incrementa la infección por <i>T. cruzi</i> en células BeWo.....	34
FIGURA 5. Inhibición de caspasa 8 incrementa el número de amastigotes por célula infectada.....	35
FIGURA 6. Inhibición de la actividad de caspasa 8 no altera la proliferación celular.....	36

FIGURA 7. Inhibición de la actividad de caspasa 8 disminuye la secreción de β -hCG por las células infectadas con <i>T. cruzi</i>	37
FIGURA 8. Inhibición de la actividad de caspasa 8 previene el aumento de actividad de caspasa 3 en las células BeWo co-cultivadas con <i>T. cruzi</i>	38
FIGURA 9. Inhibición de la actividad de caspasa 8 no previene el aumento de apoptosis por vía intrínseca en las células BeWo co-cultivadas con <i>T. cruzi</i>	40
Tabla 1.....	41
Esquema 2. Caspasa 8 media la diferenciación celular y muerte celular tipo apoptosis inducida por <i>T. cruzi</i> en células BeWo.....	42
REFERENCIAS.....	43
PUBLICACIONES GENERADAS	52
PRESENTACIONES EN CONGRESOS.....	55
ANEXOS	59

PUBLICACIÓN “Caspase-8 activity is part of the BeWo trophoblast cell defense mechanisms against *Trypanosoma cruzi* infection”. Carrillo *et al.*, 2016. *Experimental Parasitology* 168:9-15

RESUMEN

La enfermedad de Chagas, causada por el parásito *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*), constituye un problema de Salud Pública a nivel mundial, cada vez más relevante. Durante la transmisión congénita, el parásito alcanza al feto vía sanguínea atravesando la barrera placentaria compuesta por el trofoblasto (epitelio bi-estratificado), estroma vellositario (tejido conectivo de las vellosidades coriónicas libres) y endotelio de los capilares fetales, así como las láminas basales que separan los diferentes epitelios.

La enfermedad de Chagas congénita es producto de una compleja interacción entre el parásito, las respuestas inmunes de la madre y del feto/recién nacido y factores placentarios, siendo estos últimos los menos estudiados. Aún no se conoce con exactitud los mecanismos de invasión del parásito durante la infección congénita. Las bajas tasas de transmisión sugieren la existencia de factores antiparasitarios placentarios locales. Los epitelios constituyen una barrera física contra los patógenos y el recambio de los mismos se considera parte de la respuesta inmune innata.

T. cruzi induce proliferación, diferenciación (sincicialización) y muerte celular programada de tipo apoptosis en el trofoblasto, sugiriendo un aumento en el recambio epitelial en este tejido en particular. La caspasa 8, una molécula relacionada con la apoptosis, es también fundamental en el proceso de diferenciación y no sólo en muerte celular en el trofoblasto.

En esta tesis se estudió la participación de la caspasa 8 en respuesta a la infección con *T. cruzi* en una línea celular de trofoblasto humano (BeWo). Para ello, se trabajó con la línea celular de trofoblasto (BeWo), expuestas a tripomastigotes de *T. cruzi* (cepa Y) en bajas y altas concentraciones, suero fetal bovino, Forskolina, Staurosporina y/o inhibidor de actividad de la caspasa 8 durante 48 horas. *T. cruzi* induce clivaje y subsecuente activación de la caspasa 8. La inhibición de esta proteasa permite un incremento de la carga parasitaria a expensas del número de amastigotes en las células infectadas. Así mismo, la inhibición de caspasa 8 altera el proceso de diferenciación y muerte celular sin alterar la proliferación.

Los resultados entregados en la presente tesis, basados en un modelo *in vitro*, sugieren claramente que la proteína caspasa 8 está involucrada en la respuesta celular defensiva frente a la infección por *T. cruzi*, aportando mayores conocimientos acerca de la interacción hospedero-parásito en el Chagas congénito.

SUMMARY

Chagas disease, caused by the protozoan parasite *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*), constitutes a public health problem around the world, every time more relevant. In congenital transmission, the parasite reaches the fetus through the blood, crossing the placental barrier formed by trophoblast, (bi-stratified epithelium), villous stroma (connective tissue of the free chorionic villous) and endothelium of fetal capillaries, as well as basal laminae that separates both epitheliums.

Congenital Chagas disease is the consequence of complex interaction between the parasite, the immune responses from the mother and the fetus/newborn and placental factors, being the latter the least-studied factor. Even not known exactly the invasion mechanism of the parasite during congenital infection. Low transmission rates suggest the presence of local placental defense mechanisms. Epithelium constitute a physical barrier against pathogens and their turnover is considered part of innate immune response.

T. cruzi induces proliferation, differentiation and apoptosis in the trophoblast, suggesting an increase in trophoblast turnover. Caspase 8 is an essential molecule not only during apoptotic cell death but also during trophoblast differentiation.

On this work we study the role of caspase 8 in response to *T. cruzi* infection in BeWo cells (a trophoblast cell line). For this, BeWo cells were exposed to *T. cruzi* trypomastigotes (Ypsilon strain) in high and low concentrations, fetal bovine serum, Forskolin, Staurosporine and IETD-CHO (caspase 8 inhibitor) during 48 hours. *T. cruzi* induces cleavage of caspase 8 and its activity. The inhibition of caspase 8 activity increases parasite infection by increasing the number of intracellular parasites. As expected, inhibition of caspase 8 does not affect cell proliferation, but disrupts the cellular differentiation and apoptotic cell death.

This results shown in this work, based on an *in vitro* model, clearly suggest that caspase 8 is implicated in the defensive cellular response on *T. cruzi* infection providing knowledge about host-parasite interaction on congenital Chagas.

INTRODUCCION

La enfermedad de Chagas o Tripanosomiasis Americana es una parasitosis crónica, sistémica, de transmisión vectorial, causada por el parásito protozoario *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*). Constituye un importante problema de salud pública en Latinoamérica, afectando de 8 a 12 millones de personas en países endémicos. En las últimas décadas se ha reportado que la migración de personas infectadas, es parcialmente responsable de la presencia de la enfermedad en países no endémicos de América y el Mundo (1). En Chile, la parasitosis es endémica en las regiones biogeográficas del norte y centro (2). Tiene una firme vinculación con aspectos socio-económico-culturales deficitarios y es considerada una de las "Enfermedades Tropicales Desatendidas" que han recibido poca atención y recursos a pesar de su magnitud e impacto tanto en el desarrollo económico como en la calidad de vida (3,4).

En la mayoría de los individuos infectados una respuesta inmune efectiva es capaz de controlar la infección inicial, mas no de erradicarla. La consecuente infección de por vida está asociada al resultado de una respuesta inflamatoria que puede generar posteriormente cardiopatías y megasíndromes digestivos, con una morbilidad significativa y eventualmente la muerte en el 30 – 40% de los pacientes afectados (5).

El Parásito

T. cruzi es un protozoario hemoflagelado del orden *Kinetoplastida* y familia *Tripanosomatidae* (6). El ciclo biológico del parásito incluye tres formas celulares; tripomastigote: forma celular no replicativa e infectiva, que se encuentra en el intestino posterior del triatomino y en la sangre de los mamíferos infectados, diseminando así la infección a través de la circulación a otros órganos. Epimastigote: representa la forma parasitaria reproductiva y no infectiva en el intestino del vector y amastigote: que es la forma replicativa intracelular en el mamífero hospedero (7).

Ciclo de Vida y Vías de Transmisión

Esta enfermedad se transmite naturalmente por insectos hematófagos e involucra a diferentes especies del género *Triatoma*, conocidos comúnmente como vinchucas, chipos, chinches o “kissing bugs” (4).

La transmisión de la enfermedad se produce principalmente cuando el insecto infectado con *T. cruzi*, después de alimentarse con la sangre de mamíferos, deposita sus

deyecciones contaminadas con tripomastigotes metacíclicos (forma infectante) en la piel. Los parásitos penetran al hospedero a través de la piel por un mecanismo facilitado por la acción mecánica producto del rascado autoinfligido del hospedero y enzimas proteolíticas que se encuentran en la saliva del insecto (8). En el mamífero, los tripomastigotes son fagocitados por células presentadoras de antígeno como macrófagos y leucocitos, en las cuales se diferencian intracelularmente a amastigotes. Después de un cierto número de replicaciones, éstos se diferencian a tripomastigotes, lisan la célula y escapan a la circulación sanguínea alcanzando tejidos como el miocardio, el músculo esquelético, músculo liso visceral, células gliales del sistema nervioso y la placenta en caso de embarazo (9).

El ciclo se completa cuando otro insecto vector se alimenta de un mamífero infectado e ingiere tripomastigotes sanguíneos, los cuales se diferencian a epimastigotes en el intestino del insecto, para así replicarse (4).

Otras formas importantes de infección son las transfusiones de sangre, trasplantes de órganos (10), infección por vía oral a través de la ingesta de alimentos contaminados (11) y la transmisión transplacentaria en madres chagásicas (12). Estas formas alternativas de infección han ganado progresivamente importancia epidemiológica (3,13), especialmente en áreas no endémicas y en países endémicos donde la transmisión vectorial ha sido controlada. Estas formas alternativas de transmisión, en particular la transmisión congénita o vertical, son parcialmente responsables de la “globalización de la enfermedad de Chagas”, lo que constituye un problema de salud pública de importancia cada vez mayor (4).

Enfermedad de Chagas Congénito

La infección congénita por *T. cruzi* se asocia con trabajo de parto prematuro, bajo peso al nacer y mortinatos. Alrededor del 50% de los bebés prematuros nacidos de madres chagásicas no sobreviven y los neonatos supervivientes pueden sufrir hepatoesplenomegalia, meningoencefalitis, miocarditis o manifestaciones gastrointestinales graves (14). La fisiopatología exacta de la infección congénita es desconocida, sin embargo, el parásito cruza la barrera placentaria para infectar al feto (3,15).

A nivel mundial, como resultado del control del vector, el número de nuevos casos de la enfermedad de Chagas por año ha disminuido en gran medida, desde 700.000 en 1990 hasta 41.000 en 2006 (1). No obstante, se registraron en el año 2006, 14.385 nuevos casos de Chagas congénito. Por lo que, esta vía de transmisión es de creciente importancia

epidemiológica (4). Se ha reportado, que la seroprevalencia en mujeres embarazadas puede ser tan alta como 81%, y que los rangos de infección congénita fluctúan entre 1% y 21% (14). Las tasas de transmisión congénita varía entre países, áreas geográficas, localidades rurales y urbanas, que van entre el 2,4% y el 18,2% (1).

En Chile, en un estudio realizado en la provincia de Choapa, IV Región, se reportó una prevalencia de infección en mujeres embarazadas por *T. cruzi* de un 3,4% con una tasa de transmisión congénita de 4,7% para el período 2005-2009, lo que coincide con lo observado en otros estudios científicos internacionales (1,15)

El hecho de que sólo un porcentaje de madres infectadas transmitan la infección al feto sugiere que la placenta presenta la habilidad de evitar la transmisión parasitaria (7,16). Se piensa que el establecimiento de la enfermedad de Chagas congénito es producto de una compleja interacción entre el parásito, la respuesta inmune materna y del feto/recién nacido y factores placentarios (16).

La Placenta Humana

La placenta es un órgano transitorio y es responsable del intercambio metabólico entre la madre y el feto. Está conformado por tejidos maternos y fetales, formando así una interfase entre la circulación materna y fetal. Además, posee la capacidad de secretar hormonas y tiene funciones inmunomoduladoras tanto del sistema inmune de la madre como del feto, facilitando tanto el control de posibles infecciones como la tolerancia inmunológica del feto (17).

La placenta humana se clasifica como hemocorial vellositaria, cuya unidad morfofuncional está constituida por las vellosidades coriónicas libres, en las cuales se localiza la barrera placentaria, compuesta por trofoblasto vellositario, estroma vellositario que contiene los capilares fetales y láminas basales que delimitan los distintos epitelios (17).

El trofoblasto es un epitelio bi-estratificado, formado por una capa superficial, el sincitiotrofoblasto (ST) y una capa basal, el citotrofoblasto (CT). El ST está en contacto directo con la sangre materna que circula por el espacio intervelloso (ó cámara hemática) y baña al árbol vellositario. El ST está formado por una capa celular continua, ininterrumpida y multinucleada, que no posee potencial replicativo. En cambio, el CT constituye la capa epitelial basal germinativa (17).

Durante la transmisión congénita, los distintos patógenos, incluido *T. cruzi*, atraviesan la barrera placentaria para así lograr infectar al feto (3,7,18).

Respuesta Inmunológica de la Madre y Feto/Recién Nacido

El sistema inmune es fundamental para proteger a la madre contra el medio externo y para prevenir el daño al feto. Así, durante el embarazo el sistema inmune materno es caracterizado por una red reforzada de reconocimiento celular y molecular para mantener el bienestar de la madre y el feto. Por otro lado, el feto proporciona un sistema inmune activo en desarrollo, que modifica la respuesta de la madre al medio ambiente (7).

Se ha demostrado una fuerte asociación entre infecciones intrauterinas y desordenes del embarazo como el aborto, parto prematuro y restricción de crecimiento intrauterino. Interesantemente, la infección por *T. cruzi* está asociada a todos ellos (19).

Un factor crucial en la prevención, limitación y permisibilidad de la infección en el feto/recién nacido, es la capacidad de la madre y el feto de establecer una respuesta innata y/o una respuesta inmune específica contra patógenos (20). Así, la producción de citoquinas pro-inflamatorias puede ser observada en recién nacidos no infectados de madres infectadas. Mientras que niveles de marcadores de inflamación y la activación de células NK son más bien bajas en recién nacidos infectados congénitamente. Por ende, la respuesta inmune innata, en los recién nacidos no infectados, juega un rol protector (7,15,21).

Posibles Mecanismos Antiparasitarios de la Placenta Humana

Debido a las bajas tasas de transmisión se postula que factores sistémicos y locales antiparasitarios previenen la transmisión congénita de *T. cruzi*, dentro de los cuales los factores placentarios son los menos estudiados (16).

Recientemente se ha planteado que la placenta podría ejercer un rechazo del parásito en el espacio intervelloso, basándose en estudios que han demostrado una relación entre la infección congénita, la parasitemia y la supervivencia de *T. cruzi* en el entorno de la placenta, postulando que diferentes poblaciones de *T. cruzi* tienen diferentes capacidades de supervivencia en el medio ambiente placentario (7,22).

El trofoblasto es el primer tejido de la barrera placentaria en entrar en contacto con los parásitos circulantes de la sangre materna (3,9) y como epitelio de revestimiento actúa como una barrera anatómica y es parte del sistema inmune innato (23). Una vez los patógenos

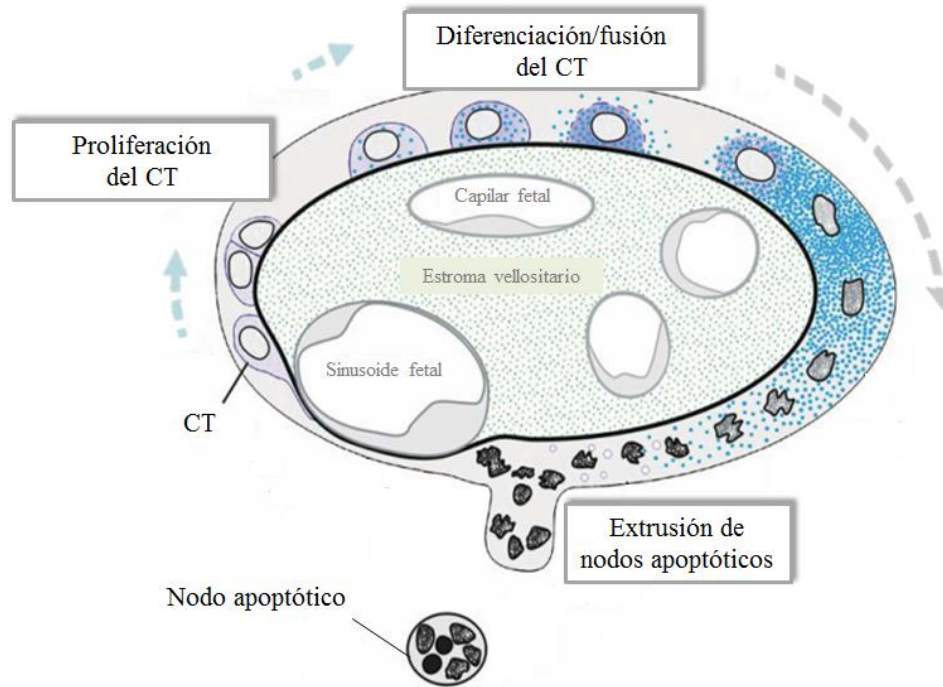
invasores logran atravesar la barrera anatómica, las células de la inmunidad innata son activadas y secretan citoquinas y quimioquinas para controlar al patógeno (23).

Se ha evaluado la susceptibilidad diferencial a la infección por *T. cruzi*, de ambas capas celulares del trofoblasto; ST y CT (24). El ST es más resistente a la infección, implicando que las células del ST pueden limitar la invasión y/o la reproducción de *T. cruzi*. Por otro lado, las células del CT son altamente susceptibles a ser infectadas por *T. cruzi*. Es así como se ha propuesto que la barrera placentaria intacta, puede limitar la infección producida por el agente causal de la enfermedad de Chagas *in vitro*. Al igual que contra otros agentes infecciosos tales como *Listeria monocytogenes* (25), *Plasmodium falciparum* (26) y el virus de la inmunodeficiencia humana (HIV) (27).

Es importante destacar, que el recambio epitelial es considerado parte del sistema inmune innato, ya que los agentes patógenos antes de ingresar a las células, deben adherirse a la superficie de éstas y al ser continuamente eliminadas, el patógeno adherido se elimina junto con ellas. Se ha descrito en el intestino, que frente a agresiones parasitarias el epitelio responde aumentando su velocidad de recambio como mecanismo de defensa activo frente a la agresión de patógenos (28,29). El recambio epitelial del trofoblasto también se ha propuesto como posible mecanismo antiparasitario local de la placenta humana (16).

Recambio del Trofoblasto

El recambio del trofoblasto es altamente regulado y es fundamental para el mantenimiento óptimo de la barrera placentaria. Implica la proliferación del CT (células germinativas), la diferenciación, donde las células del CT se fusionan con el ST, la progresión hacia la muerte celular apoptótica y la extrusión de grupos de núcleos apoptóticos rodeados de membrana plasmática sincicial, a la circulación materna como nodos sinciciales (17).



Esquema 1. Recambio epitelial del trofoblasto. Modificado de “Pathology of the Human Placenta”. 2006, 5ta Edn.

Aún no se comprenden a totalidad los mecanismos involucrados en la regulación del recambio del trofoblasto, sin embargo, todos estos eventos son críticos para el mantenimiento de esta capa epitelial (17).

La proliferación celular en el trofoblasto vellositario está confinada a las células del CT y disminuye a medida que la gestación avanza. La diferenciación del trofoblasto, es el proceso en el cuál las células del CT se fusionan (fusión sincicial) con el ST, involucra una secuencia coordinada de eventos, que implica la salida del ciclo celular, la desintegración de las membranas celulares y la incorporación del citoplasma, núcleo y organelos en el sincicio. Las células hijas del CT se fusionan con la capa del sincicio suprayacente, mientras que las células parentales mantienen su fenotipo de células madre. Por lo tanto, la integridad del trofoblasto depende de la fusión sincicial (17,30). El principal marcador bioquímico de diferenciación/fusión del trofoblasto es la β -hCG, ya que es secretada por el ST (16,17).

La iniciación y activación de la cascada de la apoptosis se presenta en la etapa de diferenciación temprana del CT y se considera un requisito previo para la fusión sincicial. Esta

etapa de iniciación de la apoptosis, todavía reversible, no se continúa inmediatamente con la consiguiente etapa de ejecución, ya que es focalmente detenida durante 3 a 4 semanas durante la fusión sincicial, debido a la traducción de gran cantidad de proteínas anti-apoptóticas de la familia Bcl-2 (30).

Más tarde, en la etapa irreversible de la apoptosis, las caspasas efectoras se activan en el ST durante las etapas finales características de la cascada de apoptosis. Conjuntos de núcleos apoptóticos tardíos se extruyen del ST hacia la circulación materna mediante la formación de nodos sinciciales, contrarrestando de esta manera la incorporación constante de células del CT al ST (17,30). Situaciones patológicas pueden surgir frente a alteraciones en los procesos de proliferación, diferenciación/fusión y apoptosis (17).

Interesantemente, la etapa de iniciación de la apoptosis es responsable también de la salida de células del CT desde el ciclo celular y su entrada en la vía de diferenciación (30). Existen fuertes evidencias de que la caspasa 8 (caspasa iniciadora) está implicada no sólo en la apoptosis, sino también en los procesos de proliferación y diferenciación en diversos tipos celulares y tejidos (31,32).

Caspasas

Las caspasas son una familia de proteasas involucradas principalmente en la muerte celular de tipo apoptosis. Aunque actualmente se les han encontrado funciones no apoptóticas y participación en distintos procesos celulares como; activación de citoquinas proinflamatorias, migración celular (33), proliferación y diferenciación terminal de una variedad de células como es el caso de las fibras del cristalino (29), queratinocitos (34), macrófagos (35) así como también el trofoblasto (36,37).

Las caspasas son cisteína proteasas específicas de ácido aspártico que tienen una cisteína en su sitio activo y producen proteólisis en un residuo de ácido aspártico de sus sustratos (38).

Caspasa 8

La caspasa 8 es considerada, clásicamente, como la caspasa iniciadora de la vía extrínseca de la apoptosis. Esta enzima se expresa como precursor inactivo llamado procaspasa 8, contiene un prodominio, una subunidad larga y una subunidad corta (39,40). Se activa por autoproteólisis inducida por proximidad, en donde intervienen proteínas

adaptadoras con dominios de muerte. Producto de su clivaje se libera el prodominio y se ensamblan las subunidades restantes conformando el sitio activo (41,42). Entre las distintas caspasas involucradas en el proceso de diferenciación del trofoblasto, es la más estudiada (36,37).

Experimentos con explantes de vellosidades coriónicas placentarias humanas (HPCVE) y con células de trofoblasto humano (BeWo) arrojan evidencia que la caspasa 8 juega un rol clave en el proceso de diferenciación y fusión. La procaspasa 8 se localiza predominantemente en las células del CT y la caspasa 8 activa se encuentra en células del CT a punto de fusionarse con el ST, por lo que se ha deducido que la caspasa 8 se activa en el CT altamente diferenciado, justo antes de la fusión y acompaña el contenido celular durante la fusión en el ST (31,37,43).

La incubación de HPCVE de primer trimestre, con oligonucleótidos antisentido o péptido inhibidor (z-IETD-FMK) en contra de la caspasa 8 induce a la formación de capas múltiples de CT, como resultado del deterioro de la fusión y no debido al aumento de proliferación. Esto se ha comprobado en células BeWo, en las cuales el silenciamiento de la caspasa 8 suprime la fusión celular (43,44).

Se ha reportado que la actividad de la caspasa 8 es un requisito previo para la diferenciación y fusión sincicial del trofoblasto. Entre otros requisitos previos para la fusión sincicial se encuentran la reorganización del citoesqueleto y de lípidos de membrana. Esto puede ser visualizado por la degradación de la α -fodrina (45) y la externalización de fosfatidilserina desde la capa interna hacia la capa externa de la membrana plasmática (46–48). Ambos eventos tienen lugar en el CT altamente diferenciado e importantemente, la caspasa 8 participa en éstos (37,44).

La función exacta de la caspasa 8 en la diferenciación/fusión del trofoblasto, todavía no se ha determinado adecuadamente. La caspasa 8 no actuaría como un fusógeno real, ya que no es capaz de fusionar directamente dos membranas. Sin embargo, basado en el conocimiento de otros factores implicados en la diferenciación del trofoblasto, la caspasa 8 puede actuar río arriba “preparando” a la célula para la fusión, donde deben ocurrir procesos de señalización celulares complejos para lograr la remodelación de la arquitectura de la membrana y el citoesqueleto (31,37,44).

Efectos de la Infección de *T. cruzi* sobre el Trofoblasto

Durante el proceso de infección e invasión de las vellosidades coriónicas humanas, el parásito interactúa con diferentes elementos celulares y moleculares de la barrera placentaria (9), induciendo desprendimiento del trofoblasto, así como también destrucción de la matriz extracelular del estroma vellositario y las láminas basales de la barrera placentaria (18,49), lo que coincide con observaciones obtenidas de placentas provenientes de madres chagásicas (18).

Se ha reportado que *T. cruzi*, a bajas concentraciones, induce proliferación celular y diferenciación celular en cultivos celulares de trofoblasto humano (BeWo) y en HPCVE (16,50). Altas concentraciones de *T. cruzi*, inducen apoptosis en el trofoblasto (51).

Sin embargo, se desconoce el efecto de *T. cruzi* sobre la caspasa 8, que presenta un rol importante tanto en la diferenciación como en la muerte celular tipo apoptosis en el trofoblasto. Por ende, en la presente tesis se estudió el posible rol de la caspasa 8 en respuesta a la infección con *T. cruzi* en la línea celular de trofoblasto humano (BeWo) más utilizada para el estudio de este epitelio.

HIPÓTESIS

La infección por *Trypanosoma cruzi* aumenta la activación de la caspasa 8 en una línea celular de trofoblasto humano (BeWo), aumentando su proliferación celular, diferenciación celular, así como la muerte celular de tipo apoptosis. La inhibición de caspasa 8 aumenta la infección por el parásito.

OBJETIVOS

Objetivo General:

Estudiar el posible rol de la caspasa 8 frente a la infección con *T. cruzi* en una línea celular de trofoblasto humano (BeWo).

Objetivos Específicos:

1. Evaluar el efecto de la infección con *T. cruzi* sobre la expresión y activación de la caspasa 8 en células BeWo.
2. Estudiar la susceptibilidad de las células BeWo a la infección con *T. cruzi* ante la inhibición de la caspasa 8.
3. Determinar el efecto de la inhibición de la caspasa 8 en la proliferación, diferenciación y muerte celular frente a la infección con *T. cruzi* en células BeWo.

MATERIALES Y MÉTODOS

Cultivos Celulares

- 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 cm² (250 ml) con medio de cultivo Roswell Park Memorial Institute 1640 (RPMI 1640, Gibco®) suplementado con bicarbonato de sodio (NaHCO₃) 2 mg/ml, estreptomycin 50 µg/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 humedecido con CO₂ al 5%, reemplazando el medio cada 24 o 48 horas (52).
- Cultivo de células BeWo: Células BeWo (células derivadas de trofoblasto humano (coriocarcinoma) ATCC® CCL-98™) fueron cultivadas en frascos de cultivo celular de 75 cm² (250 ml) con medio Dulbecco's Modified Eagle Medium F-12 (DMEM/F-12, Gibco®) suplementado con 1,2 mg/ml de NaHCO₃, 50 µg/ml de estreptomycin, 50 UI/ml de penicilina y enriquecido con SFB inactivado con calor (a 56°C durante 30 minutos) al 10%, incubadas a 37°C en un ambiente humedecido con CO₂ al 5%, sustituyendo el medio cada 24 a 48 horas (16,53,54).

Obtención de formas infectivas de *T. cruzi*

Tripomastigotes cepa Ypsilon (Y) de *T. cruzi* fueron obtenidos a partir de cultivos de células Vero infectadas con el parásito. Las células Vero fueron cultivadas como se describió más arriba y una vez en semi-confluencia, se infectaron con 1 a 2 ml de medio con tripomastigotes provenientes de un cultivo anterior. De esta forma, los tripomastigotes invaden a las células Vero, se diferencian intracelularmente en amastigotes, proliferan y después de 72 horas se diferencian nuevamente a tripomastigotes, lisan las células Vero y son liberados al medio de cultivo. Posteriormente, 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 ascendieran 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*. Finalmente, los tripomastigotes fueron resuspendidos en medio RPMI y contados en una cámara de Neubauer (9).

Infección de células BeWo con tripomastigotes de *T. cruzi*

Las células BeWo fueron co-cultivadas en presencia y ausencia de tripomastigotes de la cepa Y, en una relación célula:parásito 1:0,1 y 1:1, durante 48 horas en medio de cultivo DMEM-F12 con antibióticos y SFB inactivado al 10%. Se utilizó como control positivo: a) SFB al 20% para proliferación celular, b) Forskolina 50 μ M para inducir la fusión celular (diferenciación celular) y c) Staurosporina 1 μ M para inducción de apoptosis mediada por caspasas (31,53).

Western Blot

Las células BeWo fueron incubadas con buffer de lisis RIPA (Radio immunoprecipitation Assay Buffer, 25 mM TRIS HCl pH 7.6, 150 mM NaCl, 1% deoxicolato de sodio, 0.1% SDS e inhibidores de proteasas Complete Mini (Roche®). Los lisados celulares fueron obtenidos a partir de un raspado de los pozos de cultivo, posteriormente sometidos a ultrasonicación por 1 minuto e incubados en hielo por 20 minutos. Seguidamente, fueron sedimentados a 15.000 g por 20 minutos para eliminar el material insoluble (55). Se recolectó el sobrenadante y en él se determinó la concentración de proteínas mediante el kit BCA Protein Assay Kit® basado en el método del ácido bicinconírico (BCA), con Albúmina de Suero bovino como estándar (52). Luego, 75 μ g de proteínas de cada muestra, fueron separadas en geles de SDS-PAGE al 8% y transferidas a membranas de nitrocelulosa. Las membranas fueron bloqueadas con un bloqueador comercial (Bløk™-PO, Merck Millipore®), seguido de 3 lavados de 5 minutos con TBS-T 0,1% (Tris 0,2 M, NaCl 1,5 M, pH 7,6, Tween20 0,1%), y posteriormente fueron incubadas durante toda la noche a 4°C con los anticuerpos primarios monoclonales anti-caspasa 8 (caspase-8 (8CSP03): sc-56070, Santa Cruz Biotechnology®) o anti-caspasa 8 clivada (Cleaved Caspase-8 (Asp391)(18C8) (Rabbit mAb #9596) Cell Signalling Technology®), utilizando una dilución 1:1000 v:v. Posteriormente, los anticuerpos unidos se detectaron por una incubación durante 2 horas con anticuerpos secundarios adecuados para cada anticuerpo primario; IgG anti-ratón para revelar el anticuerpo de la caspasa 8 total e IgG anti-conejo para detectar el anticuerpo de la caspasa 8 clivada, conjugados con peroxidasa de rábano picante y utilizando una dilución de 1:2500 v:v en ambos ensayos (Santa Cruz Biotechnology®). Las proteínas inmunorreactivas fueron detectadas mediante quimioluminiscencia siguiendo las instrucciones del fabricante (Pierce ECL, Thermo Scientific®) (52). Seguidamente, las membranas se incubaron en una solución

de “stripping” (62.5 mM Tris-HCl, pH 6.8, 2% SDS y 50 mM β -mercaptoetanol) a 50°C durante 30 minutos para ser reutilizadas y revelar el control de carga. Para ello, las membranas fueron lavadas 3 veces con TBS-T 0,1% y bloqueadas con leche descremada al 3% para la detección de la proteína Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH, sc-51905, mAb Anti-ratón, Santa Cruz Biotechnology®) como control de carga, las membranas se incubaron con el anticuerpo primario contra GAPDH durante la noche a 4°C, a una dilución 1:5000 v:v, seguido de una incubación de 1 hora con el anticuerpo secundario (anti-ratón IgG, Santa Cruz Biotechnology®) conjugado con peroxidasa de rábano picante, en una dilución 1:2500 v:v. Las proteínas inmunorreactivas fueron detectadas usando reactivo de quimioluminiscencia siguiendo las instrucciones del fabricante (Pierce ECL, Thermo Scientific®). Se utilizó el programa ImageJ v 1,34 (National Institute of Health, Bethesda, Maryland, EEUU) para el análisis densitométrico de las bandas, los resultados se expresarán como la razón de proteína blanco versus GAPDH (55).

Inmunofluorescencia

2 x 10⁴ células BeWo fueron sembradas en cubreobjetos redondos y una vez culminados los procedimientos experimentales, las células fueron fijadas con paraformaldehído 4% tamponado por 10 minutos y permeabilizadas con metanol por 20 minutos. Seguidamente se realizaron 3 lavados con una solución buffer salina (PBS: NaCl 135 mM, KCl 2,7 mM, Na₂HPO₄ 10 mM, KH₂PO₄ 1,8 mM) por 5 minutos y el bloqueo se realizó con albumina de suero bovino (BSA) al 3% por 1 hora a 37°C. Posteriormente fueron incubadas con el anticuerpo primario respectivo; para la procaspasa 8 (caspase-8 (8CSP03): sc-56070, Santa Cruz Biotechnology®) en una dilución 1/200 v/v y para el neo-epítipo de la citoqueratina 18 (M-30 CytoDEATH, Roche® 2140322) en una dilución 1/200 v/v por 2 horas. Se realizaron 3 lavados con PBS y se detectó el complejo antígeno-anticuerpo, mediante anticuerpos secundarios fluorescentes de color rojo Rodamina-anti-ratón IgG para la procaspasa 8, y de color verde FITC-anti-ratón IgG para el neo-epítipo de la citoqueratina 18. Posteriormente se continuó con la tinción DAPI y la captura de imágenes (descrito más abajo).

Tinción nuclear DAPI

Para complementar los análisis de inmunofluorescencia, así como también para realizar el conteo de células y parásitos, los núcleos celulares fueron teñidos con DAPI 1

µg/ml (4, 6-diamino-2-fenilindol, Molecular Probes®), por 5 minutos, seguido de 3 lavados con PBS por 5 minutos. Posteriormente se agregó una gota de medio de montaje acuoso para fluorescencia VECTASHIELD a cada muestra y finalmente se analizaron en el microscopio de epifluorescencia (Motic BA310; Hong Kong, China). Las imágenes fueron capturadas con la cámara acoplada al microscopio (Moticam 5, Hong Kong, China). La captura de imágenes fue realizada al azar en cada condición experimental. Los parásitos fueron reconocidos por su diferencia de tamaño, morfología nuclear y presencia de núcleo y kinetoplasto. Para contabilizar el número de células infectadas, así como la cantidad de parásitos intracelulares, se utilizó el método de conteo automático MATLAB® (54). En los ensayos de inmunofluorescencia se utilizó el software ImageJ v.1.34 (National Institutes of Health, Bethesda, MD) para su análisis y la sobreposición de imágenes.

Amplificación de DNA por PCR en tiempo real

Para realizar los ensayos de carga parasitaria, las células BeWo fueron cosechadas por tripsinización y se extrajo el DNA genómico mediante el kit de purificación de DNA genómico Wizard (Promega®) siguiendo las instrucciones del fabricante. La solución de DNA se resuspendió en agua estéril libre de endonucleasa y se almacenó a -20°C hasta su uso. La concentración de DNA se cuantificó mediante “µDropPlate DNA quantification system®” en un lector Varioskan Flash Multimode (Thermo Scientific®). Para la amplificación del DNA humano y del parásito se utilizaron dos pares de partidores específicos; se amplificó una secuencia de 100pb correspondiente a GAPDH humana, utilizando los partidores hGDH-F (5'-TGATGCGTGTACAAGCGTTTT-3') y hGDH-R (5'-ACATGGTATTACACCACCCCACTAT-3'), que fueron diseñados con el software Primer Express (versión 3.0; Applied Biosystems®) y para la detección de *T. cruzi* se amplificó una secuencia de 182 pb de DNA correspondiente al DNA satélite de *T. cruzi* mediante el uso de los partidores TCZ-F (5'-GCTCTTGCCCACAMGGGTGC-3') y TCZ-R (5'-CAAGCAGCGGATAGTTCAGG-3') (48).

Cada mezcla de reacción contenía 10 µM de cada primer, 2,5 ng de DNA de las muestras, 10 µL de Sensi Mix SYBR Green Master Mix (Bioline®) y H₂O libre de nucleasas para completar 20 µL. La amplificación se realizó en el termociclador para PCR en tiempo real ABI Prism 7300 sequence detector (Applied Biosystems®).

El programa de ciclos fue el siguiente: pre-desnaturalización a 50°C durante 2 minutos, desnaturalización a 95°C durante 10 minutos y 40 ciclos de amplificación de: 95°C (15s), 60°C (15s) 72°C (30s). Finalmente, una etapa de disociación, que va desde 95°C a 60°C. El análisis de cuantificación relativa de los resultados se expresó como valor RQ (cuantificación relativa) según el método del doble control comparativo ($\Delta\Delta Ct$) (49,56).

Inhibición de la actividad de caspasa 8 en células BeWo

Las células BeWo fueron incubadas con 5 μM de péptido inhibidor permeable Ac-IEDT-CHO (inhibidor irreversible) por un periodo de incubación de 48 horas (Calbiochem®) (44). En este ensayo experimental los controles se mantuvieron bajo las mismas condiciones en ausencia de parásitos, con Forskolina y con inhibidores.

Actividad enzimática

La actividad enzimática de caspasa 8 (Caspase-Glo 8, Promega®) y caspasa 3 (Caspase-Glo 3/7, Promega®) se determinó mediante kits comerciales siguiendo las instrucciones del fabricante, fundamentados en la luminiscencia producto del clivaje de sustratos luminogénicos específicos para cada una de estas enzimas (Ac-LETD-pNA para caspasa 8 y Ac-DEVD-pNA para caspasa 3). La luminiscencia fue leída con el lector de microplacas Varioskan Flash Multimode (Thermo Scientific®). Los resultados fueron normalizados con respecto a los valores obtenidos en la condición control.

Determinación de la proliferación celular por incorporación de Bromodesoxiuridina

La proliferación celular se determinó mediante la incorporación de BrdU por el método ELISA (Bromodeoxyuridine Cell Proliferation Kit, BioAssay™ (USBiological)) siguiendo las instrucciones del fabricante. Las células BeWo fueron cosechadas por tripsinización desde las botellas de cultivo, sedimentadas a 500 g por 5 minutos y resuspendidas en medio de cultivo fresco. Posteriormente se sembraron 2×10^3 células BeWo en placas de 96 pocillos con 10 μM de BrdU y se infectaron con tripomastigotes de *T. cruzi* en una proporción de 1:0,1 y 1:1 célula:parásito con o sin la presencia del inhibidor de caspasa 8. Los controles se mantuvieron bajo las mismas condiciones en medio DMEM-F12 con o sin Forskolina, con o sin inhibidor, además de los controles sugeridos por el fabricante para el kit. La incorporación de BrdU se determinó espectrofotométricamente en un lector Varioskan Flash Multimode (Thermo Scientific®).

Determinación de la diferenciación celular por detección de β -hCG

Las concentraciones de β -hCG en los sobrenadantes de las células BeWo se determinaron utilizando el kit ELISA β -hCG (Bioclone®). Los sobrenadantes de los cultivos se recolectaron y se centrifugaron a 3.000 g durante 5 minutos a 4°C para eliminar los desechos celulares. El sobrenadante se dispensó en placas de 96 pocillos recubiertas con anticuerpo anti-hCG y se incubó durante 5 minutos a temperatura ambiente (57). Después de la incubación, se lavó y se realizó el tratamiento con el anticuerpo secundario de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La densidad óptica (OD) fue leída a 450 nm usando el lector de microplacas (Varioskan Flash Multimode, Thermo Scientific®). Los resultados fueron normalizados en relación de la cantidad de μ g de proteína presente en cada sobrenadante y respecto a la condición control.

Análisis estadístico

Cada experimento fue realizado en triplicado y al menos en tres oportunidades distintas. Las variables cuantitativas se expresaron como promedio más desviación estándar y se analizaron según su distribución con el “test t” o “test ANOVA”, seguido por el post test de “Dunetts” o post test de “Tuckey” dependiendo del estudio. Los resultados fueron graficados utilizando el programa computacional GraphPad Software PRISM 6.0 (GraphPad® Software). Se consideró un $p \leq 0,05$ como estadísticamente significativo.

Bioseguridad

Los experimentos fueron desarrollados en el “Laboratorio de Mecanismos de Infección Parasitaria”, ubicado en el Instituto de Ciencias Biomédicas de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile; que cuenta con los requerimientos de Bioseguridad necesarios (A2) certificados por la “Unidad de Prevención de Riesgos y Bioseguridad de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile”.

Financiamiento

Los experimentos fueron desarrollados bajo el financiamiento de los siguientes proyectos: FONDECYT 1120230 (UK); 1130113 (NG); 1130189 (JM) y ERANET-LAC ELAC2014/HID-0328.

RESULTADOS

***T. cruzi* induce la activación de caspasa 8 en células BeWo**

Células BeWo fueron incubadas en presencia y ausencia de tripomastigotes de *T. cruzi* (razón célula:parásito 1:0,1 y 1:1) así como en presencia y ausencia de Forskolina (50 μ M) (como control positivo por ser inductor de fusión (53,58)) o IEDT-CHO (5 μ M) (péptido inhibidor de caspasa 8) durante 48 horas. La expresión de la procaspasa 8 fue determinada mediante western blot; no se observan cambios significativos en el análisis densitométrico de la procaspasa 8 en presencia del parásito ni en presencia del control positivo (Forskolina) (Fig. 1A). En cambio, si se observa un aumento significativo del fragmento p18 en las células tratadas con Forskolina (782,8% ($p \leq 0,001$)), así como también en presencia del parásito tanto a bajas concentraciones (relación célula:parásito 1:0,1) 269,4% ($p \leq 0,05$) como en altas concentraciones del parásito (relación célula:parásito 1:1) un 338,1% a las 48 horas respecto al control sin infección ($p \leq 0,01$) (Fig. 1B).

Adicionalmente, se analizó la expresión de procaspasa 8 mediante inmunofluorescencia. Se confirmaron los análisis de western blot, ya que no se aprecian cambios en el porcentaje de células inmunorreactivas entre las distintas condiciones experimentales (Fig. 2A). Sólo el 5,2% del total de células analizadas mostró inmunorreactividad para la procaspasa 8 en la concentración baja de infección y un 5,0% en la infección alta, mostrando así valores similares al control que arrojó un porcentaje de inmunorreactividad de 4,4% (Fig 2B). Estos resultados fueron obtenidos mediante la cuantificación celular manual de las imágenes obtenidas, donde se estableció como criterio contabilizar al menos 1000 células por cada condición experimental (Tabla 1). Es necesario destacar que las células infectadas, en su mayoría no muestran inmunorreactividad para procaspasa 8 (Fig. 2A). Lo cual se podría explicar por la presencia de esta procaspasa sólo en células proliferativas (44,59) y apoyando así el mecanismo propuesto como respuesta defensiva frente a los parásitos (16).

El análisis de la actividad enzimática de caspasa 8 evidencia que, en presencia de Forskolina se produce un aumento en la actividad de la caspasa 8 (165,7% ($p \leq 0,01$)) (Fig 3). Ambas concentraciones de parásitos ensayados inducen un incremento significativo en la actividad de la caspasa 8 en un 171,2% ($p \leq 0,01$) y 176,3% ($p \leq 0,001$) respectivamente (Fig. 3).

Este efecto fue revertido en presencia del inhibidor, que no presentó diferencia significativa con respecto al control sin infectar. Estos datos complementan los resultados obtenidos anteriormente mediante western blot.

La inhibición de caspasa 8 incrementa la infección por *T. cruzi*

Células BeWo fueron incubadas en presencia y ausencia de tripomastigotes de *T. cruzi* (razón célula:parásito 1:0,1 y 1:1) así como en presencia y ausencia de IEDT-CHO (5 μ M) durante 48 horas. Se determinó el grado de infección en las células BeWo expuestas a ambas concentraciones del parásito y se apreció que al inhibir la caspasa 8 se aumenta significativamente la carga del DNA parasitario. Siendo un 223,1% ($p \leq 0,05$) el incremento del DNA parasitario en la concentración baja de infección al inhibir la caspasa 8 (Fig. 4A) y 195,1% ($p \leq 0,01$) en la concentración alta de infección con la inhibición de la proteasa (Fig. 4B).

Paralelamente, se realizó un ensayo con tinción DAPI, a partir del cual se obtuvo el porcentaje de células infectadas, así como el número de parásitos por célula infectada, utilizando un contador automatizado software MATLAB[®] (54), considerando contar al menos 1000 células por cada condición experimental a las 48 horas post-infección (Tabla 1). La presencia del inhibidor no altera significativamente el porcentaje de células infectadas (Fig. 5A), pero sí, se obtuvo un aumento significativo del número de amastigotes por célula infectada frente a la concentración baja y alta de parásitos ($p \leq 0,0001$) y ($p \leq 0,05$), respectivamente (Fig. 5B).

Inhibición de la actividad de caspasa 8 no altera la incorporación de Bromodesoxiuridina como marcador de proliferación celular

Células BeWo fueron incubadas en presencia y ausencia de tripomastigotes de *T. cruzi* (razón célula:parásito 1:0,1 y 1:1) así como en presencia y ausencia de SFB (20%) o IEDT-CHO (5 μ M) durante 48 horas. En las células tratadas con SFB se observa un incremento significativo de la incorporación de Bromodesoxiuridina (BrdU) (256,3%, $p \leq 0,01$). Asimismo, tanto en la concentración baja como alta de parásitos, se incrementa significativamente la proliferación celular 196,8% ($p \leq 0,05$) y 248,2% ($p \leq 0,01$) respectivamente. La presencia del inhibidor no altera significativamente la incorporación de BrdU en las células BeWo

infectadas con *T. cruzi* a las 48 horas, siendo un 227,4% en la concentración baja de parásitos y 258,4% en la concentración alta (Fig. 6).

Inhibición de la actividad de caspasa 8 disminuye la secreción de β -hCG como marcador de diferenciación celular

Células BeWo fueron incubadas en presencia y ausencia de tripomastigotes de *T. cruzi* (razón célula:parásito 1:0,1 y 1:1) así como en presencia y ausencia de Forskolina (50 μ M) o IEDT-CHO (5 μ M) durante 48 horas. La secreción de β -hCG fue utilizada como marcador de diferenciación celular de trofoblasto en el sobrenadante de los cultivos experimentales (6,58). Forskolina induce un aumento significativo en la secreción de β -hCG (353,5%, $p \leq 0,01$) y en presencia de ambas concentraciones del parásito también se incrementa la secreción de β -hCG significativamente. Así, se observa un aumento de un 174,4% ($p \leq 0,001$) en la concentración baja de parásitos y un aumento de un 155,0% ($p \leq 0,001$) en la concentración alta de tripomastigotes. Se apreció que, en las células infectadas con bajas y altas concentraciones de parásitos, tratadas a su vez con el péptido inhibidor de caspasa 8, hay una disminución significativa de la secreción de β -hCG, hasta un 124,0% y 107,7% ($p \leq 0,05$), respectivamente en comparación con las células infectadas no tratadas con el inhibidor. Por el contrario, en células a las cuales se les induce la diferenciación con Forskolina, se observó una mayor secreción de β -hCG en presencia del inhibidor ($p \leq 0,001$) (Fig. 7).

Inhibición de la actividad de caspasa 8 previene el aumento de actividad de caspasa 3 en las células BeWo co-cultivadas con *T. cruzi*

Células BeWo fueron incubadas en presencia y ausencia de tripomastigotes de *T. cruzi* (razón célula:parásito 1:0,1 y 1:1) así como en presencia y ausencia de Staurosporina (1 μ M) o IEDT-CHO (5 μ M) durante 48 horas. El tratamiento con el control positivo (Staurosporina) generó un incremento significativo (131,0% ($p \leq 0,01$)) de la actividad enzimática de caspasa 3, que es prevenida con el inhibidor de caspasa 8 (86,4% ($p \leq 0,0001$)). Se apreció que en las células infectadas con bajas y altas concentraciones de parásitos también induce un aumento significativo la actividad enzimática de la caspasa 3 (144,5% ($p \leq 0,0001$) y 127,9% ($p \leq 0,01$), respectivamente). En los cultivos infectados con ambas concentraciones de parásitos y tratados

con el inhibidor para caspasa 8 hay una disminución significativa de la actividad de caspasa 3, alcanzando niveles similares al control (Fig. 8).

Inhibición de la actividad de caspasa 8 no previene el aumento de apoptosis por vía intrínseca en las células BeWo co-cultivadas con *T. cruzi*.

En las mismas condiciones experimentales descritas en el punto anterior, se analizó la vía intrínseca de apoptosis mediante el análisis de la presencia del neo-epítipo de la citoqueratina 18 (CK18), donde el análisis cuantitativo arrojó como resultado que el porcentaje de células inmunorreactivas en el cultivo tratado con Staurosporina se incrementa significativamente (12,4% ($p \leq 0,01$)) con respecto al control (3,7%). El porcentaje de células inmunorreactivas también se incrementa frente a ambas concentraciones del parásito, siendo el 10,6% ($p \leq 0,01$) en la concentración baja de parásitos y en la concentración alta el 16,2% ($p \leq 0,0001$), manteniéndose estos porcentajes en presencia del inhibidor (Fig. 9A-9B). Además, se evaluó el porcentaje de células infectadas e inmunorreactivas (Tabla 1), donde del 10,6% de células inmunorreactivas en la infección baja, sólo el 21,2% corresponde a las células infectadas y en presencia del inhibidor de caspasa 8 disminuye hasta un 13,9%. En presencia de la alta concentración de parásitos del 16,2% de células inmunorreactivas, el 38,0% corresponde a células infectadas, cuyo porcentaje disminuye en presencia del inhibidor de caspasa 8 hasta un 24,9%. Estos resultados se obtuvieron mediante la cuantificación celular manual de las imágenes obtenidas, donde se estableció como criterio contabilizar al menos 1000 células a las 48 horas por cada condición experimental.

DISCUSIÓN

Durante el proceso de la transmisión congénita, *T. cruzi* debe cruzar la barrera placentaria, en donde el trofoblasto es el primer tejido placentario en contacto con la sangre materna, en la cual circula el parásito (3,6,51).

Las bajas tasas de transmisión congénita de *T. cruzi*, junto a la escasa evidencia de nidos de amastigotes en placentas provenientes de madres chagásicas (18), así como también en modelos *ex vivo* infectados experimentalmente (9), sugieren que podrían existir mecanismos antiparasitarios locales en la placenta humana (16). Más aún, los nidos de amastigotes sólo pueden ser visualizados en explantes de placenta humana infectados *ex vivo*, cuando se es removido enzimáticamente el trofoblasto de los mismos (60).

En este sentido, el recambio del trofoblasto cobra vital importancia ya que permite mantener intacta la barrera anatómica y forma parte de la respuesta inmune innata que podría explicar parcialmente las bajas tasas de transmisión (16). Antecedentes demuestran que la presencia del parásito induce proliferación, diferenciación (sincialización) y muerte celular programada tipo apoptosis en el trofoblasto, sugiriendo un aumento en el recambio epitelial en este tejido en particular (16,50,51,61). La diferenciación y la muerte celular por apoptosis están altamente relacionados en el trofoblasto (31), donde la caspasa 8 ha sido considerada fundamental para el proceso de diferenciación/fusión así como apoptosis durante el recambio de este epitelio (31,37).

En la presente tesis hemos analizado el efecto de *T. cruzi* sobre el trofoblasto, en un modelo *in vitro*; la línea celular derivada de coriocarcinoma BeWo, que es la más ampliamente utilizada para el estudio de este tejido (53). Esta línea celular puede ser manipulada y mantenida en una etapa no diferenciada, es decir, células de tipo CT. Además, se puede inducir su diferenciación/fusión celular, dentro de 48 a 72 h mediante la adición de Forskolina o de Adenosina monofosfato cíclico (AMPc) al medio de cultivo (53,58). Durante el proceso de diferenciación/fusión celular, las células BeWo muestran un aumento en la expresión de marcadores de sincialización como β -hCG, Sincitina-1, GCM-1 y otros (53,62), como también la disminución en la expresión de moléculas de adhesión celular como la desmoplaquina y la E-cadherina (53).

Es importante destacar que las células BeWo pueden ser infectadas *in vitro* con tripomastigotes de *T. cruzi* (54). La infección de células BeWo con una concentración baja de

parásitos induce incremento de expresión de proteínas fusogénicas (sincitinas), expresión y secreción de β -hCG, disminución de proteínas relacionadas a las uniones intercelulares como la desmoplaquina, y a partir de ensayos de fusión de dos colores se ha podido evidenciar claramente que *T. cruzi* induce fusión de células BeWo (16).

Nuestros resultados demuestran que *T. cruzi*, tanto a bajas como altas concentraciones, es capaz de inducir el clivaje y la consecuente activación de la caspasa 8 a las 48 horas (Fig. 1 y Fig. 3). Las caspasas están presentes en todas las células como zimógenos llamados procaspasas, los cuales son activados mediante su clivaje, generando subunidades que posteriormente forman las caspasas activas (63). Se conocen principalmente por su rol en la cascada de apoptosis, pero recientemente se ha descrito su participación en otros procesos celulares como proliferación, diferenciación y motilidad celular, entre otros (32). Aunque no se observaron cambios en la expresión de la proforma con los ensayos de western blot e inmunofluorescencia (Fig 1 y 2), sí existe un incremento marcado en su clivaje y activación (Fig. 1 y 3).

Es necesario destacar que, la mayoría de las células BeWo infectadas con *T. cruzi* no muestra inmunorreactividad para procaspasa 8 (Fig. 2). Teniendo en cuenta que la procaspasa 8 puede ser localizada sólo en células proliferativas (44,59), cobra relevancia el hecho que la infección induzca la posible salida del ciclo celular, apoyando el mecanismo propuesto como la respuesta celular a *T. cruzi* (16). A su vez, esto podría también poner en evidencia la comunicación entre células a través de citoquinas, hormonas y exosomas que genera un efecto en células lejanas (64,65). Así como también existe la posibilidad de que factores de virulencia generados por el *T. cruzi* interactúen con el resto de las células, incluyendo células no infectadas, generando un efecto sobre el conjunto celular en estudio (66).

La caspasa 8 se ha involucrado con la proliferación celular, relacionada a la regeneración y reparación de tejidos (32). Por lo tanto, al analizar si la actividad de la caspasa 8 inducida por el parásito se relacionaba a la proliferación del trofoblasto (50) (Fig 6), se mostró que la actividad de la caspasa 8 no afecta la síntesis de DNA y esto podría explicarse por el hecho que, en el trofoblasto la caspasa 8 presenta actividad en las células de CT que han dejado el ciclo celular y han comenzado el proceso de diferenciación/fusión (67,68).

Por otro lado, la inhibición de la actividad de la caspasa 8, previene la diferenciación de las células BeWo (Fig 7), medido por la secreción de β -hCG como marcador de

diferenciación celular. Se ha demostrado anteriormente que *T. cruzi* induce no sólo la expresión y secreción de β -hCG, sino también la expresión de sincitinas (proteínas fusogénicas) siendo estos parte de los mejores marcadores de diferenciación de trofoblasto (4).

En nuestros experimentos se reprodujo el efecto de diferenciación celular inducido por la presencia del parásito (16), mientras que las células infectadas tratadas con el inhibidor de caspasa 8, presentaron una menor secreción de β -hCG (Fig.7), indicando la prevención de la diferenciación de las células BeWo (43,44). Sin embargo, la inhibición de caspasa 8 junto al estímulo químico de sincicialización (Forskolina) arrojó una mayor secreción de β -hCG, lo que resultó ser paradójico y ha sido punto de discusión en estudios previos (42). Con respecto a esto, hay un punto importante que destacar (Fig. 7) considerando que el grado de inhibición de caspasa 8 alcanzado por el IEDT-CHO es parcial, la actividad restante de caspasa 8 estaría permitiendo que se lleve a cabo un *loop* de retroalimentación positiva donde la β -hCG secretada actúa de manera autocrina, estimulando una mayor secreción por parte del sincicio formado (58,69), inducido a su vez por la Forskolina, lo cual explicaría el fenómeno observado en las células tratadas simultáneamente con Forskolina y el péptido inhibidor.

La muerte celular por apoptosis es considerada como la parte final de la diferenciación del trofoblasto que culmina con la liberación de nodos apoptóticos hacia la sangre materna, contrarrestando la incorporación continua de células del CT al ST (17). La inhibición de la actividad de la caspasa 8 inducida por el parásito previene la activación de la caspasa 3 (Fig. 8). Esta última es una caspasa efectora, proteolíticamente activada por la caspasa 8 (70). La caspasa 3 junto a otras caspasas efectoras, actúan sobre una gran variedad de sustratos facilitando la condensación de la cromatina y el desensamblaje del citoesqueleto en etapas finales de la apoptosis (71).

Existen antecedentes relacionados a estos resultados, basados en un modelo de infección *ex vivo*, donde explantes de vellosidades coriónicas placentarias humanas son infectados con *T. cruzi* y a las 24 horas post-infección se incrementa el número de células apoptóticas (51).

Durante la apoptosis, las células sufren cambios dramáticos en su morfología, en parte debido a una reorganización completa de su citoplasma y citoesqueleto (72). Estas alteraciones facilitan una rápida fragmentación de la célula en cuerpos apoptóticos, que posteriormente serán eliminados eficientemente por fagocitos (73). Es así como los filamentos intermedios del

citoesqueleto son blancos proteolíticos de la cascada apoptótica de caspasas. Se ha demostrado que la procaspasas 3, 7 y 9 tiene un blanco en común, específicamente los filamentos intermedios compuesto por citoqueratina (CK) 8 y 18 (74,75). La CK18 es inicialmente clivada en su dominio C-terminal, resultando la exposición del neo-epítotope de la CK18, que es reconocido por el anticuerpo monoclonal M30-Cytodeath, utilizado en nuestros experimentos. Las caspasas 9, 3 y 7 pueden generar el neo-epítotope reconocido por el M30, es por esto que es considerado un buen marcador de apoptosis y de fase temprana, ya que el neo-epítotope de la CK18 es inicialmente expuesto por el clivaje de la caspasa 9 (vía intrínseca de la apoptosis), aunque posteriormente la caspasa 3 (caspasa efectora) amplía este efecto (76,77).

Lo anterior explica cómo al evaluar el número de células inmunorreactivas para el neo-epítotope de la CK18, la presencia del inhibidor de la caspasa 8 no altera significativamente el porcentaje de células inmunorreactivas (Tabla 1), sugiriendo que, aunque se esté interrumpiendo parcialmente el flujo de la vía extrínseca de la apoptosis, la vía intrínseca de las caspasas podría ser la responsable de que no disminuya el porcentaje de células inmunorreactivas.

Curiosamente, al evaluar con detenimiento las células infectadas, se observó que no todas las células infectadas muestran inmunoreactividad para el anticuerpo M30 y además no todas las células inmunorreactivas están infectadas, sugiriendo que la presencia de amastigotes en el citoplasma de las células BeWo no implica apoptosis.

Interesantemente, la muerte celular programada contribuye a la respuesta inmune innata en el control de patógenos intracelulares, eliminando células infectadas y restringiendo la diseminación del patógeno (78).

Por otra parte, varios patógenos son capaces de modular la caspasa 8. Así, *Mycobacterium tuberculosis* y *Candida albicans* (79), así como *Salmonella enterica* (80) activan a la caspasa 8 induciendo la producción de citoquinas proinflamatorias. Además, algunos virus como el citomegalovirus, son capaces de inhibir la caspasa 8 favoreciendo su propagación en las células del hospedero (70). Otro parásito protozoario, *Toxoplasma gondii*, también activa la caspasa 8 en el trofoblasto e induce apoptosis en las células BeWo (81). Sin embargo, no se puede descartar si la inducción de apoptosis obedece a evadir las defensas del huésped o como limitante de la infección, debido a que en particular en el caso de *T. gondii* las tasas de transmisión congénita son considerablemente más elevadas que en *T. cruzi* (82).

Es importante destacar que los efectos producidos por los distintos patógenos, no se reducen sólo a las células infectadas, evidentemente la producción de citoquinas, hormonas, entre otros factores al espacio extracelular induce diferentes efectos en las células vecinas (57,83). Así como también diferentes factores de virulencia de los patógenos pueden afectar a distancia a otros conjuntos celulares (84). Relacionándose ampliamente con nuestros resultados, donde específicamente las células BeWo con amastigotes no generan inmunorreactividad para el marcador de apoptosis M30 (Fig 9A).

Se evidenció que la inhibición de la caspasa 8 incrementa significativamente la carga parasitaria en las células BeWo frente a ambas concentraciones del parásito (Fig. 4). Éste incremento de la cantidad de DNA del parásito no se debe a un mayor número de células infectadas sino a un mayor número de amastigotes por célula, sugiriendo así una mayor replicación del parásito frente a la inhibición de caspasa 8 (Fig 5).

Destacando que la inhibición de la caspasa 8 previene la diferenciación/fusión de las células BeWo (Fig 7), nuestros resultados de la susceptibilidad a la infección se relacionan a un reporte realizado por Díaz-Luján *et al.* 2012. En este estudio se buscó elucidar la ruta de invasión placentaria de *T. cruzi* mediante la evaluación de la susceptibilidad del trofoblasto a la infección por el parásito, luego de separar experimentalmente el ST del CT, observando que las células del CT son más susceptibles a la infección por *T. cruzi*. La importancia de ese estudio radica en que ciertas alteraciones estructurales en el ST son comúnmente encontradas en las placentas de madres chagásicas y/o se relacionan a su vez con abortos, restricción del crecimiento intrauterino y partos prematuros, enfatizando la importancia de la integridad del epitelio en la barrera placentaria (24,85). Lo anterior, sustentaría nuestros resultados, donde células BeWo no diferenciadas (CT) presentarían mayor cantidad de DNA del parásito, a expensas de un mayor número de parásitos por célula infectada.

En resumen, la inhibición de la actividad de la caspasa 8 en células BeWo infectadas con *T. cruzi* no altera la proliferación de dichas células, pero si interfiere disminuyendo su diferenciación/fusión para lo cual es requerida la actividad de la mencionada proteasa. Esta inhibición también previene parcialmente la apoptosis por vía extrínseca, sin alterar el desarrollo de la vía intrínseca, concluyendo finalmente en la apoptosis de las células BeWo. Además, la actividad de la caspasa 8 se relacionaría con el mecanismo de respuesta de las células BeWo frente a la infección por *T. cruzi* (Esquema 2).

Aunque no es fácilmente extrapolar estos efectos a lo que ocurre biológicamente en las vellosidades coriónicas durante la transmisión congénita de *T. cruzi*, estos resultados se relacionan con los antecedentes que proponen el recambio del trofoblasto como un mecanismo antiparasitario local de la placenta humana, ya que al interrumpir su secuencia se ve favorecida la infección en el modelo *in vitro* con células BeWo (86).

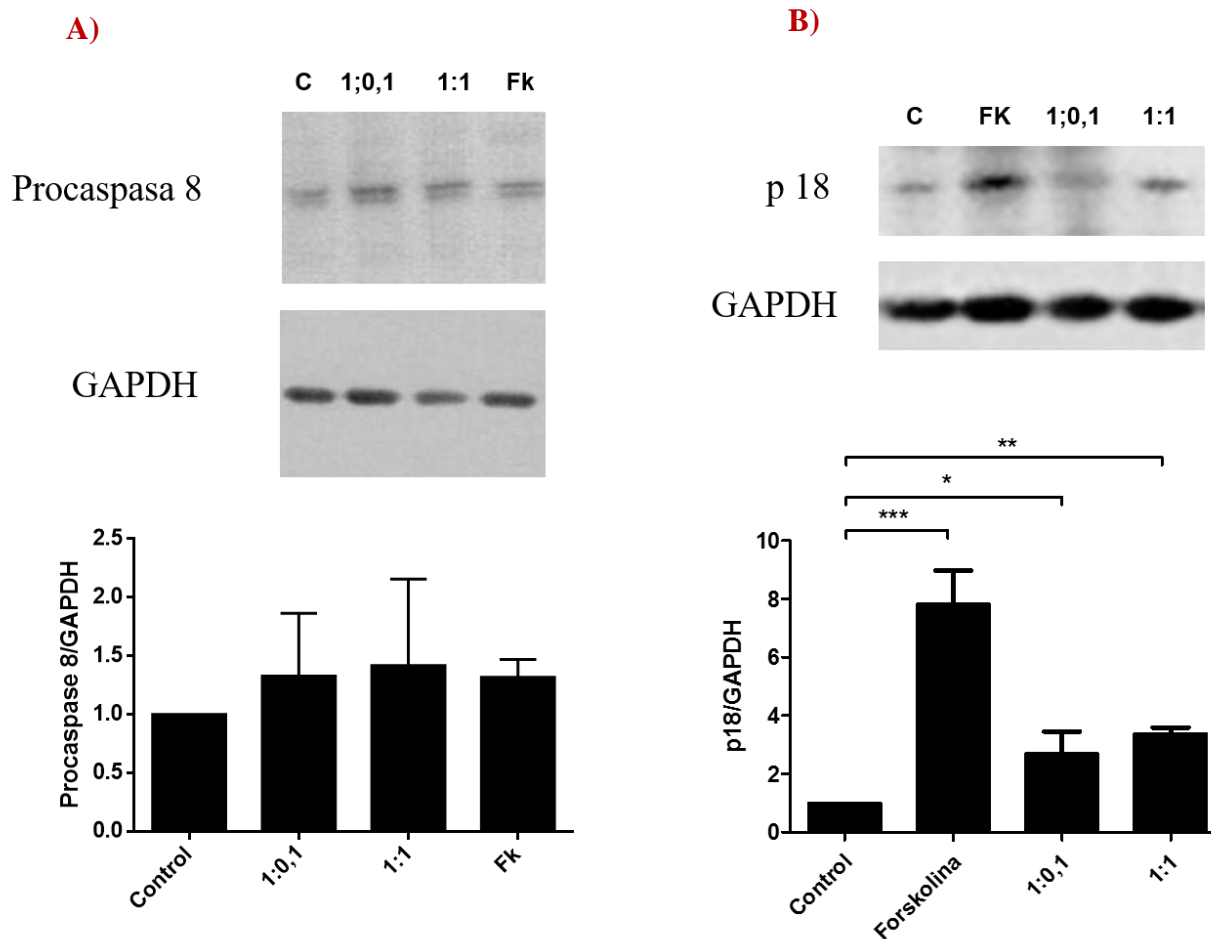
Lo anterior demuestra que las funciones que estaría cumpliendo la caspasa 8 en la diferenciación del trofoblasto, son capaces de disminuir la susceptibilidad de este epitelio frente al parásito, constituyendo una prueba de la importancia de esta proteína en los mecanismos de defensa antiparasitarios locales de la placenta humana.

Los resultados entregados en la presente tesis muestran claros indicios de que la proteína caspasa 8 está involucrada en la respuesta defensiva del trofoblasto frente a la infección por *T. cruzi*, aportando mayores conocimientos de la biología celular de este epitelio en particular y orientando hacia posibles blancos terapéuticos a evaluar en un futuro.

CONCLUSIÓN

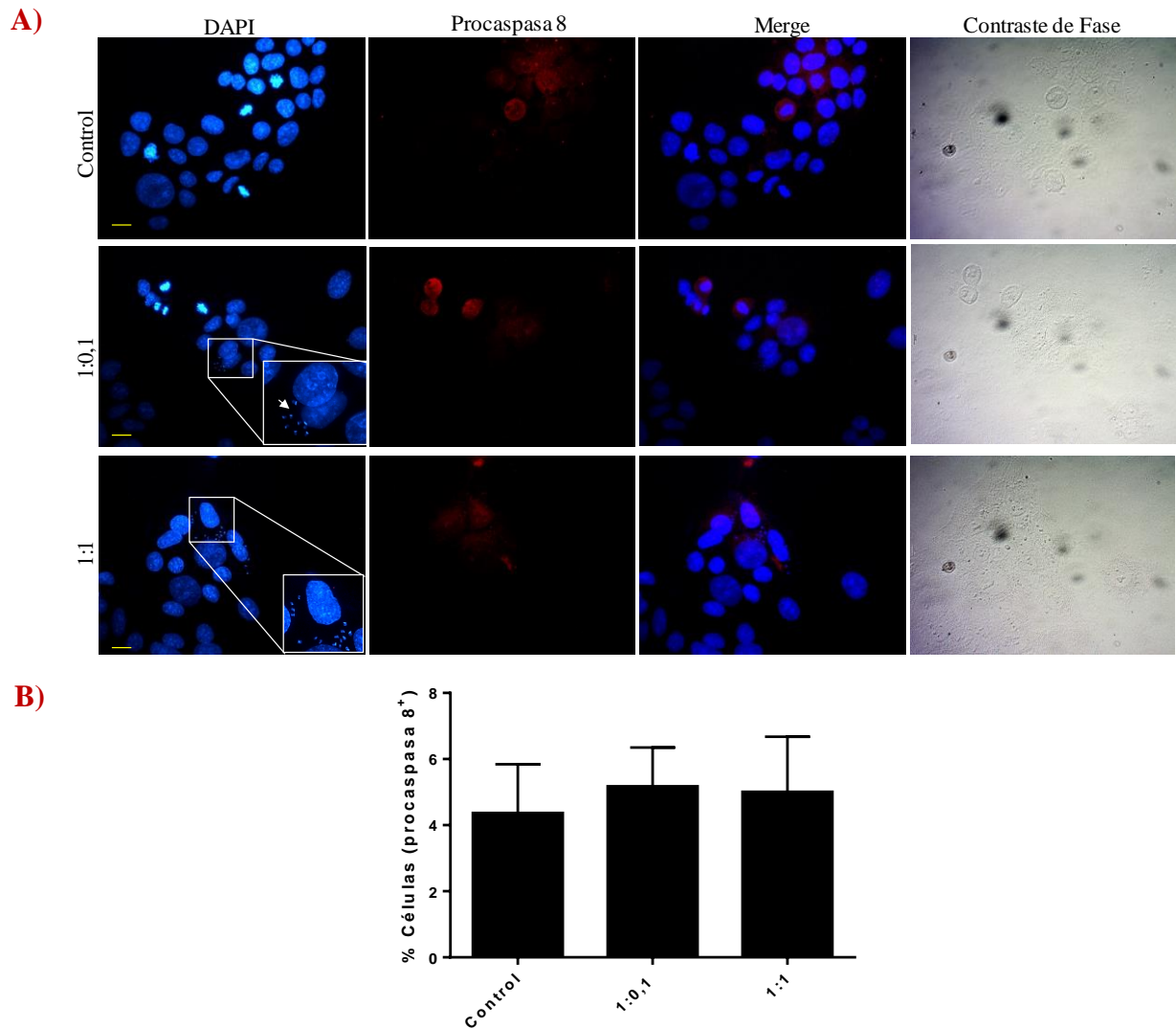
A partir de nuestros resultados podemos concluir que la actividad de la caspasa 8, media parcialmente la inducción de diferenciación causada por la presencia de *Trypanosoma cruzi*, en el modelo *in vitro* de infección con células BeWo. Se concluye, considerando además otros resultados obtenidos en otros modelos experimentales, que la caspasa 8 forma parte de los posibles mecanismos antiparasitarios del trofoblasto en la placenta humana.

Figura 1



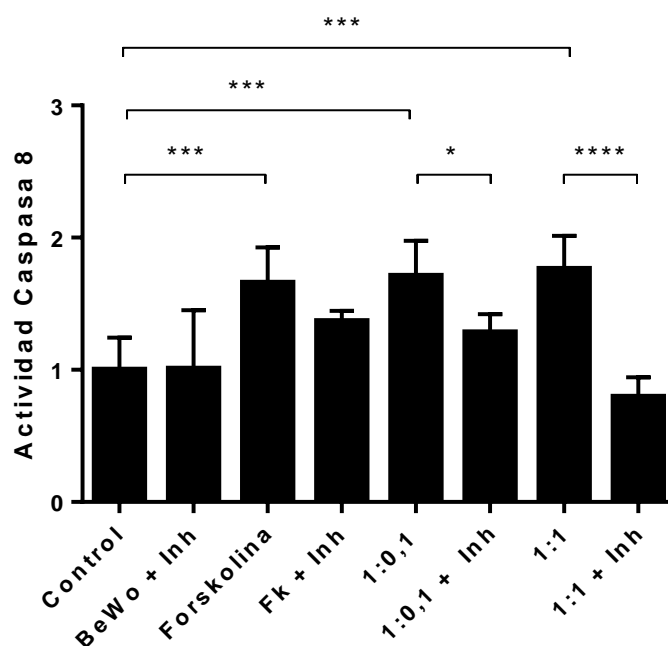
***T. cruzi* induce clivaje de la procaspasa 8 en células BeWo.** 1×10^6 células BeWo fueron incubadas en presencia o ausencia de tripomastigotes de *T. cruzi* (cepa Y) (relación célula:parásito 1:0,1 y 1:1) y en presencia de Forskolina (50 μ M) como control positivo (inductor de fusión), durante 48 horas. La expresión de la proforma de la caspasa 8 no se altera en presencia del parásito (A), a diferencia del fragmento p18 de la caspasa 8, producto del clivaje, el cual se incrementa significativamente en presencia del parásito, tanto a concentraciones bajas como altas de infección (B), en relación al control no infectado. Se muestran western blots representativos para la detección de la caspasa 8 total y de su fragmento p18 con sus respectivos gráficos. Todos los valores fueron normalizados en relación a sus controles y corresponden al promedio más desviación estándar de al menos 3 experimentos independientes hechos en triplicado. Los resultados fueron expresados como la razón Caspasa 8/ GAPDH ó p18/GADPH y analizados mediante ANDEVA seguido del test de comparación múltiple de Tukey. * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$.

Figura 2



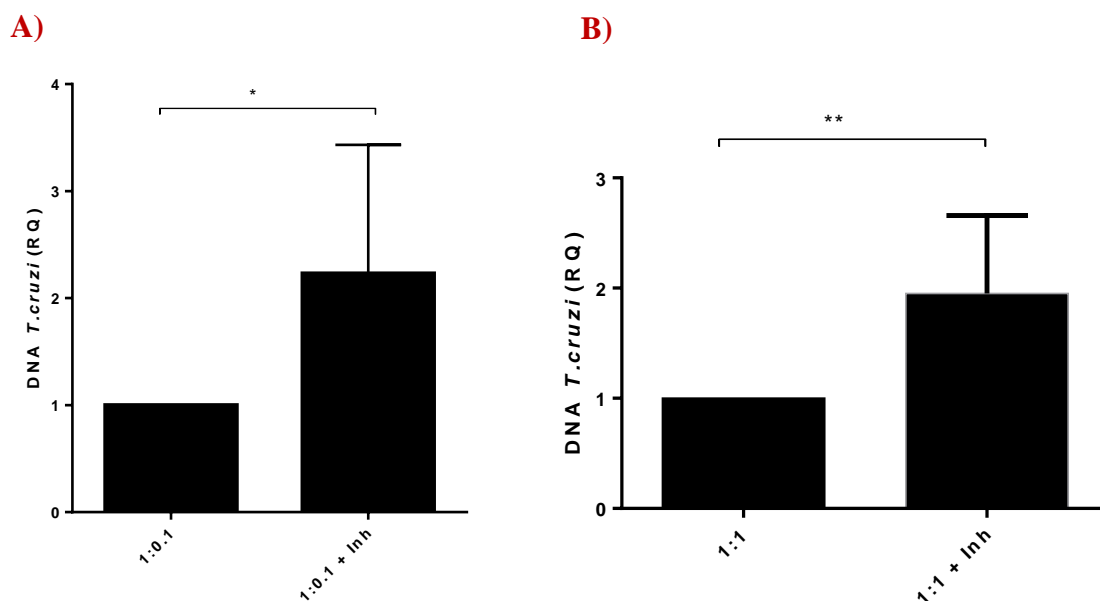
***T. cruzi* no altera el porcentaje de células BeWo inmunorreactivas para procaspasa 8.** 2×10^4 células BeWo fueron incubadas en presencia o ausencia de tripomastigotes de la cepa Y por 48 horas, en una relación célula:parásito 1:0,1 y 1:1. Las muestras fueron procesadas para inmunofluorescencia convencional. No hay diferencia significativa en el número de células inmunorreactivas para procaspasa 8 en presencia del parásito con respecto al control sin infección. En los recuadros se muestra un acercamiento a las células infectadas; detállese (flechas blancas) el núcleo y kinetoplasto de los amastigotes (forma intracelular del parásito). Barra de aumento (color amarillo): $10 \mu\text{m}$ (A). Análisis cuantitativo de células inmunorreactivas para procaspasa 8, no hay diferencia significativa entre las condiciones experimentales (B). Los valores corresponden al promedio más desviación estándar de al menos 3 experimentos independientes hechos en triplicado, analizados mediante ANDEVA seguido del test de comparación múltiple de Tukey.

Figura 3



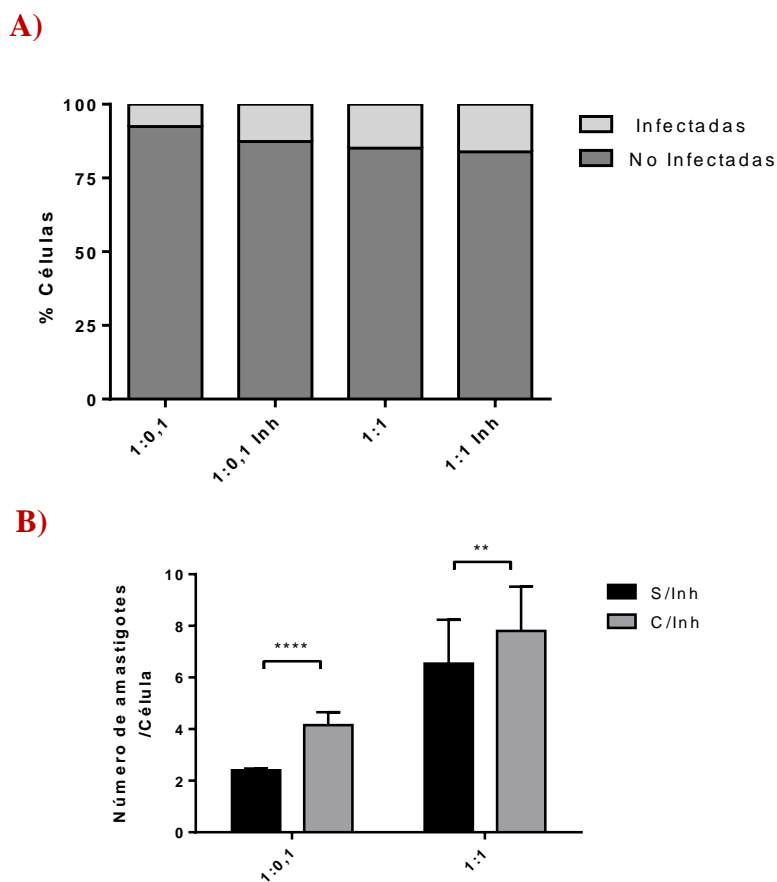
T. cruzi* induce activación de la caspasa 8 en células BeWo.** 1×10^4 células fueron incubadas en presencia o ausencia de tripomastigotes de *T. cruzi* (cepa Y) (relación célula:parásito 1:0,1 y 1:1), en presencia de Forskolina ($50 \mu\text{M}$) como control (inductor de fusión) y en presencia o ausencia de un inhibidor de activación de la caspasa 8 (IETD-CHO $5 \mu\text{M}$), durante 48 horas. Se determinó la actividad de la caspasa 8 mediante el ensayo luminométrico Caspase 8 Glo Assay[®]. La inducción de fusión con Forskolina genera un incremento significativo en la actividad de la caspasa 8 (165.7%). La concentración baja de infección induce un incremento significativo de la actividad de la caspasa 8 (171,2%,) y en presencia del inhibidor disminuye levemente su actividad. Del mismo modo, la actividad de la caspasa 8 frente a la infección a concentraciones altas del parásito mostró un incremento significativo (176,3%) y en presencia del inhibidor disminuye significativamente su actividad. Todos los valores fueron normalizados en relación a sus controles y corresponden al promedio más desviación estándar de al menos 3 experimentos independientes hechos en triplicado, analizados mediante ANDEVA seguido del test de comparación múltiple de Tukey. * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$; * $p \leq 0,0001$.

Figura 4



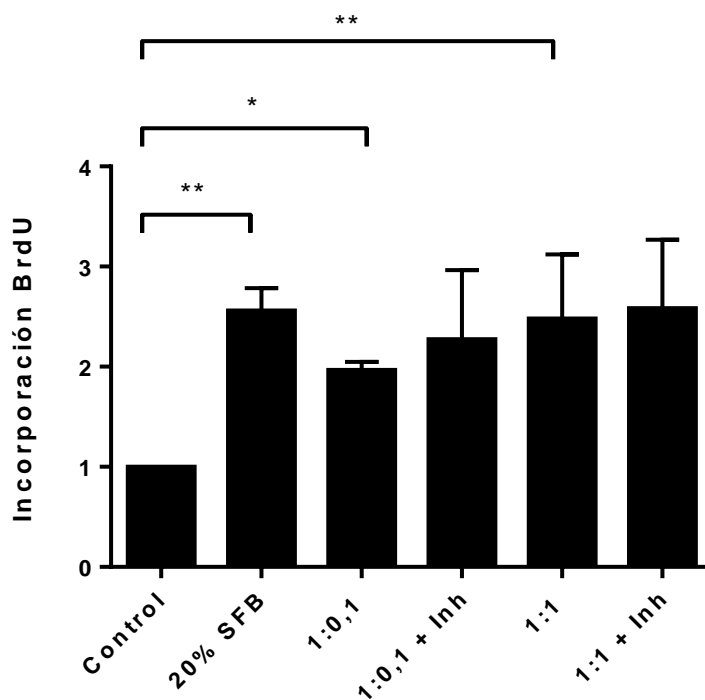
Inhibición de caspasa 8 incrementa la infectividad de *T. cruzi* en células BeWo. 2×10^5 células BeWo fueron incubadas en presencia o ausencia de tripomastigotes de *T. cruzi* (cepa Y) (relación célula:parásito 1:0,1 y 1:1), en presencia de IETD-CHO ($5 \mu\text{M}$) un inhibidor de la activación de la caspasa 8, durante 48 horas. La inhibición de la caspasa 8 incrementa en forma significativa la presencia de DNA parasitario en células BeWo al incubarlas tanto a bajas como a altas concentraciones de parásitos en un 223,1% (A) y 195,1% (B), respectivamente. La carga parasitaria fue determinada por Real Time PCR mediante el método de doble control comparativo ($\Delta\Delta\text{Ct}$). Todos los valores fueron normalizados en relación a sus controles y corresponden al promedio más desviación estándar de al menos 3 experimentos independientes hechos en triplicado. Los resultados fueron expresados como promedio más desviación estándar y analizados mediante el test T de Student. $*p \leq 0,05$; $**p \leq 0,01$.

Figura 5



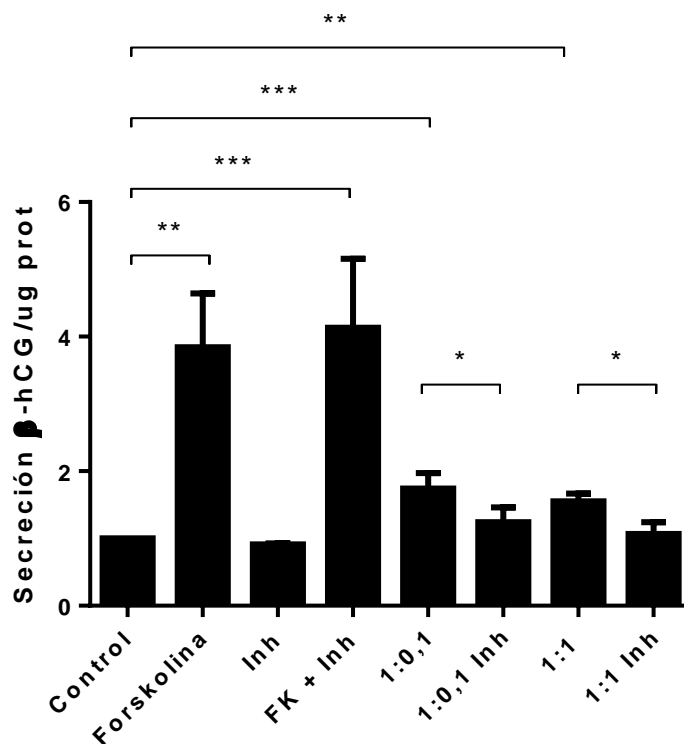
Inhibición de caspasa 8 incrementa el número de amastigotes por célula infectada. 2×10^4 células BeWo fueron incubadas en presencia o ausencia de tripomastigotes de *T. cruzi* (cepa Y) (relación célula:parásito 1:0,1 y 1:1), en presencia de IETD-CHO ($5 \mu\text{M}$) un inhibidor de la activación de la caspasa 8, durante 48 horas. La inhibición de la caspasa 8 no altera el porcentaje de células sanas e infectadas (A). Sin embargo, en presencia del inhibidor, la concentración baja y alta de infección presentan significativamente un mayor número de amastigotes por célula (B). Los resultados fueron expresados como promedio más desviación estándar y analizados mediante el test T de Student. ** $p \leq 0,01$; **** $p \leq 0,0001$.

Figura 6



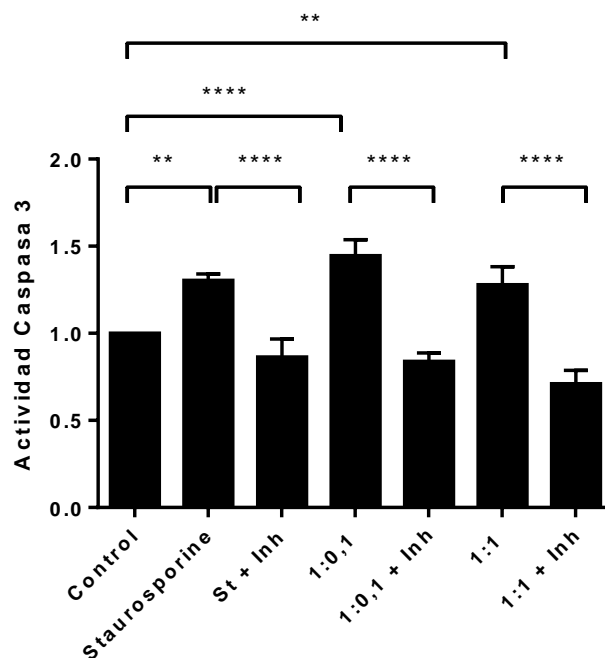
Inhibición de la actividad de caspasa 8 no altera la proliferación celular. 5×10^3 células BeWo fueron co-cultivadas en presencia o ausencia de tripomastigotes de *T. cruzi* (cepa Y) (relación célula:parásito 1:0,1 y 1:1), así como en presencia o ausencia de IETD-CHO ($5 \mu\text{M}$) (un inhibidor de activación de la caspasa 8) o SFB (20%) durante 48 horas. Se determinó la incorporación de la BrdU (marcador de proliferación) mediante el kit comercial del método ELISA; Bromodeoxyuridine Cell Proliferation Kit, BioAssay™ (USBiological). Tanto a bajas como a altas concentraciones de parásitos, se presenta un incremento significativo en la proliferación de las células BeWo. El inhibidor no induce cambios significativos en la tasa de proliferación de las células BeWo en comparación con las condiciones correspondientes. Todos los valores fueron normalizados en relación a sus controles y corresponden al promedio más desviación estándar de al menos 3 experimentos independientes hechos en triplicado, analizados mediante ANDEVA seguido del test de comparación múltiple de Tukey. $**p \leq 0,01$; $***p \leq 0,001$.

Figura 7



Inhibición de la actividad de caspasa 8 disminuye la secreción de β -hCG por las células infectadas con *T. cruzi*. 3×10^4 células BeWo fueron co-cultivadas en presencia y ausencia de tripomastigotes de *T. cruzi* (cepa Y) (relación célula:parásito 1:0,1 y 1:1), así como en presencia o ausencia de un inhibidor de activación de la caspasa 8 (IETD-CHO $5 \mu\text{M}$) y/o Forskolina ($50 \mu\text{M}$) (inductor de fusión) durante 48 horas. En presencia del inhibidor disminuye la secreción de β -HCG de las células infectadas. A diferencia de las células tratadas con Forskolina e inhibidor de caspasa 8, donde no se presenta el mismo efecto. Todos los valores fueron normalizados en relación a los μg de proteína de cada muestra y posteriormente en relación al control. Los resultados graficados corresponden al promedio más desviación estándar de al menos 3 experimentos independientes hechos en triplicado y analizados mediante ANDEVA seguido del test de comparación múltiple de Tukey. * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p < 0,001$.

Figura 8



Inhibición de la actividad de caspasa 8 previene el aumento de actividad de caspasa 3 en las células BeWo co-cultivadas con *T. cruzi*. 1×10^4 células fueron incubadas en presencia o ausencia de tripomastigotes de *T. cruzi* (cepa Y) (relación célula:parásito 1:0,1 y 1:1), en presencia de Staurosporina ($1 \mu\text{M}$) como control positivo y en presencia o ausencia de un inhibidor de activación de la caspasa 8 (IETD-CHO $5 \mu\text{M}$), durante 48 horas. Se determinó la actividad de la caspasa 3 mediante el ensayo luminométrico Caspase-Glo 3/7[®] Assay (Promega[®]). La concentración baja de infección induce un incremento significativo de la actividad de la caspasa 3 (144,5%) y en presencia del inhibidor disminuye levemente su actividad. La concentración alta de infección incrementa en menor grado, pero significativamente con respecto al control (127,9%). Todos los valores fueron normalizados en relación a sus controles y corresponden al promedio más desviación estándar de al menos 3 experimentos independientes hechos en triplicado, analizados mediante ANDEVA seguido del test de comparación múltiple de Tukey. $**p \leq 0,01$; $****p \leq 0,0001$.

Figura 9

A)

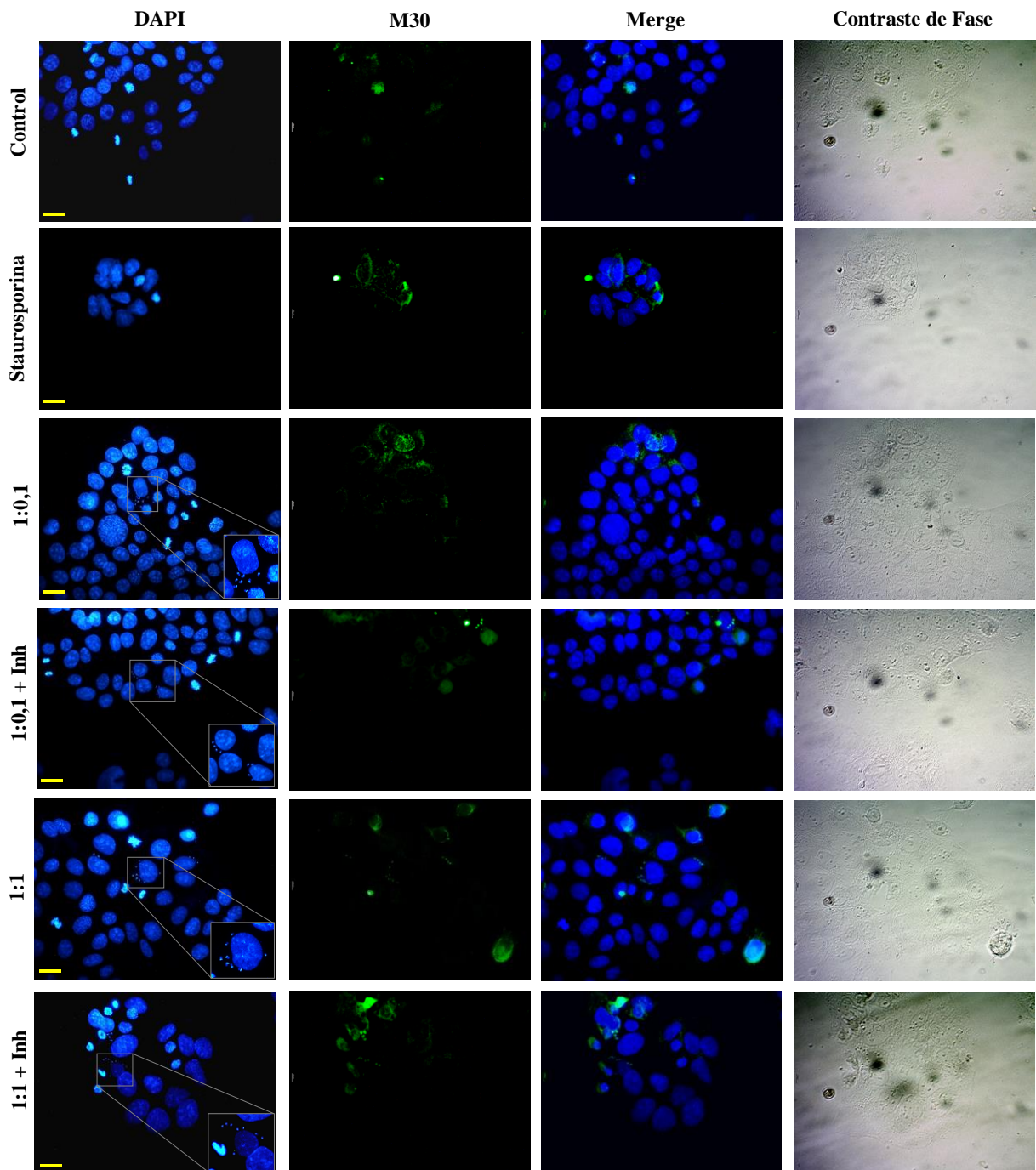
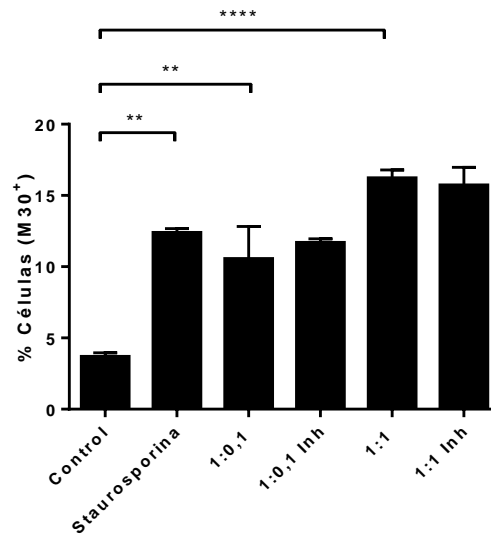


Figura 9 cont.

B)



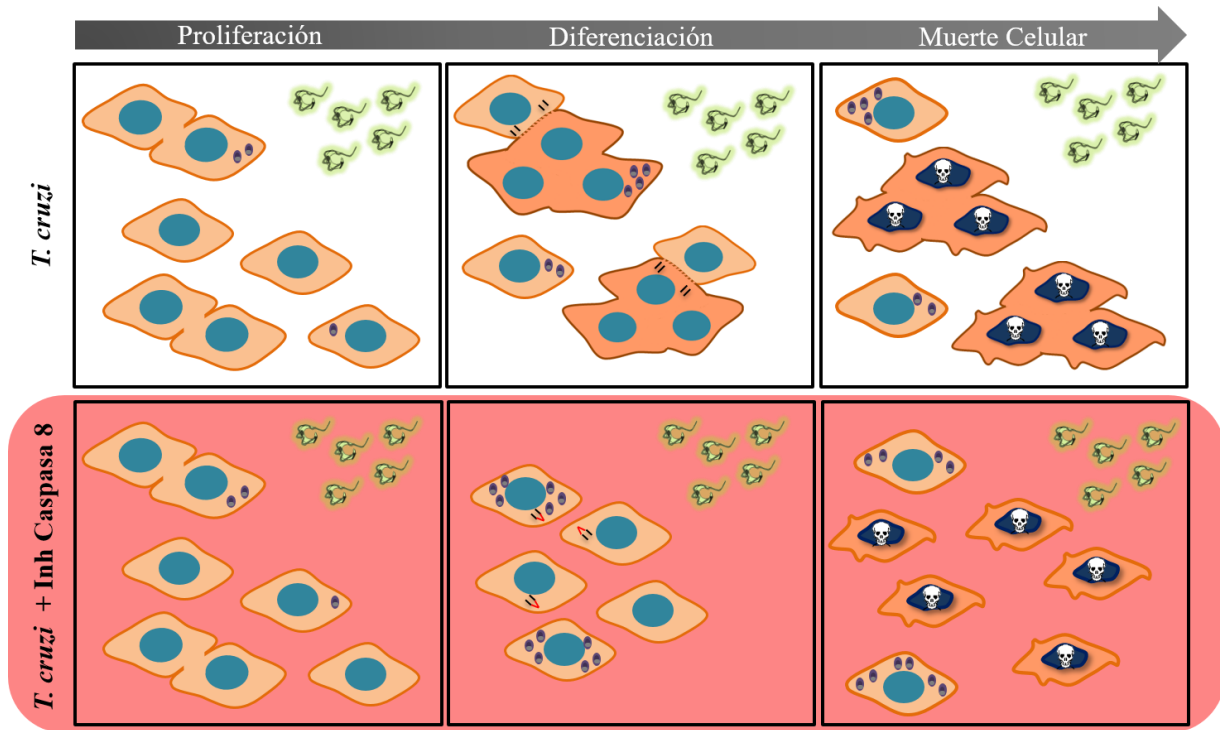
Inhibición de la actividad de caspasa 8 no previene el aumento de apoptosis por vía intrínseca en las células BeWo infectadas con *T. cruzi*. 25×10^3 células BeWo fueron cocultivadas en presencia o ausencia de tripomastigotes de *T. cruzi* (cepa Y) (relación célula:parásito 1:0,1 y 1:1), así como en presencia o ausencia de Staurosporina ($1 \mu\text{M}$) como control positivo o IETD-CHO ($5 \mu\text{M}$) (un inhibidor competitivo de la caspasa 8), durante 48 horas. Las muestras fueron procesadas para inmunofluorescencia convencional con el anticuerpo M30. En los recuadros se muestra un acercamiento a las células infectadas; detállese el núcleo y kinetoplasto de los amastigotes (forma intracelular del parásito). Barra de aumento (color amarillo): $10 \mu\text{m}$ (A). Se realizó un análisis cuantitativo de células inmunorreactivas para el neo-epítipo de la citoqueratina 18 (marcador de apoptosis). El tratamiento con Staurosporina induce un 12,4% de células inmunorreactivas para el anticuerpo M30 a las 48 horas. Del mismo modo en presencia del parásito se presentó un incremento del porcentaje de células inmunorreactivas de un 10,6% para la infección baja y de un 16,2% para la infección alta y en ambos casos la presencia del inhibidor no altera el porcentaje de las células inmunorreactivas (11,7% y 15,7%, respectivamente) (B). Todos los valores corresponden al promedio más desviación estándar de 3 experimentos independientes hechos en triplicado, analizados mediante ANDEVA seguido del test de comparación múltiple de Tukey. $**p \leq 0,01$; $****p \leq 0,0001$.

Tabla 1

		BeWo	1:0,1	1:0,1 + Inh	1:1	1:1 + Inh
0 horas		20000 c/p				
48 horas		45000 ± 17578	63333 ± 23688	54250 ± 10960	39250 ± 7425	29167 ± 6714
Procaspsa 8	% Células Casp 8 +	4,4 ± 3,0	5,2 ± 2,0	/	5,0 ± 2,9	/
	% Células contadas	Al menos 1000 células por condición experimental				
DAPI	% Células Infectadas	/	7,6 ± 3,1	12,6 ± 1,3	14,9 ± 2,0	16,1 ± 2,7
	% Células contadas	Al menos 1000 células por condición experimental				
Cytodeath (M30)	% Células M30+	3,7 ± 0,4	10,6 ± 3,9	11,7 ± 0,4	16,2 ± 0,9	15,7 ± 2,2
	% Células M30+ <i>T. cruzi</i> +	/	21,2 ± 8,8	13,9 ± 0,2	38,0 ± 16,3	24,9 ± 10,8
	% Células contadas	Al menos 1000 células por condición experimental				

Tabla 1. Cuantificación celular al inicio y al final de la fase experimental en cada una de las condiciones. También se muestra el porcentaje de inmunorreactividad para procaspasa 8 y neo-epítipo de la citoqueratina 18, así como también el porcentaje de células cuantificadas en los análisis de infección celular con tinción DAPI.

Esquema 2



Esquema 2. Caspasa 8 media la diferenciación celular y muerte celular tipo apoptosis inducida por *T. cruzi* en células BeWo: En el panel superior se ilustra que *T. cruzi* induce proliferación, diferenciación y muerte celular en células BeWo, sugiriendo un incremento del recambio epitelial. En el panel inferior se ilustra lo que ocurre al inhibir la actividad de la caspasa 8, donde sin alterar la proliferación celular se interrumpe su fusión sincicial (diferenciación) y aumenta la muerte celular de tipo apoptosis, aunque se previene la activación de la caspasa 3. Nótese que en presencia del inhibidor de caspasa 8 hay un incremento del número de amastigotes por célula infectada, sin alterar el porcentaje de infección. Es importante destacar que la inhibición de la caspasa 8 es parcial, por lo que algunas células logran igualmente fusionarse.

REFERENCIAS

1. Apt W, Zulantay I, Arnello M, Oddó D, González S, Rodríguez J, *et al.* Congenital infection by *Trypanosoma cruzi* in an endemic area of Chile: A multidisciplinary study. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2013;107(2):98 – 104.
2. Jercic MI, Mercado R, Villarroel R. Congenital *Trypanosoma cruzi* infection in neonates and infants from two regions of Chile where Chagas' disease is endemic. *J Clin Microbiol.* 2010;48(10):3824– 6.
3. Kemmerling U, Bosco C, Galanti N. Infection and invasion mechanisms of *Trypanosoma cruzi* in the congenital transmission of chagas' disease: A proposal. *Biol Res.* 2010;43(3):307– 16.
4. World Health Organization. Working to overcome the global impact of neglected tropical diseases: first WHO report on neglected tropical diseases. *Frist Who Rep Neglected Trop Dis.* 2010;93.
5. Tarleton RL, Gurtler RE, Urbina JA, Ramsey J, Viotti R. Chagas Disease and the London Declaration on Neglected Tropical Diseases. *PLoS Negl Trop Dis.* 2014;8(10):8– 13.
6. Duaso J, Castillo C, Kemmerling U. 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. *Recent Adv Res Hum Placenta.* 2012;149– 64.
7. Fretes RE, Kemmerling U. Mechanism of *Trypanosoma cruzi* placenta invasion and infection: The use of human chorionic villi explants. *J Trop Med.* 2012;7
8. Amino R, Martins RM, Procopio J, Hirata IY, Juliano MA, Schenkman S. Trialysin, a novel pore-forming protein from saliva of hematophagous insects activated by limited proteolysis. *J Biol Chem.* 2002;277(8):6207– 13.
9. Duaso J, Rojo G, Cabrera G, Galanti N, Bosco C, Maya JD, *et al.* *Trypanosoma cruzi* induces tissue disorganization and destruction of chorionic villi in an ex vivo infection

- model of human placenta. *Placenta* 2010;31(8):705–11.
10. Coura JR. Chagas disease: what is known and what is needed--a background article. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2007;102 Suppl (August):113– 22.
 11. Coura J. Transmission of chagasic infection by oral route in the natural history of Chagas disease. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2006;39(3):113– 7.
 12. Fragata Filho AA, Correia EDB, Borges Filho R, Vasconcelos MDO, Janczuk D, Martins CSDS. 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*. 2008;41(1):73– 5.
 13. Yoshida N. *Trypanosoma cruzi* infection by oral route: how the interplay between parasite and host components modulates infectivity. *Parasitol Int*. 2008;57(2):105–9.
 14. Shippey SH, Zahn CM, Cisar MM, Wu TJ, Satin AJ. Use of the placental perfusion model to evaluate transplacental passage of *Trypanosoma cruzi*. *Am J Obstet Gynecol*. 2005;192(2):586– 91.
 15. Carlier Y, Truyens C. Congenital Chagas disease as an ecological model of interactions between *Trypanosoma cruzi* parasites, pregnant women, placenta and fetuses. *Acta Trop* 2015;151(1):103– 15.
 16. Liempi A, Castillo C, Duaso J, Droguett D, Sandoval A, Barahona K, *et al*. *Trypanosoma cruzi* induces trophoblast differentiation: A potential local antiparasitic mechanism of the human placenta? *Placenta* 2014;35(12):1035– 42.
 17. Benirschke K, Burton GJ, Baergen RN. *Pathology of the Human Placenta*. 6th ed. Springer; 2012.
 18. Duaso J, Yanez E, Castillo C, Galanti N, Cabrera G, Corral G, *et al*. Reorganization of extracellular matrix in placentas from women with asymptomatic chagas disease: Mechanism of parasite invasion or local placental defense? *J Trop Med*. 2012;8

19. Bittencourt AL. Possible risk factors for vertical transmission of chagas' disease. Vol. 34, Rev Inst Med Trop. San Pablo. 1992. p. 403– 8.
20. Mor, Gil and Cardenas I. The Immune System in Pregnancy: A Unique Complexity. Am J Reprod Immunol. 2011;63(6):425– 33.
21. Hermann E, Berthe A, Truyens C, Alonso-Vega C, Parrado R, Torrico F, *et al.* Killer cell immunoglobulin-like receptor expression induction on neonatal CD8+ T cells in vitro and following congenital infection with *Trypanosoma cruzi*. Immunology. 2010;129(3):418–26.
22. Triquell MF, Díaz-Luján C, Freilij H, Paglini P, Fretes RE. Placental infection by two subpopulations of *Trypanosoma cruzi* is conditioned by differential survival of the parasite in a deleterious placental medium and not by tissue reproduction. Trans R Soc Trop Med Hyg. 2009;103(10):1011– 8.
23. Murphy KP. Janeway's immunobiology. 8th ed. Janeway C, Travers P, Walport Ma, editors. New York: Garland Science; 2012.
24. Diaz-luján C, Triquell MF, Mezzano L, Fretes RE. Placental Infection by *Trypanosome cruzi* , the Causal Agent of Congenital Chagas Disease. Hum Placent. 2012;1– 22.
25. Robbins JR, Skrzypczynska KM, Zeldovich VB, Kapidzic M, Bakardjiev AI. Placental syncytiotrophoblast constitutes a major barrier to vertical transmission of *Listeria monocytogenes*. PLoS Pathog. 2010;6(1).
26. Leopardi O, Colecchia M, Dedè A, Ghione M. Histopathologic findings in CD1 albino mice infected with *Plasmodium berghei* in pregnancy. Experimental model for pathology of the feto- placental unit in malaria. Pathologica. 1994;86(3):284– 90.
27. Dolcini GL, Solana ME, Andreani G, Celentano AM, Parodi LM, Donato AM, *et al.* *Trypanosoma cruzi* (Chagas' disease agent) reduces HIV-1 replication in human placenta. Retrovirology 2008 (1);5:53.
28. Cliffe LJ, Humphreys NE, Lane TE, Potten CS, Booth C, Grecis RK. Accelerated Intestinal Epithelial Cell Turnover: A New Mechanism of Parasite Expulsion. Science

- (80-). 2005;308(5727):1463– 5.
29. Kim M, Ashida H, Ogawa M, Yoshikawa Y, Mimuro H, Sasakawa C. Bacterial Interactions with the Host Epithelium. *Cell Host Microbe*. 2010; 22;8(1):20– 35.
 30. Huppertz B, Kaufmann P, Kingdom J. Trophoblast turnover in health and disease. *Fetal Matern Med Rev*. 2002;13(02):103– 18.
 31. Gauster M, Huppertz B. The paradox of caspase 8 in human villous trophoblast fusion. *Placenta* 2010;31(2):82– 8.
 32. Connolly PF, Jäger R, Fearnhead HO. New roles for old enzymes: Killer caspases as the engine of cell behavior changes. *Front Physiol*. 2014;5 APR(April):1– 10.
 33. Graf RP, Keller N, Barbero S, Stupack D. Caspase-8 as a Regulator of Tumor Cell Motility. *Curr Mol Med* 2014;14(2):246– 54.
 34. Eckhart L, Declercq W, Ban J, Rendl M, Lengauer B, Mayer C, *et al*. Terminal differentiation of human keratinocytes and stratum corneum formation is associated with caspase-14 activation. *J Invest Dermatol* 2000;115(6):1148– 51.
 35. Kang T-B, Ben-Moshe T, Varfolomeev EE, Pewzner-Jung Y, Yogev N, Jurewicz A, *et al*. Caspase-8 serves both apoptotic and nonapoptotic roles. *J Immunol*. 2004;173(5):2976– 84.
 36. Yusuf K, Smith SD, Sadovsky Y, Nelson DM. Trophoblast Differentiation Modulates the Activity of Caspases in Primary Cultures of Term Human Trophoblasts. *Pediatr Res*. 2002 ;52(3):411– 5.
 37. Gauster M, Moser G, Orendi K, Huppertz B. Factors Involved in Regulating Trophoblast Fusion: Potential Role in the Development of Preeclampsia. *Placenta* 2009;30(SUPPL.):49– 54.
 38. Lamkanfi M, Festjens N, Declercq W, Berghe T Vanden, Vandenabeele P. Caspases in cell survival, proliferation and differentiation. *Cell Death Differ*. 2006;20;14(1):44– 55.
 39. Blanchard H, Kodandapani L, Mittl PRE, Di Marco S, Krebs JF, Wu JC, *et al*. The

- three-dimensional structure of caspase-8: An initiator enzyme in apoptosis. *Structure*. 1999;7(9):1125– 33.
40. Salvesen GS, Dixit VM. Caspase activation: the induced-proximity model. *Proc Natl Acad Sci* 1999;96(20):10964– 7.
 41. Chang DW, Xing Z, Capacio VL, Peter ME, Yang X. Interdimer processing mechanism of procaspase-8 activation. *EMBO J*. Oxford, UK: 2003;15;22(16):4132– 42.
 42. Guilbert LJ, Riddell M, Winkler-Lowen B. Caspase activation is not required for villous cytotrophoblast fusion into syncytiotrophoblasts. *Placenta* 2010;31(11):982– 8.
 43. Rote NS, Wei BR, Xu C, Luo L. Caspase 8 and Human Villous Cytotrophoblast Differentiation. *Placenta* 2010;31(2):89– 96.
 44. Black S, Kadyrov M, Kaufmann P, Ugele B, Emans N, Huppertz B. Syncytial fusion of human trophoblast depends on caspase 8. *Cell Death Differ* 2004;11(1):90– 8.
 45. Jänicke RU, Ng P, Sprengart ML, Porter AG. Caspase-3 is required for α -fodrin cleavage but dispensable for cleavage of other death substrates in apoptosis. *J Biol Chem*. 1998;273(25):15540– 5.
 46. Adler R, Ng A, Rote N. Monoclonal antiphosphatidylserine antibody inhibits intercellular fusion of the choriocarcinoma line, JAR. *Biol Reprod* 1995;53(4):905– 10.
 47. Sionov RV, Vlahopoulos SA, Granot Z. Regulation of Bim in Health and Disease. *Oncotarget*. 2015;6(27):23058– 134.
 48. Ferraro-Peyret C, Quemeneur L, Flacher M, Revillard J-P, Genestier L. Caspase-Independent Phosphatidylserine Exposure During Apoptosis of Primary T Lymphocytes. *J Immunol* 2002;169(9):4805– 10.
 49. Castillo C, López-Muñoz R, Duaso J, Galanti N, Jaña F, Ferreira J, *et al*. Role of matrix metalloproteinases 2 and 9 in ex vivo *Trypanosoma cruzi* infection of human placental chorionic villi. *Placenta* 2012;33(12):991–7.
 50. Droguett D, Carrillo I, Castillo C, Gomez F, Negrete M, Liempi A, *et al*. *Trypanosoma*

cruzi induces cellular proliferation in the trophoblastic cell line BeWo. Enviado a Exp Parasitol. 2016

51. Duaso J, Rojo G, Jaña F, Galanti N, Cabrera G, Bosco C, *et al.* *Trypanosoma cruzi* induces apoptosis in ex vivo infected human chorionic villi. *Placenta* 2011;32(5):356–61.
52. Salas C, Tapia RA, Ciudad K, Armstrong V, Orellana M, Kemmerling U, *et al.* *Trypanosoma cruzi*: Activities of lapachol and α - and β -lapachone derivatives against epimastigote and trypomastigote forms. *Bioorg Med Chem* 2008;15;16(2):668–74.
53. Drewlo S, Baczyk D, Dunk C, Kingdom J. Fusion assays and models for the trophoblast. *Methods Mol Biol.* 2008;475:363–82.
54. Liempi A, Castillo C, Cerda M, Droguett D, Duaso J, Barahona K, *et al.* *Trypanosoma cruzi* infectivity assessment in “*in vitro*” culture systems by automated cell counting. *Acta Trop* 2015;143:47–50.
55. Castillo C, Villarroel A, Duaso J, Galanti N, Cabrera G, Maya JD, *et al.* Phospholipase C gamma and ERK1/2 Mitogen Activated Kinase Pathways are differentially modulated by *Trypanosoma cruzi* during tissue invasion in human placenta. *Exp Parasitol* 2013;133(1):12–7.
56. Cummings KL, Tarleton RL. Rapid quantitation of *Trypanosoma cruzi* in host tissue by real-time PCR. *Mol Biochem Parasitol.* 2003;129(1):53–9.
57. Komine-Aizawa S, Majima H, Yoshida-Noro C, Hayakawa S. Stimuli through Toll-like receptor (TLR) 3 and 9 affect human chorionic gonadotropin (hCG) production in a choriocarcinoma cell line. *J Obstet Gynaecol Res.* 2008;34(2):144–51.
58. Delidaki M, Gu M, Hein A, Vatish M, Grammatopoulos DK. Interplay of cAMP and MAPK pathways in hCG secretion and fusogenic gene expression in a trophoblast cell line. *Mol Cell Endocrinol.* 2011;332(1-2):213–20.
59. Gauster M, Moser G, Orendi K, Huppertz B. Factors Involved in Regulating Trophoblast Fusion: Potential Role in the Development of Preeclampsia. *Placenta*

2009;30, Supple:49– 54.

60. Luján CD, Triquell MF, Sembaj A, Guerrero CE, Fretes RE. *Trypanosoma cruzi*: Productive infection is not allowed by chorionic villous explant from normal human placenta in vitro. *Exp Parasitol*. 2004;108(3-4):176– 81.
61. Liempi A, Castillo C, Carrillo I, Muñoz L, Droguett D, Galanti N, et al. A local innate immune response against *Trypanosoma cruzi* in the human placenta: The epithelial turnover of the trophoblast. *Enviado a Microb Pathog*.
62. Orendi K, Gauster M, Moser G, Meiri H, Huppertz B. The choriocarcinoma cell line BeWo: Syncytial fusion and expression of syncytium-specific proteins. *Reproduction*. 2010;140(5):759– 66.
63. Pop C, Salvesen GS. Human Caspases: Activation, Specificity, and Regulation. *J Biol Chem* 2009;14;284(33):21777– 81.
64. Ouyang Y, Mouillet JF, Coyne CB, Sadovsky Y. Review: Placenta-specific microRNAs in exosomes - Good things come in nano-packages. *Placenta* 2014;35(SUPPL):S69– 73.
65. Fowden AL, Forhead AJ, Sferruzzi-Perri AN, Burton GJ, Vaughan OR. Review: Endocrine regulation of placental phenotype. *Placenta* 2015;36(S1):S50– 9.
66. Coakley G, Maizels RM, Buck AH. Exosomes and Other Extracellular Vesicles: The New Communicators in Parasite Infections. *Trends Parasitol*. Elsevier Ltd; 2015;31(10):477– 89.
67. Huppertz B, Borges M. Placenta Trophoblast Fusion BT - Cell Fusion: Overviews and Methods. Totowa, NJ: Humana Press; 2008. p. 135– 47.
68. Pidoux G, Gerbaud P, Cocquebert M, Segond N, Badet J, Fournier T, et al. Review: Human trophoblast fusion and differentiation: Lessons from trisomy 21 placenta. *Placenta* 2012;33(SUPPL.):S81– 6.
69. Yang M, Lei ZM, Rao C V. The central role of human chorionic gonadotropin in the formation of human placental syncytium. *Endocrinology*. 2003;144(3):1108– 20.

70. Fliss PM, Brune W. Prevention of Cellular Suicide by Cytomegaloviruses. *Viruses* 2012;2;4(10):1928– 49.
71. Kurokawa M, Kornbluth S. Caspases and Kinases in a Death Grip. *Cell*. 2009;4;138(5):838– 54.
72. Engeland M Van, Kuijpers HJH, Ramaekers FCS, Reutelingsperger CPM, Schutte B. Plasma Membrane Alterations and Cytoskeletal Changes in Apoptosis. 1997;430(235):421– 30.
73. Savill J, Fadok V. Corpse clearance defines the meaning of cell death. *Nature*; 2000;12;407(6805):784– 8.
74. Austgulen R, Chedwick L, Isaksen CV. Trophoblast Apoptosis in Human Placenta at Term as Detected by Expression of a Cytokeratin 18 Degradation Product of Caspase. 1992;18:21– 3.
75. Marceau N, Schutte B, Gilbert S, Loranger A, Henfling MER, Broers JL V, *et al.* Dual roles of intermediate filaments in apoptosis. 2007;3.
76. Caulín C, Salvesen GS, Oshima RG. Caspase Cleavage of Keratin 18 and Reorganization of Intermediate Filaments during Epithelial Cell Apoptosis. 1997;138(6):1379– 94.
77. Schutte B, Henfling M, K??lgen W, Bouman M, Meex S, Leers MPG, *et al.* Keratin 8/18 breakdown and reorganization during apoptosis. *Exp Cell Res*. 2004;297(1):11– 26.
78. Guo H, Kaiser WJ, Mocarski ES. Manipulation of Apoptosis and Necroptosis Signaling by Herpesviruses. *Med Microbiol Immunol*. 2015;1;204(3):439– 48.
79. Uchiyama R, Tsutsui H. Caspases as the Key Effectors of Inflammatory Responses Against Bacterial Infection. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*. 2015;63(1):1– 13.
80. Man SM, Toulomousis P, Hopkins L, Monie TP, Fitzgerald KA, Bryant CE. Salmonella infection induces recruitment of Caspase-8 to the inflammasome to

modulate interleukin-1 β production. *J Immunol.* 2013;15;191(10)

81. Zhao M, Zhang R, Xu X, Liu Y, Zhang H, Zhai X, et al. IL-10 Reduces Levels of Apoptosis in *Toxoplasma gondii*-Infected Trophoblasts. *PLoS One.* 2013;8(2):1– 8.
82. Robert-Gangneux F, Murat J-B, Fricker-Hidalgo H, Brenier-Pinchart M-P, Gangneux J-P, Pelloux H. The placenta: a main role in congenital toxoplasmosis? *Trends Parasitol* 2011;27(12):530– 6.
83. Abrahams VM. The role of the Nod-like receptor family in trophoblast innate immune responses. *J Reprod Immunol* 2011;88(2):112– 7.
84. Garcia-Silva MR, Cabrera-Cabrera F, Cura Das Neves RF, Souto-Padrón T, De Souza W, Cayota A. Gene expression changes induced by *Trypanosoma cruzi* shed Microvesicles in mammalian host cells: Relevance of tRNA-derived halves. *Biomed Res Int.* 2014;11
85. Scifres CM, Nelson DM. Intrauterine growth restriction, human placental development and trophoblast cell death. *J Physiol.* 2009;587(14):3453– 8.
86. Carrillo I, Droguett D, Castillo C, Liempi A, Muñoz L, Maya JD, et al. Caspase-8 activity is part of the BeWo trophoblast cell defense mechanisms against *Trypanosoma cruzi* infection. *Exp Parasitol.* 2016;168:9– 15.

PUBLICACIONES GENERADAS

Participación: Primer autor

Manuscrito publicado en *Experimental Parasitology* 168 (2016) 9-15

doi:10.1016/j.exppara.2016.06.008

Caspase-8 activity is part of the BeWo trophoblast cell defense mechanisms against *Trypanosoma cruzi* infection

Ileana Carrillo; Daniel Droguett; Christian Castillo; Ana Liempi; Lorena Muñoz; Juan Diego Maya; Norbel Galanti; ULRIKE KEMMERLING, PhD

Abstract: Congenital Chagas disease is caused by the protozoan parasite *Trypanosoma cruzi* that must cross the placental barrier during transmission. The trophoblast constitutes the first tissue in contact with the maternal-blood circulating parasite. Importantly, the congenital transmission rates are low, suggesting the presence of local placental defense mechanisms. Cellular proliferation and differentiation as well as apoptotic cell death are induced by the parasite and constitute part of the epithelial turnover of the trophoblast, which has been suggested to be part of those placental defenses. On the other hand, caspase-8 is an essential molecule in the modulation of trophoblast turnover by apoptosis and by epithelial differentiation. As an approach to study whether *T. cruzi* induced trophoblast turnover and infection is mediated by caspase-8, we infected BeWo cells (a trophoblastic cell line) with the parasite and determined in the infected cells the expression and enzymatic activity of caspase-8, DNA synthesis (as proliferation marker), β -human chorionic gonadotropin (β -hCG) (as differentiation marker) and activity of Caspase-3 (as apoptotic death marker). Parasite load in BeWo cells was measured by DNA quantification using qPCR and cell counting. Our results show that *T. cruzi* induces caspase-8 activity and that its inhibition increases trophoblast cells infection while decreases parasite induced cellular differentiation and apoptotic cell death, but not cellular proliferation. Thus, caspase-8 activity is part of the BeWo trophoblast cell defense mechanisms against *T. cruzi* infection. Together with our previous results, we suggest that the trophoblast turnover is part of local placental anti-parasite mechanisms.

Participación: Primer autor

Manuscrito enviado a *Experimental Parasitology*

***Trypanosoma cruzi* induces cellular proliferation in the trophoblastic cell line BeWo**

Daniel Droguett*; Ileana Carrillo*; Christian Castillo; Fresia Gómez; Miguel Negrete; Ana Liempi; Lorena Muñoz; Norbel Galanti, PhD; Juan Diego Maya, PhD; ULRIKE KEMMERLING, PhD

Abstract: Congenital transmission of *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*) is partially responsible for the progressive globalization of Chagas disease. During congenital transmission the parasite must cross the placental barrier where the trophoblast, a continuous renewing epithelium, is the first tissue in contact with the parasite. The trophoblast turnover implies cellular proliferation, differentiation and apoptotic cell death. The epithelial turnover is considered part of innate immunity. We previously demonstrated that *T. cruzi* induces cellular differentiation and apoptosis in this tissue. Here we demonstrate that *T. cruzi* induces cellular proliferation in a trophoblastic cell line. We analyzed the cellular proliferation in BeWo cells by determining DNA synthesis by BrdU incorporation assays, mitotic index, cell cycle analysis by flow cytometry, as well as quantification of nucleolus organizer regions by histochemistry and expression of the proliferation markers PCNA and Ki67 by Western blotting and/or immunofluorescence. Additionally, we determined the ERK1/2 MAPK pathway activation by the parasite by Western blotting.

Participación: Co-autor

Manuscrito enviado a *Microbial Pathogenesis*

A local innate immune response against *Trypanosoma cruzi* in the human placenta: The epithelial turnover of the trophoblast

Ana Liempi^{1*}, Christian Castillo^{1*}, Ileana Carrillo¹, Lorena Muñoz¹, Daniel Droguett^{1,4}, Norbel Galanti², Juan Diego Maya³, and Ulrike Kemmerling.^{1#}

Abstract: Congenital Chagas disease, caused by *Trypanosoma cruzi*, is partially responsible for the progressive globalization of Chagas disease despite of its low transmission rate. The probability of congenital transmission depends on complex interactions between the parasite, the maternal and fetus/newborn immune responses and placental factors, being the latter the least studied one.

During transplacental transmission, the parasite must cross the placental barrier where the trophoblast, a continuous renewing epithelium, is the first tissue to have contact with the parasite. Importantly, the epithelial turnover is considered part of the innate immune system since pathogens, prior to cell invasion, must attach to the surface of cells. The trophoblast turnover involves cellular processes such as proliferation, differentiation and apoptotic cell death, all of them are induced by the parasite. In the present review, we analyze the current evidence about the trophoblast epithelial turnover as a local placental innate immune response.

PRESENTACIONES EN CONGRESOS

POSTER 1

***Trypanosoma cruzi* INDUCE EXPRESIÓN Y ACTIVACIÓN DE CASPASA 8 EN UNA LINEA CELULAR DE TROFOBLASTO HUMANO (BeWo)**

***Carrillo Ileana*¹, *Castillo Christian*¹, *Droguett Daniel*^{1,2}, *Liempi Ana*¹, *Muñoz Lorena*¹, *Gómez Fresia*¹, *Negrete Miguel*¹, *Maya Juan Diego*¹, *Galanti Nobel*¹, *Kemmerling Ulrike*¹.**

¹ Instituto de Ciencias Biomédicas, Facultad de Medicina, Universidad de Chile

² Facultad Ciencias de la Salud, Universidad de Talca, Talca, Chile.

La enfermedad de Chagas congénita, causada por el protozoo hemoflagelado *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*) es responsable de uno de cada 3 nuevos casos. El trofoblasto constituye una barrera física contra los patógenos y su recambio epitelial se considera parte de la respuesta inmune innata. Estudios previos han demostrado que *T. cruzi* induce proliferación, diferenciación y muerte celular tipo apoptosis en el trofoblasto, sugiriendo un aumento en el recambio epitelial. La caspasa 8 es una molécula fundamental tanto en el proceso de diferenciación como en muerte celular en el trofoblasto.

Para determinar el efecto de *T. cruzi* sobre la expresión y activación de la caspasa 8, se incubaron células de una línea celular de trofoblasto humano (BeWo) con tripomastigotes de *T. cruzi* de la cepa Ypsilon (Y) en una relación célula: parásito de 1:1 y 1:0,1 y en presencia y ausencia de Forskolina (50 µM) por 48 horas. La expresión de caspasa 8 fue determinada mediante Western blot e inmunofluorescencia, la activación de la caspasa 8 fue determinada mediante la detección de la caspasa 8 clivada mediante Western blot. Concentraciones altas de parásitos inducen tanto aumento de la expresión como activación de la caspasa 8. Interesantemente, células con parásitos intracelularmente (amastigotes) muestran una clara inmunoreactividad para la enzima.

Por ende, se concluye que *T. cruzi* induce un incremento en la expresión y activación de la caspasa 8, lo que confirma resultados previos que demuestran que la presencia del parásito induce diferenciación en el trofoblasto y un consiguiente aumento del recambio del trofoblasto.

Financiamiento Proyectos:

FONDECYT 1120230 (UK), 1130113 (NG), 1130189 (JM).

Presentado en las XVI Jornadas Anuales de Parasitología realizada entre el 24 de abril de 2015 en la Hostería el Copihue, Olmué. Resumen publicado en: revista Parasitología Latinoamericana (2015); 64 (1): 60. Disponible en:

[http://sociedadchilenaparasiatologia.cl/wp-](http://sociedadchilenaparasiatologia.cl/wp-content/themes/sochipa/revistas/PLA_1/PLA_junio_2015.pdf)

[content/themes/sochipa/revistas/PLA_1/PLA_junio_2015.pdf](http://sociedadchilenaparasiatologia.cl/wp-content/themes/sochipa/revistas/PLA_1/PLA_junio_2015.pdf)

Este póster logró una mención honrosa en estas jornadas.

POSTER 2

INHIBICIÓN DE CASPASA 8 INCREMENTA LA INFECTIVIDAD DE *T. cruzi* EN LA LÍNEA CELULAR DE TROFOBLASTO HUMANO (BeWo)

*Carrillo Ileana*¹, *Castillo Christian*¹, *Droguett Daniel*^{1,2}, *Liempi Ana*¹, *Muñoz Lorena*¹, *Astudillo Javier*¹, *Salinas Andrea*¹, *Maya Juan Diego*¹, *Galanti Norbel*¹, *Kemmerling Ulrike*¹

¹ Instituto de Ciencias Biomédicas, Facultad de Medicina, Universidad de Chile

² Facultad Ciencias de la Salud, Universidad de Talca, Talca, Chile.

ukemmerling@u.uchile.cl

La enfermedad de Chagas congénita, causada por el protozoo hemoflagelado *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*) es responsable de uno de cada tres nuevos casos. El trofoblasto constituye una barrera física contra los patógenos y su recambio epitelial se considera parte de la respuesta inmune innata. Estudios previos han demostrado que *T. cruzi* induce proliferación, diferenciación y muerte celular tipo apoptosis en el trofoblasto, sugiriendo un aumento en el recambio epitelial. La caspasa 8 es una molécula fundamental tanto en el proceso de diferenciación como en muerte celular en el trofoblasto.

Para evaluar el efecto del parásito sobre la expresión y activación de la caspasa 8, así como también el efecto que provoca la inhibición de la caspasa 8 sobre la infectividad del parásito en una línea celular de trofoblasto humano (BeWo), se incubaron células BeWo con tripomastigotes de *T. cruzi* de la cepa Ypsilon (Y) en una relación célula:parásito de 1:0.1 y 1:1 y en presencia o ausencia de IETD-CHO (inhibidor de caspasa 8) por 48 horas. La expresión de la procaspasa 8 y su forma activa fueron determinados mediante Western blot e Inmunofluorescencia. Los niveles de infección del parásito en las células fueron determinados mediante RT-PCR.

Concentraciones altas de parásitos inducen tanto aumento en la expresión como clivaje de la caspasa 8, siendo este último disminuido en presencia del inhibidor. Interesantemente, células con parásitos intracelulares (amastigotes) muestran una clara inmunoreactividad para la proforma de caspasa 8. Finalmente, frente a la inhibición de la caspasa 8 se obtuvo un incremento en la infectividad del parásito.

A partir de estos resultados se concluye que *T. cruzi* induce aumento de la expresión y de la activación de caspasa 8 y en presencia del inhibidor de caspasa 8 aumenta su infectividad en una línea celular de trofoblasto humano (BeWo). Estos resultados confirman que el parásito induce el recambio epitelial del trofoblasto, el que podría formar parte de los mecanismos antiparasitarios locales de la placenta humana.

Financiamiento Proyectos: FONDECYT 1120230 (UK), 1130113 (NG), 1130189 (JM), ERANET-LAC ELAC2014/HID-0328.

Disponible en:

http://sociedadchilenaparasitologia.cl/wp-content/themes/sochipa/libros/simposio_2015.pdf

POSTER 3

CASPASE 8 INHIBITION INCREASES THE INFECTIVITY OF TRYPANOSOMA CRUZI IN THE HUMAN TROPHOBLAST CELL LINE (BEWO)

ILEANA CARRILLO WERNER, CHRISTIAN CASTILLO, LORENA MUÑOZ, DANIEL DROGUETT, ANA LIEMPI, JUAN DIEGO MAYA, NORBEL GALANTI, ULRIKE KEMMERLING

UNIVERSITY OF CHILE

Congenital Chagas disease, caused by hemoflagelated protozoan *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*), is responsible for one in three new cases of the disease per year. Diverse pathogens, including *T. cruzi*, are able to cross the placental barrier and infect both the placenta and fetus. The trophoblast is the first tissue of the placental barrier in contact with the maternal blood; its epithelial turnover is considered part of innate immune system. Previous studies have shown that *T. cruzi* induces proliferation, differentiation and cell death through apoptosis in trophoblast, suggesting an increase in epithelial turnover. Caspase 8 is an essential molecule not only during trophoblast apoptosis but also in its epithelial differentiation. However, the role of caspase 8 during *T. cruzi* infection has not been studied. BeWo cells (a trophoblast cell line) were incubated in presence and absence of *T. cruzi* trypomastigotes (Ypsilon (Y) strain) in a cell:parasite ratio of 1:0.1 and 1:1 and in presence or absence of IETD-CHO (caspase 8 inhibitor) during 48 hours. Caspase-8 and its active (cleaved) form were analyzed by Western Blot and immunofluorescence. Additionally, caspase 8 activity was determined with a commercial kit (Caspase8Glo; Promega®). Parasite infectivity was assayed by real time PCR as well as by automated cell analysis with the MATLAB software in DAPI stained cells. High concentration of parasites induces both an increase in the expression, activation and activity of caspase 8. Interestingly, specifically cells with intracellular parasite present an increased immunoreactivity for caspase 8. The inhibition of caspase 8 activity increases parasite infectivity. We conclude, that caspase 8 and therefore the trophoblast turnover could be part of antiparasitic mechanisms of human placenta.

Keywords: Congenital Chagas disease; *T. cruzi*; trophoblast, caspase 8

Projects Funding: FONDECYT 1120230 (UK); 1130113 (NG); 1130189 (JM); ERANET-LAC ELAC2014/HID-0328.

Presentado en el XXIV Congreso de la Sociedad Brasileña de Parasitología y XXII Congreso Latinoamericano de Parasitología, que tuvo lugar en Salvador, Bahía, Brasil, del 27 a 31 octubre de 2015. Disponible en: <http://cbparasito2015.com.br/anais-do-congresso/>

POSTER 4

INHIBICIÓN DE CASPASA 8 INCREMENTA LA INFECTIVIDAD DE *Trypanosoma cruzi* EN UNA LÍNEA CELULAR DE TROFOBLASTO (BEWO)

Carrillo IV¹, Castillo CR¹, Droguett DA^{1,2}, Muñoz LS¹, Liempi AI¹, Gallardo CA¹, Maya JD³, Galanti NL⁴, Kemmerling U¹.

¹ Programa de Anatomía y Biología del Desarrollo, Instituto de Ciencias Biomédicas, Facultad de Medicina, Universidad de Chile.² Departamento de Estomatología, Facultad Ciencias de la Salud, Universidad de Talca.³ Programa de Farmacología Molecular y Clínica, Instituto de Ciencias Biomédicas, Facultad de Medicina, Universidad de Chile. ⁴ Programa de Biología Molecular y Celular, Instituto de Ciencias Biomédicas, Facultad de Medicina, Universidad de Chile.

Introducción: La enfermedad de Chagas congénita, causada por el parásito protozoario *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*), es responsable de uno de cada tres nuevos casos por año. Durante la infección congénita *T. cruzi* atraviesa la barrera placentaria e infecta al feto. El trofoblasto es el primer tejido de la placenta en entrar en contacto con la sangre materna y su recambio epitelial es considerado parte de la respuesta inmune innata. Se ha demostrado que *T. cruzi* induce proliferación, diferenciación y muerte celular de tipo apoptosis en el trofoblasto, sugiriendo que el parásito incrementa el recambio epitelial. La caspasa 8 es esencial tanto para la diferenciación como para la muerte celular del trofoblasto. Sin embargo, el rol de la caspasa 8 durante la infección con *T. cruzi* no ha sido estudiado.

Metodología: Células BeWo (línea celular de trofoblasto) fueron incubadas en presencia y ausencia de trypomastigotes de *T. cruzi* (cepa Ypsilon) en una relación célula:parásito 1:0,1 y 1:1 y en presencia o ausencia de IETD-CHO (inhibidor de caspasa 8) durante 48 horas. Se analizó la procaspasa 8 y el fragmento p18 por Western Blot e Inmunofluorescencia. La actividad de caspasa 8 fue determinada con un ensayo enzimático (Caspase8Glo; Promega®). La infección fue evaluada mediante qPCR y determinación del porcentaje de células infectadas así como número de parásitos intracelulares mediante microscopía en células teñidas con DAPI utilizando el software MATLAB.

Resultados y Discusión: La presencia del parásito sin alterar la expresión de la procaspasa 8 induce un incremento del clivaje y su actividad. La inhibición de esta proteasa incrementa la infección por el parásito a expensas del número de parásitos por célula.

Conclusión: La activación de caspasa 8 mediada *T. cruzi* podría formar parte de un mecanismo antiparasitario local, ya que esta enzima se ha relacionado con la diferenciación del trofoblasto.

Financiamiento Proyectos: FONDECYT 1120230 (UK), 1130113 (NG), ERANETLAC ELAC2014/HID-0328

Presentado en la 1era Feria de Grados Académicos, organizada por la Escuela de Postgrado, Facultad de Medicina, Universidad de Chile, el 6 de Abril de 2016.

ANEXOS



Contents lists available at ScienceDirect

Experimental Parasitology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/yexpr

Full length article

Caspase-8 activity is part of the BeWo trophoblast cell defense mechanisms against *Trypanosoma cruzi* infection



Ileana Carrillo^a, Daniel Droguett^{a,d}, Christian Castillo^a, Ana Liempi^a, Lorena Muñoz^a, Juan Diego Maya^c, Norbel Galanti^b, Ulrike Kemmerling^{a,*}

^a Programa de Anatomía y Biología del Desarrollo, Instituto de Ciencias Biomédicas, Facultad de Medicina, Universidad de Chile, Chile

^b Programa de Biología Celular y Molecular, Instituto de Ciencias Biomédicas, Facultad de Medicina, Universidad de Chile, Chile

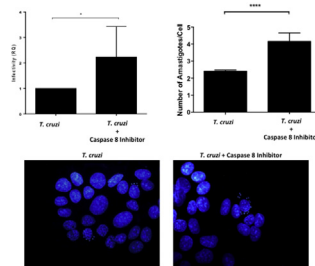
^c Programa de Farmacología Molecular y Clínica, Instituto de Ciencias Biomédicas, Facultad de Medicina, Universidad de Chile, Chile

^d Departamento de Estomatología, Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad de Talca, Chile

HIGHLIGHTS

- *Trypanosoma cruzi* induces caspase 8 activity in a trophoblast cell line (BeWo).
- Caspase 8 inhibition increases *T. cruzi* infection in BeWo cells.
- Caspase 8 activity might be part of BeWo cell defenses.

GRAPHICAL ABSTRACT



ARTICLE INFO

Article history:

Received 20 May 2016

Accepted 17 June 2016

Available online 18 June 2016

Keywords:

Caspase-8

Trophoblast defense mechanism

Congenital Chagas disease

ABSTRACT

Congenital Chagas disease is caused by the protozoan parasite *Trypanosoma cruzi* that must cross the placental barrier during transmission. The trophoblast constitutes the first tissue in contact with the maternal-blood circulating parasite. Importantly, the congenital transmission rates are low, suggesting the presence of local placental defense mechanisms. Cellular proliferation and differentiation as well as apoptotic cell death are induced by the parasite and constitute part of the epithelial turnover of the trophoblast, which has been suggested to be part of those placental defenses. On the other hand, caspase-8 is an essential molecule in the modulation of trophoblast turnover by apoptosis and by epithelial differentiation. As an approach to study whether *T. cruzi* induced trophoblast turnover and infection is mediated by caspase-8, we infected BeWo cells (a trophoblastic cell line) with the parasite and determined in the infected cells the expression and enzymatic activity of caspase-8, DNA synthesis (as proliferation marker), β -human chorionic gonadotropin (β -hCG) (as differentiation marker) and activity of Caspase-3 (as apoptotic death marker). Parasite load in BeWo cells was measured by DNA quantification using qPCR and cell counting.

Our results show that *T. cruzi* induces caspase-8 activity and that its inhibition increases trophoblast cells infection while decreases parasite induced cellular differentiation and apoptotic cell death, but not

* Corresponding author. Institute of Biomedical Sciences, Faculty of Medicine, University of Chile, Independencia 1027, Santiago, 8380453, Chile.

E-mail addresses: ukemmerling@med.uchile.cl, ukemmerling@u.uchile.cl (U. Kemmerling).

cellular proliferation. Thus, caspase-8 activity is part of the BeWo trophoblast cell defense mechanisms against *T. cruzi* infection. Together with our previous results, we suggest that the trophoblast turnover is part of local placental anti-parasite mechanisms.

© 2016 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

Chagas disease, caused by the protozoan parasite *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*) and transmitted by triatominae vectors, constitutes a devastating health problem in Latin America. Moreover, Chagas disease is one of the “Top 10” in the ranking of major neglected tropical diseases by disability-adjusted life years (DALYs) (Hotez et al., 2015). Due to the extensive global migration of asymptomatic people, Chagas disease has also become an emerging disease in non-endemic countries. The congenital transmission allows *T. cruzi* to expand within a developed country where the vector bugs are not common or where human contact with them is limited (Perez-Molina et al., 2015; Smith Darr and Conn, 2015). Interestingly, in spite of the high serologic prevalence, that may reach 80% among pregnant woman in endemic countries, the transmission rate to fetuses is low (≈ 1 –12%) (Perez-Molina et al., 2015; Rendell et al., 2015).

Congenital transmission of pathogens is the consequence of complex interactions between the pathogen, maternal and fetal/newborn immune responses as well as the placenta, being the latter the least-studied factor. It has been proposed, that the epithelial turnover of the villous trophoblast, the first tissue of the placenta in contact with maternal-blood circulating pathogens, could be part of local defense mechanisms of the human placenta (Liempi et al., 2014). The trophoblast is a lining epithelium, that suffers a continuous turnover (Berniscke et al., 2006). The epithelial (Murphy, 2011) as well as the trophoblast turnover (Liempi et al., 2014) are considered part of the innate immune system, since pathogens must adhere to cells prior invasion and those attached to a lining epithelium are continuously eliminated with the superficial cells (Liempi et al., 2014) (Murphy, 2011).

The turnover in the trophoblast implies a precise orchestration of various cellular processes including cellular proliferation of the basal cytotrophoblast (CTB), differentiation or syncytial fusion by incorporating CTB cells into a non-replicative superficial syncytiotrophoblast layer (STB) and cell death (Berniscke et al., 2006; Gauster et al., 2009a; Ji et al., 2013). We have previously shown that *T. cruzi* induces cellular proliferation, differentiation and cell death in the trophoblast (Droguett AL et al., 2013; Duaso et al., 2011; Liempi et al., 2014), suggesting that the trophoblast turnover could be a local antiparasite mechanism.

CTB differentiation and fusion is regulated by multiple factors including apoptotic cell death involved caspases (aspartate-specific cysteine proteases) (Gauster et al., 2009b). These enzymes are not only known for their key roles in programmed cell death but also for being involved in other biologic processes such as cellular differentiation (Shalini et al., 2015). Particularly, caspase-8, an apoptosis initiator caspase, has been proposed to regulate trophoblast differentiation and fusion. For instance, caspase-8 is activated in highly differentiated CTB cells just prior to fusion and has not been found in proliferating CTB cells (Huppertz and Borges, 2008; Pidoux et al., 2012). Moreover, fusion of the trophoblast can be visualized by localizing caspase-8 (Gauster et al., 2009b).

Here we studied if the *T. cruzi* induced trophoblast turnover and capacity of infection is mediated by caspase-8. In BeWo cells (a trophoblastic cell line) we determined the expression and

enzymatic activity of caspase-8, DNA synthesis (as proliferation marker), β -human chorionic gonadotropin (β -hCG) (as differentiation marker) and activity of Caspase-3 (as apoptotic death marker). Parasite load in BeWo cells was measured by DNA quantification by qPCR and cell counting. Our results show that *T. cruzi* induces caspase-8 activity and that its inhibition increases the infection of BeWo cells by the parasite while impairing cellular differentiation and cell death.

2. Materials and methods

2.1. Cell cultures

VERO cells (ATCC[®] CCL-81) were grown in RPMI medium supplemented with 5% fetal bovine serum (FBS) and antibiotics (penicillin-streptomycin) (Villalta and Kierszenbaum, 1982). BeWo cells (ATCC CCL-98) were grown in DMEM-F12K medium supplemented with 10% FBS, L-glutamine and antibiotics (penicillin-streptomycin) (Drewlo et al., 2008). Cells were grown at 37 °C in a humidified atmosphere with 5% CO₂, with replacement of the culture medium every 24–48 h.

2.2. Infection of VERO cells with *T. cruzi* and trypomastigote harvesting

After confluence, VERO cells were incubated with a culture of Ypsilon strain epimastigotes of *T. cruzi* in the late stationary phase. Trypomastigotes also present in that culture invade VERO cells and replicate intracellularly as amastigotes. After 72 h, amastigotes transform back into trypomastigotes, which lyses the host cells. The parasites were recovered by low-speed centrifugation (500g), which produces trypomastigotes in the supernatant and amastigotes in the sediment (Villalta and Kierszenbaum, 1982).

2.3. Infection of BeWo cells with *T. cruzi* trypomastigotes

2×10^5 BeWo cells were incubated in presence or absence of *T. cruzi* trypomastigotes and in presence or absence of 5 μ M of the Caspase-8 activity inhibitor IETD-CHO (BD-Biosciences[®]). FBS (10%), Forskolin (50 μ M) (Sigma-Aldrich[®]) or Staurosporine (2 μ M) (Sigma-Aldrich[®]) were used as positive controls for cellular proliferation, cellular differentiation and apoptotic cell death, respectively. For cellular proliferation analysis, BeWo cells were previously synchronized by serum deprivation as described previously (Langan and Chou, 2011). The cells were analyzed at 48 h post-infection. For *T. cruzi* amastigote identification, infected cells were processed for DAPI (4, 6-diamidino-2-phenylindole, Molecular Probes; 1 μ g DAPI/ml) nuclear staining and amastigotes were recognized by their nuclear size and presence of kinetoplast (Fig. 4C) and quantified using MATLAB[®] software (Liempi et al., 2015).

2.4. Western blotting

BeWo cells were incubated in RIPA buffer (50 mM Tris, 150 mM NaCl, 0.1% SDS, 0.5% Na Deoxycholate, 1% Triton X100,

1 mM PMSF and a protease inhibitor cocktail [Complete Mini, Roche®]; afterwards, cells were sonicated for 1 min and maintained on ice for 20 min. The cell lysates were centrifuged at 15,000g for 20 min to remove debris. Protein concentration was measured using the Bradford assay, with Sigma bovine serum albumin as the protein standard. Then, 30 µg of protein was separated on a 10% sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel, blotted onto a nitrocellulose membrane, and probed with monoclonal antibodies against caspase-8 (sc-56070, Santa Cruz Technologies®; 1:1000 v/v) and against cleaved caspase 8 (Asp391) (#9496, Cell Signalling®; 1:1000 v/v). To correct for loading, the membranes were stripped and re-probed with an anti-human GAPDH (sc-51905 Santa Cruz Technologies®; 1:500 v/v) antibody. Immunoreactive proteins were detected using enhanced chemiluminescence reagents according to the manufacturer's instructions (Amersham Biosciences® UK, Ltd.). The films were scanned, and NIH-Image v1.6 (NIH, Bethesda, MD) was used for the densitometric analysis of the bands.

2.5. Enzyme activity

Caspase-3 (Caspase-Glo®3/7 Assay, Promega®) and caspase-8 (Caspase-Glo®8 Assay, Promega®) enzyme activities were determined by commercial kits according to the manufacturer's instructions. Briefly, Caspase-3 and 8 activities were determined by luminescence using luminogenic Caspase-3 (Ac-DEVD-pNA) or 8 (Ac-LETD-pNA) substrates, which reacts after cleavage by Caspase-3 or caspase-8 with a thermostable luciferase. Luminescence was read in a microplate reader (Varioskan® Flash). Data were normalized with respect to the values obtained in

control conditions. Intra-assay coefficients of variation were less than 10%.

2.6. DNA amplification by real-time PCR (qPCR)

Genomic DNA was extracted from BeWo cells with a Wizard Genomic DNA Purification Kit (Promega®, USA) according to the manufacturer's instructions. The resulting DNA was quantified with a µDrop Plate DNA quantification system in a Varioskan Flash Multimode Reader (Thermo Scientific, USA). For amplification of human and parasite DNA, two specific primer pairs were used. A 100 bp human GAPDH sequence was amplified using the primers hGDH-F (5'-TGATGCGTGTACAAGCGTTTT-3') and hGDH-R (5'-ACATGGTATTACCACCCCACTAT-3'), which were designed using Primer Express software (version 3.0; Applied Biosystems®). For *T. cruzi* DNA detection, a 182 bp sequence of satellite DNA was amplified using the primers TCZ-F (5'-GCTCTTGCCACAMGGGTGC-3') and TCZ-R (5'-CAAGCAGCGGATAGTTCAGG-3') (Castillo et al., 2012; Cummings and Tarleton, 2003). Each reaction mix contained 200 nM of each primer (forward and reverse), 1 ng of DNA, 12.5 µL of SensiMix® SYBR Green Master Mix (Bioline®, USA) and H₂O for a total volume of 25 µL. The amplification was performed in an ABI Prism 7300 sequence detector (Applied Biosystems®, USA). The cycling program was as follows: an initial incubation at 20 °C for 2 min, a denaturation step at 95 °C for 10 min and 40 amplification cycles of 95 °C (15 s), 60 °C (15 s) and 72 °C (30 s). The final step was a dissociation stage that ranged from 60 to 95 °C (105 s). The relative quantification analysis of the results was expressed as an RQ value determined using the comparative control ($\Delta\Delta Ct$) method (Castillo et al., 2012; Pfaffl, 2001).

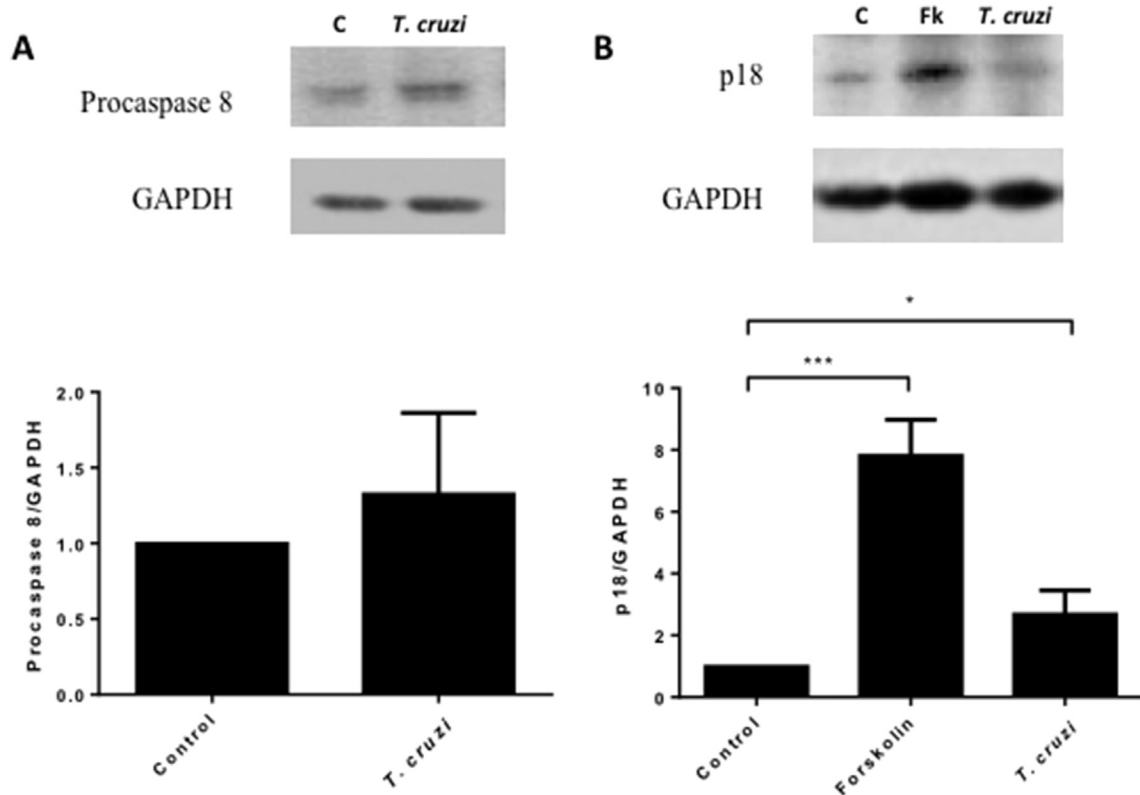


Fig. 1. *T. cruzi* trypomastigotes induce caspase-8 cleavage in BeWo cells. BeWo cells were incubated in the presence and absence of *T. cruzi* trypomastigotes for 24 h at a cell:parasite ratio of 1:0.1 or with Forskolin (50 µM) as a positive control. A (left panel), representative Western blots for caspase-8 and GAPDH from BeWo cells incubated in presence and absence of the parasite. The bar graph represents the ratios of Caspase-8 to GAPDH normalized in terms of the values obtained in control cells. B (right panel), representative Western blots for cleaved caspase-8 (p18) and GAPDH from BeWo cells under the different experimental conditions. The bar graph represents the ratios of cleaved caspase-8 to GAPDH normalized in terms of the values obtained in control cells. All values are given as the means ± S.D., and they correspond to at least 3 independent experiments that were performed in duplicate or triplicate. Data were normalized in terms of the control values and analyzed by Student *t*-test (A) or ANOVA followed by Dunnett's post-test (B). All values, given as the means ± S.D., correspond to at least 3 independent experiments performed in triplicate. **p* ≤ 0.05; ****p* ≤ 0.001.

2.7. BrdU incorporation assay

BrdU incorporation in DNA was measured by spectrophotometry (B2851-20, USBiological®) according manufacturer's instructions. Data were normalized with respect to the values obtained in control conditions. Intra-assay coefficients of variation were less than 10%.

2.8. Detection of β -hCG in the culture medium

The concentrations of β -hCG in the cell culture supernatants were determined using the β -hCG ELISA Kit (DRG® β HCG ELISA (EIA1911)) according to the manufacturer's instructions. Data were normalized with respect to the values obtained in control conditions. Intra-assay coefficients of variation were less than 10%.

2.9. Statistics

All experiments were performed in triplicate. Results are expressed as means \pm S.D. The significance of differences was evaluated using Student's t-test for paired data or ANOVA followed by Dunnett's post test as indicated.

3. Results

3.1. *T. cruzi* trypomastigotes induce caspase-8 activity in BeWo cells

BeWo cells were incubated in presence and absence of *T. cruzi* trypomastigotes at a cell:parasite ratio of 1:0.1 and in presence or absence of the caspase-8 activity inhibitor (IETD-CHO, 5 μ M) for 48 h. The parasite does not induce a significant increase of pro-caspase-8 expression (Fig. 1A), but induces a significant increase (2.69 ± 0.757 ($p \leq 0.05$)) of the cleaved and therefore activated p18 fragment of the enzyme (Fig. 1B). To confirm the activation of caspase-8, its enzymatic activity was determined after *T. cruzi* infection. Indeed, the parasite induces an increase in caspase-8 activity (1.71 ± 0.263 ; $p \leq 0.01$, Fig. 2) that is similar to the observed activity in the positive control (1.66 ± 0.269 ; $p \leq 0.01$, Fig. 2). Inhibition of caspase-8 with the specific activity inhibitor prevents the parasite-induced activity.

3.2. Inhibition of caspase-8 activity increases *T. cruzi* BeWo cell infection

BeWo cells were incubated with *T. cruzi* trypomastigotes at a cell:parasite ratio of 1:0.1 and in presence or absence of the above mentioned caspase-8 activity inhibitor for 48 h. The inhibition of caspase-8 activity significantly increases (2.23 ± 1.20 ; $p \leq 0.05$) the parasite DNA load in BeWo cells respect to infected control cells (Fig. 3). Additionally, we determined the percentage of infected cells as well as the number of amastigotes (white arrows, Fig. 4C) (intracellular replicative form of the parasite) per BeWo cell (Fig. 4). Interestingly, there is no significant difference in the percentage of infected cells comparing caspase-8 activity inhibitor treated cells and control ones (Fig. 4A and C). However, the number of amastigotes per BeWo cell increases significantly from 2.40 ± 0.072 to 4.15 ± 0.501 ($p \leq 0.0001$) (Fig. 4B and C).

3.3. Inhibition of caspase-8 activity decreases the parasite-induced cellular differentiation and apoptotic cell death, but not the cellular proliferation, in BeWo cells

Since the trophoblast turnover has been proposed to be a possible local anti-parasite mechanism (Liempi et al., 2014), we analyzed the effect of caspase-8 activity inhibition on trophoblast

BeWo cells proliferation, differentiation and cell death.

BeWo cells were incubated in presence and absence of *T. cruzi* trypomastigotes at a cell:parasite ratio of 1:0.1 and in presence or absence of the caspase-8 activity inhibitor for 48 h. FBS, Forskolin and Staurosporine were used as positive control for cellular proliferation, differentiation and apoptotic cell death, respectively. For cellular proliferation analysis, BeWo cells were previously synchronized by serum deprivation. Caspase-8 inhibition does not affect DNA synthesis parasite-exposed cells as measured by BrdU incorporation (Fig. 5A).

On the other hand, the inhibition of caspase-8 activity prevents significantly the parasite-induced cellular differentiation as measured by determining the secretion of β -hCG, the main biochemical trophoblast differentiation marker, (Fig. 5B). The parasite increases 2.48 ± 0.217 ($p \leq 0.001$) the amount of β -hCG, in presence of the inhibitor the increase of hormone secretion is not statistically significant respect to the control not treated BeWo cells.

Finally, we analyzed the effect of caspase-8 inhibition on parasite induced apoptotic cell death by measuring caspase-3 like activity (effector caspase). *T. cruzi* increases significantly the caspase-3 like activity (1.45 ± 0.098 ($p \leq 0.01$)) respect to control levels. Caspase-8 activity inhibition prevent the significant increase of parasite-induced caspase-3 activity (0.84 ± 0.047 (Fig. 5C)).

4. Discussion

The low congenital transmission rates of *T. cruzi* (Duaso et al., 2011; Perez-Molina et al., 2015; Rendell et al., 2015) together with the absence of typical amastigote nests (obligate intracellular

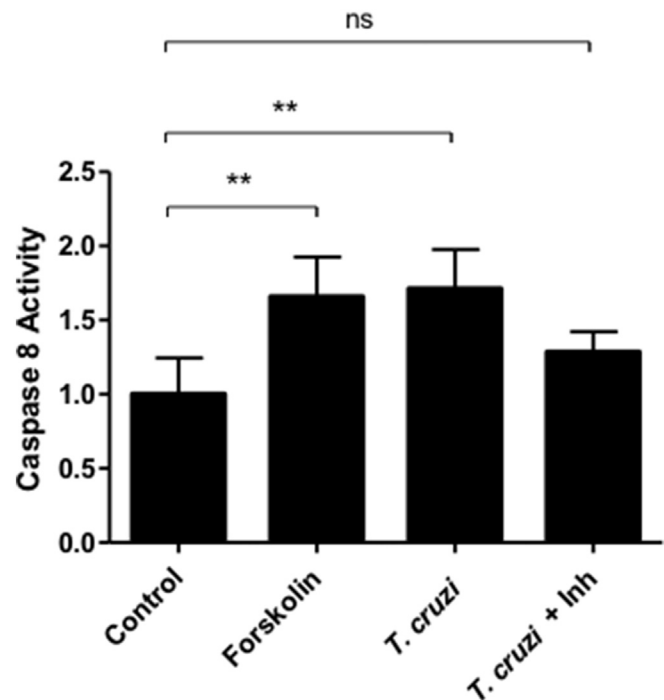


Fig. 2. *T. cruzi* trypomastigotes induce caspase-8 activity in BeWo cells. BeWo cells were incubated in the presence and absence of *T. cruzi* trypomastigotes for 24 h at a cell:parasite ratio of 1:0.1 in presence and absence of caspase-8 activity inhibitor IETD-CHO (5 μ M) or with Forskolin (50 μ M) as a positive control. Caspase-8 activity was measured through luminescence using commercial kits, according to the manufacturer's instructions. BeWo cells incubated with the parasite show a significant increase in caspase-8 activity, which is prevented by the enzyme inhibitor. Data were normalized in terms of the control values and analyzed by ANOVA followed by Dunnett's post-test. All values, given as the means \pm S.D., correspond to at least 3 independent experiments performed in triplicate. ** $p \leq 0.01$.

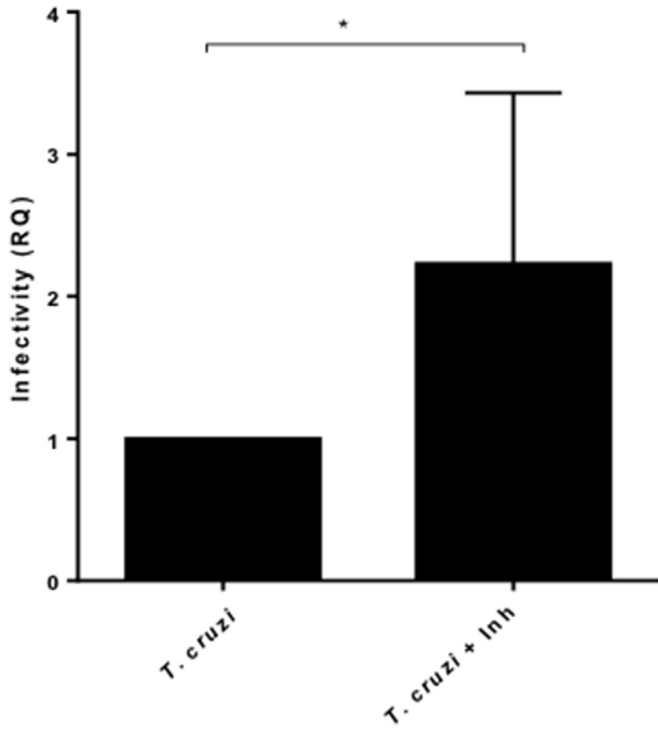


Fig. 3. Inhibition of caspase-8 increases the amount of *T. cruzi* DNA in BeWo cells. BeWo cells were incubated in the presence and absence of *T. cruzi* trypomastigotes for 24 h at a cell:parasite ratio of 1:0.1 in presence and absence of caspase-8 activity inhibitor IETD-CHO (5 μ M). Data are a comparison of parasite DNA in 1 ng of total DNA isolated from infected BeWo cells. Real-time quantification by qPCR was performed using $\Delta\Delta$ Ct method. Data represents means \pm SD and were analyzed by Student *t*-test. **p* < 0.05.

replicative form of the parasite) in *ex vivo* infected HPCVE (Duaso et al., 2010) and in placentas from woman with chronic Chagas' disease (Duaso et al., 2012) have lead to postulate that local placental anti-parasitic mechanism may exist (Duaso et al., 2011; Liempi et al., 2014). Moreover, amastigote nests can only be seen in *ex vivo* infected explants when the trophoblast is enzymatically removed with trypsin (Lujan et al., 2004). Therefore, the trophoblast seems to be a fundamental barrier to *T. cruzi* placental invasion. In this context, the induction of a higher trophoblast turnover by the parasite may be part of a local defence mechanism probably related to maintain the placental barrier (Liempi et al., 2014).

We have previously shown that *T. cruzi* induces cellular proliferation, cellular differentiation (Liempi et al., 2014) as well as apoptotic cell death (Duaso et al., 2011) in the trophoblast. Differentiation and apoptosis are both cellular processes that are closely related in the trophoblast (Gauster and Huppertz, 2010) and also is caspase-8 (Gauster and Huppertz, 2010; Huppertz and Gauster, 2011; Longtine et al., 2012). For instance, activation of caspase-8 induces the phosphatidylserine exposure on the external leaf of the plasma membrane, which is a key signal for syncytial fusion (Gauster and Huppertz, 2010) and for apoptotic cell death (Savill, 1998). Here we demonstrate that *T. cruzi* induces activity of caspase-8 (Figs. 1 and 2) and that this activation is related to the infection of BeWo cells with the parasite (Figs. 3 and 4).

Caspase-8 is also involved in cellular proliferation, in particular related to tissue repair and regeneration (Connolly et al., 2014). Therefore we analyzed if the parasite-induced caspase-8 activity is related to the previously described increase in trophoblast proliferation (Droguett AL et al., 2013). As shown in Fig. 5A, the inhibition of caspase-8 does not affect DNA synthesis. This result is in accordance to the fact, that in the villous trophoblast, caspase-8 is expressed and active in terminal differentiated, not proliferating,

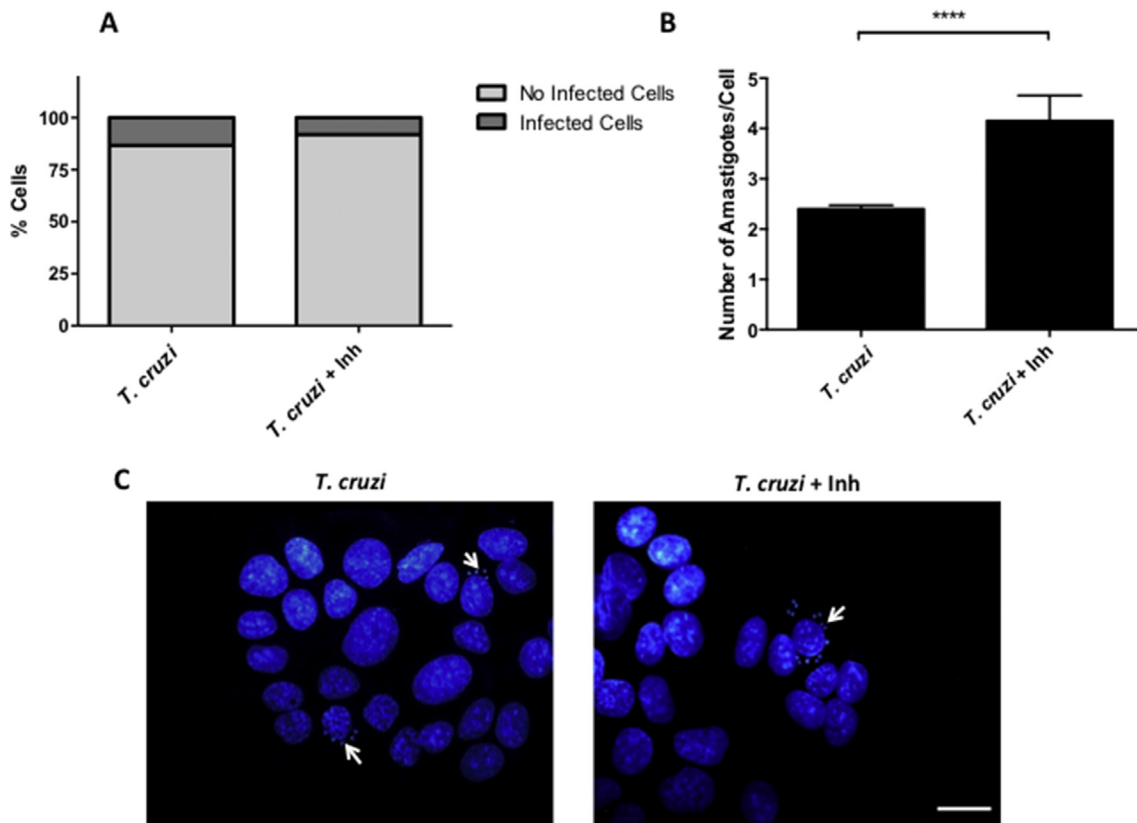
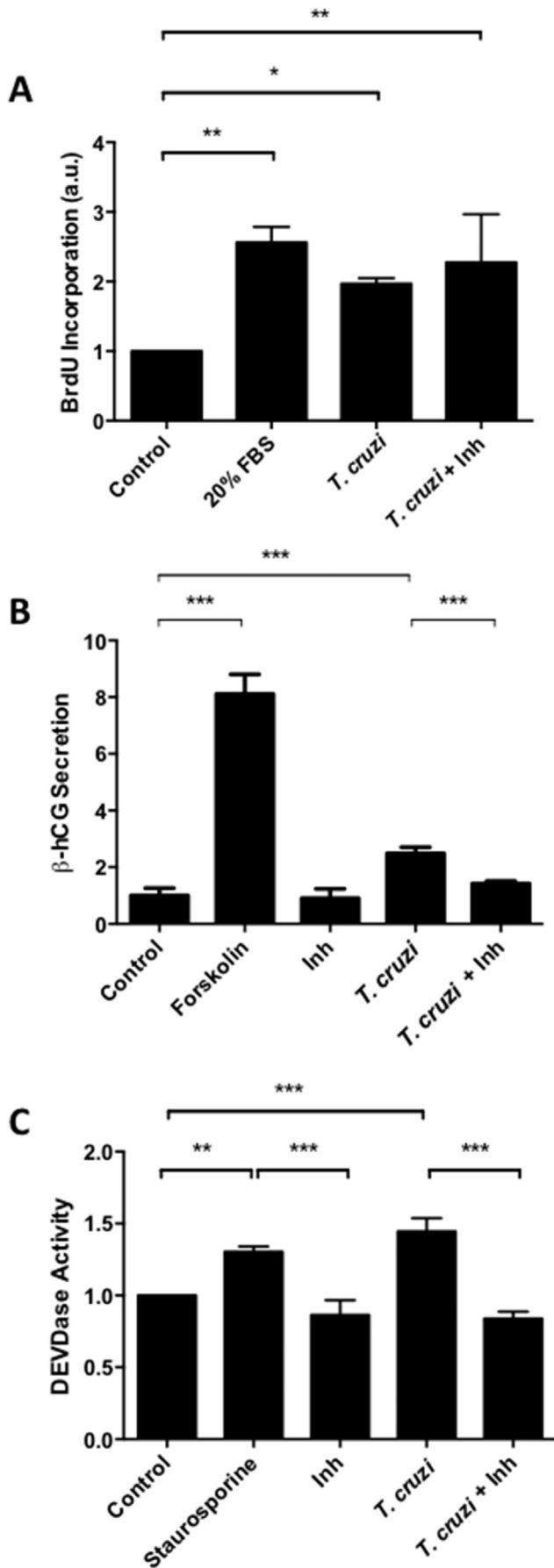


Fig. 4. Inhibition of caspase-8 does not affect the percentage of infected BeWo cells, but increases the number of intracellular parasites. BeWo cells were incubated in the presence and absence of *T. cruzi* trypomastigotes for 24 h at a cell:parasite ratio of 1:0.1 in presence and absence of caspase-8 activity inhibitor IETD-CHO (5 μ M). A (left upper panel), the bar graph shows percentage of infected (dark gray) and non-infected cells (light gray). B (upper right panel), the bar graph shows the number of intracellular parasites in infected cells. Data represents means \pm SD and were analyzed by Student *t*-test. **p* < 0.05. C, shows representative images of BeWo cells that were processed for DAPI staining. White arrows show intracellular amastigotes in BeWo cells. In presence of the caspase-8 inhibitor the number of intracellular parasites is increased. Scale bar: 10 μ m.



CTB cells just prior fusion with the STB (Huppertz and Borges, 2008; Pidoux et al., 2012).

On the other hand, the inhibition of caspase-8 activity does prevent the cellular differentiation of the trophoblast (Fig. 5B), as measured by secretion of β -hCG, as differentiation marker. We have previously demonstrated, that *T. cruzi* induces not only β -hCG and syncytin expression (Liempi et al., 2014), both major biochemical markers of trophoblast differentiation (Berniske et al., 2006), but also cell fusion and desmoplakin re-distribution (Liempi et al., 2014). Caspase-8 is also responsible for cytoskeleton rearrangement previous to cell fusion by cleaving α -fodrin (Huppertz and Gauster, 2011; Rote et al., 2010). α -fodrin belongs to the spectrin protein family of sub-membranous cytoskeletal proteins that carry binding sites for phosphatidylserine. The spectrin network maintains the curvature of the plasma membrane and its degradation affects membrane curvature facilitating fusion (Martens and McMahon, 2008). The expression of α -fodrin is diminished in highly differentiated CT and is entirely missing in the ST (Huppertz and Gauster, 2011). Therefore, *T. cruzi* induced caspase-8 activity might explain, at least partially, the parasite induced trophoblast differentiation (Liempi et al., 2014).

Apoptotic cell death is considered as a final differentiation of the trophoblast that culminates with the release of syncytial knots, which counterbalance the continuous incorporation of CTB cells into the STB, maintaining therefore the epithelial homeostasis (Berniske et al., 2006). Inhibition of parasite induced-caspase-8 activity also prevents caspase-3 activity (Fig. 5C). Caspase-3 is one of the effector caspases, proteolytically cleaved by caspase-8 (Fliss and Brune, 2012). Caspase-3, together with other effector caspases, acts over a range of substrates, facilitating chromatin condensation by processing nuclear envelope laminins and mediating the collapse of the cytoskeleton network, leading to the dismantling of the dying cell (Kurokawa and Kornbluth, 2009).

Interestingly, programmed cell death contributes to the innate immune control over intracellular pathogens, eliminating infected cells and restricting dissemination within the host organism (Guo et al., 2015). Moreover, several pathogens are able to modulate caspase-8. For instance, *Mycobacterium tuberculosis* and *Candida albicans* (Uchiyama and Tsutsui, 2015) as well as *Salmonella enterica* (Man et al., 2013) activate caspase-8 leading to the production of pro-inflammatory cytokines. On the other hand, several virus, including cytomegalovirus, are able to inhibit caspase-8 assuring in that way their spread into the host cell and body (Fliss and Brune, 2012).

Interestingly, it has been shown in mice that *T. cruzi* activates caspase-8 as well as the effector caspase 9 in thymocytes, causing their apoptotic cell death. Moreover, inhibition of both caspases prevents thymocyte death following *T. cruzi* infection, explaining partially the thymocyte depletion observed during parasitaemia peaks (Farias-de-Oliveira et al. 2013). During infection in mice with other trypanosomatid parasite, *Leishmania major*, the inhibition of caspase-8 reduced the proportion of CD8 T cells and IFN-gamma expression in both CD4 and CD8 T cells in lymph nodes, suggesting another non-apoptotic role of caspase-8 activity during T cell-

Fig. 5. Inhibition of caspase-8 does not prevent *T. cruzi*-induced DNA synthesis in BeWo cells. BeWo cells were synchronized by serum deprivation and, subsequently, incubated in the presence and absence of *T. cruzi* trypomastigotes for 24 h at a cell:parasite ratio of 1:0.1 in presence and absence of caspase-8 activity inhibitor IETD-CHO (5 μ M) or with FBS (20%) as a positive control. BrdU incorporation was measured through spectrophotometry using commercial kits, according to the manufacturer's instructions. Data were normalized in terms of the control values and analyzed with an ANOVA followed by Dunnett's post-test. All values, given as the means \pm S.D., correspond to at least 3 independent experiments performed in triplicate. * $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.01$.

mediated immune response (Pereira et al., 2008).

Toxoplasma gondii (*T. gondii*), other protozoan parasite also activates caspase-8 in the trophoblast. This parasite also increases caspase-8 and 3 levels and activity in first trimester trophoblast primary cell cultures and in BeWo cells leading to apoptotic cell death (Zhao et al., 2013). However, we cannot rule out, that the induced apoptosis may serve to evade host defenses that acts to limit the infection. Particularly, in the case of *T. gondii*, which is a more successfully congenital transmitted parasite invading parasite in the placenta than *T. cruzi* (Robert-Gangneux et al., 2011).

5. Conclusion

Caspase-8 activity is part of the BeWo trophoblast cell defense mechanisms against *T. cruzi* infection. Together with our previous results, we suggest that the trophoblast turnover is part of local placental anti-parasite mechanisms.

Acknowledgements

This work was supported by ERANET-LAC grant ELAC2014/HID-0328 (to UK and NG) and “Fondo Nacional de Desarrollo Científico y Tecnológico” (FONDECYT, Chile) grants 1120230 (to UK), 1130189 (to JM) and 1130113 (to NG).

References

- Bernisce, K, Kaufmann, P, Baergen, RN., 2006. Pathology of the Human Placenta, fifth ed. Springer Science-Business Media, Inc., p. 1065
- Castillo, C., Lopez-Munoz, R., Duaso, J., Galanti, N., Jana, F., Ferreira, J., Cabrera, G., Maya, J.D., Kemmerling, U., 2012. Role of matrix metalloproteinases 2 and 9 in ex vivo trypanosoma cruzi infection of human placental chorionic villi. *Placenta* 33 (12), 991–997.
- Connolly, P.F., Jager, R., Fearnhead, H.O., 2014. New roles for old enzymes: killer caspases as the engine of cell behavior changes. *Front. Physiol.* 5, 149.
- Cummings, K.L., Tarleton, R.L., 2003. Rapid quantitation of trypanosoma cruzi in host tissue by real-time pcr. *Mol. Biochem. Parasitol.* 129 (1), 53–59.
- Drewlo, S., Baczyk, D., Dunk, C., Kingdom, J., 2008. Fusion assays and models for the trophoblast. *Methods Mol. Biol.* 475, 363–382.
- Droguett AL, A., Castillo, Ch, Duaso, J., Cerda, M., Härtel, S., Galanti, N., Maya, J.D., Kemmerling, U., 2013. Trypanosoma cruzi induces cellular proliferation in the trophoblastic cell line bewo. *Placenta* 34 (9), A78.
- Duaso, J., Rojo, G., Cabrera, G., Galanti, N., Bosco, C., Maya, J.D., Morello, A., 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), 705–711.
- Duaso, J., Rojo, G., Jana, F., Galanti, N., Cabrera, G., Bosco, C., Lopez-Munoz, R., Maya, J.D., Ferreira, J., Kemmerling, U., 2011. Trypanosoma cruzi induces apoptosis in ex vivo infected human chorionic villi. *Placenta* 32 (5), 356–361.
- Duaso, J., Yanez, E., Castillo, C., Galanti, N., Cabrera, G., Corral, G., Maya, J.D., Zulantay, I., Apt, W., Kemmerling, U., 2012. Reorganization of extracellular matrix in placentas from women with asymptomatic chagas disease: mechanism of parasite invasion or local placental defense? *J. Trop. Med.* 2012, 758357.
- Farias-de-Oliveira, D.A., Villa-Verde, D.M., Nunes Panzenhagen, P.H., Silva dos Santos, D., Berbert, L.R., Savino, W., de Meis, J., 2013. Caspase-8 and caspase-9 mediate thymocyte apoptosis in trypanosoma cruzi acutely infected mice. *J. Leukoc. Biol.* 93 (2), 227–234.
- Fliss, P.M., Brune, W., 2012. Prevention of cellular suicide by cytomegaloviruses. *Viruses* 4 (10), 1928–1949.
- Gauster, M., Huppertz, B., 2010. The paradox of caspase 8 in human villous trophoblast fusion. *Placenta* 31 (2), 82–88.
- Gauster, M., Moser, G., Orendi, K., Huppertz, B., 2009a. Factors involved in regulating trophoblast fusion: potential role in the development of preeclampsia. *Placenta* 30 (Suppl. A), S49–S54.
- Gauster, M., Siwetz, M., Huppertz, B., 2009b. Fusion of villous trophoblast can be visualized by localizing active caspase 8. *Placenta* 30 (6), 547–550.
- Guo, H., Kaiser, W.J., Mocarski, E.S., 2015. Manipulation of apoptosis and necroptosis signaling by herpesviruses. *Med. Microbiol. Immunol.* 204 (3), 439–448.
- Hotez, P.J., Bottazzi, M.E., Strych, U., 2016. New vaccines for the world's poorest people. *Annu. Rev. Med.* 67, 405–417.
- Huppertz, B., Borges, M., 2008. Placenta trophoblast fusion. *Methods Mol. Biol.* 475, 135–147.
- Huppertz, B., Gauster, M., 2011. Trophoblast fusion. *Adv. Exp. Med. Biol.* 713, 81–95.
- Ji, L., Brkic, J., Liu, M., Fu, G., Peng, C., Wang, Y.L., 2013. Placental trophoblast cell differentiation: physiological regulation and pathological relevance to preeclampsia. *Mol. Asp. Med.* 34 (5), 981–1023.
- Kurokawa, M., Kornbluth, S., 2009. Caspases and kinases in a death grip. *Cell* 138 (5), 838–854.
- Langan, T.J., Chou, R.C., 2011. Synchronization of mammalian cell cultures by serum deprivation. *Methods Mol. Biol.* 761, 75–83.
- Liempi, A., Castillo, C., Cerda, M., Droguett, D., Duaso, J., Barahona, K., Hernandez, A., Diaz-Lujan, C., Fretes, R., Hartel, S., et al., 2015. Trypanosoma cruzi infectivity assessment in “in vitro” culture systems by automated cell counting. *Acta Trop.* 143, 47–50.
- Liempi, A., Castillo, C., Duaso, J., Droguett, D., Sandoval, A., Barahona, K., Hernández, A., Galanti, N., Maya, J.D., Kemmerling, U., 2014 Dec. Trypanosoma cruzi induces trophoblast differentiation: a potential local antiparasitic mechanism of the human placenta? *Placenta*. 35 (12), 1035–1042.
- Longtine, M.S., Chen, B., Odibo, A.O., Zhong, Y., Nelson, D.M., 2012. Caspase-mediated apoptosis of trophoblasts in term human placental villi is restricted to cytotrophoblasts and absent from the multinucleated syncytiotrophoblast. *Reproduction* 143 (1), 107–121.
- Lujan, C.D., Triquell, M.F., Sembaj, A., Guerrero, C.E., Fretes, R.E., 2004. Trypanosoma cruzi: productive infection is not allowed by chorionic villous explant from normal human placenta in vitro. *Exp. Parasitol.* 108 (3–4), 176–181.
- Man, S.M., Tourlomousis, P., Hopkins, L., Monie, T.P., Fitzgerald, K.A., Bryant, C.E., 2013. Salmonella infection induces recruitment of caspase-8 to the inflammasome to modulate il-1beta production. *J. Immunol.* 191 (10), 5239–5246.
- Martens, S., McMahon, H.T., 2008. Mechanisms of membrane fusion: disparate players and common principles. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 9 (7), 543–556.
- Murphy, K., 2011. Janeway's Immunobiology, eighth ed. Garland Science.
- Pereira, W.F., Guillermo, L.V., Ribeiro-Gomes, F.L., Lopes, M.F., 2008. Inhibition of caspase-8 activity reduces ifn-gamma expression by t cells from leishmania major infection. *An. Acad. Bras. Cienc.* 80 (1), 129–136.
- Pérez-Molina, JA, Perez, AM, Norman, FF, Monge-Maillo, B, López-Vélez, R., 2015 Nov. Old and new challenges in Chagas disease. *Lancet Infect. Dis.* 15 (11), 1347–1356.
- Pfaffl, M.W., 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time rt-pcr. *Nucleic Acids Res.* 29 (9), e45.
- Pidoux, G., Gerbaud, P., Cocquebert, M., Segond, N., Badet, J., Fournier, T., Guibourdenche, J., Evain-Brion, D., 2012. Review: human trophoblast fusion and differentiation: lessons from trisomy 21 placenta. *Placenta* 33, S81–S86.
- Rendell, V.R., Gilman, R.H., Valencia, E., Galdos-Cardenas, G., Verastegui, M., Sanchez, L., Acosta, J., Sanchez, G., Ferrufino, L., LaFuente, C., et al., 2015. Trypanosoma cruzi-infected pregnant women without vector exposure have higher parasitemia levels: implications for congenital transmission risk. *PLoS One* 10 (3), e0119527.
- Robert-Gangneux, F., Murat, J.B., Fricker-Hidalgo, H., Brenier-Pinchart, M.P., Gangneux, J.P., Pelloux, H., 2011. The placenta: a main role in congenital toxoplasmosis? *Trends Parasitol.* 27 (12), 530–536.
- Rote, N.S., Wei, B.R., Xu, C., Luo, L., 2010. Caspase 8 and human villous cytotrophoblast differentiation. *Placenta* 31 (2), 89–96.
- Savill, J., 1998. Apoptosis. Phagocytic docking without shocking. *Nature* 392 (6675), 442–443.
- Shalini, S., Dorstyn, L., Dawar, S., Kumar, S., 2015. Old, new and emerging functions of caspases. *Cell Death Differ.* 22 (4), 526–539.
- Smith Darr, J., Conn, D.B., 2015. Importation and transmission of parasitic and other infectious diseases associated with international adoptees and refugees immigrating into the united states of america. *BioMed Res. Int.* 2015, 763715.
- Uchiyama, R., Tsutsui, H., 2015. Caspases as the key effectors of inflammatory responses against bacterial infection. *Arch. Immunol. Ther. Exp. (Warsz)* 63 (1), 1–13.
- Villalta, F., Kierszenbaum, F., 1982. Growth of isolated amastigotes of trypanosoma cruzi in cell-free medium. *J. Protozool.* 29 (4), 570–576.
- Zhao, M., Zhang, R., Xu, X., Liu, Y., Zhang, H., Zhai, X., Hu, X., 2013. Il-10 reduces levels of apoptosis in toxoplasma gondii-infected trophoblasts. *PLoS One* 8 (2), e56455.