



República Bolivariana de Venezuela
Universidad de los Andes
Facultad de Ciencias
Departamento de Biología



Laboratorio de Enzimología de Parásitos (LEP)

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

Laboratorio de Mecanismos de Infección Parasitaria (LMIP)

Determinación de los niveles de expresión y localización de microARNs en placenta humana en respuesta a la infección por *Trypanosoma cruzi*

Presentado por:

Br. Yessica Andreina Ortega Beltrán

Tutora: Ulrike Kemmerling

Tutor Académico: Wilfredo Quiñones

**TRABAJO ESPECIAL DE GRADO 2
PARA OPTAR AL TÍTULO DE:
LICENCIADA EN BIOLOGÍA**

Mérida, diciembre 2022

Tabla de contenido

I. ÍNDICE DE FIGURAS.....	1
II. ÍNDICE DE TABLAS.....	2
III.- RESUMEN.....	3
1. ESTADO ACTUAL DEL CONOCIMIENTO DEL PROBLEMA.....	4
1.1. <i>Epidemiología</i>	4
1.2. <i>Ciclo biológico de T. cruzi</i>	4
1.3. <i>Clasificación de T. cruzi en Unidades Discretas de Tipificación (DTUs)</i>	6
1.4. <i>Vías de transmisión</i>	7
1.5. <i>Aspectos clínicos de la enfermedad de Chagas</i>	7
1.6. <i>Tratamiento</i>	8
1.7. <i>Transmisión congénita</i>	8
1.8. <i>Respuesta inmunitaria materna y fetal en desarrollo</i>	9
1.9. <i>Placenta</i>	9
1.10. <i>Mecanismos de defensa placentarias anti-T. cruzi</i>	12
1.11. <i>MicroARNs</i>	14
1.12. <i>Síntesis de miARNs</i>	15
1.13. <i>Regulación de la expresión génica mediante miARNs</i>	15
1.14. <i>miARNs como herramientas diagnósticas</i>	16
1.15. <i>miARNs y T. cruzi</i>	16
1.16. <i>microARNs en placenta</i>	16
1.17. <i>miR-512-3p</i>	17
1.18. <i>miR-515-5p</i>	18
2. HIPÓTESIS	20
3. OBJETIVOS.....	20
3.1. <i>Objetivo general</i>	20
3.2. <i>Objetivos específicos</i>	20
4. JUSTIFICACIÓN Y APLICABILIDAD DE LOS RESULTADOS	20
5. MATERIALES Y MÉTODOS.....	21
5.1. <i>Cultivo de células VERO®</i>	21
5.2. <i>Obtención de forma infectiva tripomastigote de T. cruzi</i>	21
5.3. <i>Obtención e infección de explantes de placenta humana con T. cruzi</i>	21
5.4. <i>Verificación de la infección efectiva de los tripomastigotes de T. cruzi en los EPH</i>	22
5.4.1. <i>Extracción del ADN de los EPH</i>	22
5.4.2. <i>Cuantificación del ADN extraído de los EPH mediante RT-qPCR</i>	22

5.5. Cuantificación de la expresión de los miARNs (miR-512-3p y miR-515-5p) mediante RT-qPCR	23
5.6. Localización y cuantificación de la expresión de los miARNs (miR-512-3p y miR-515-5p) mediante HISC	23
5.6.1. Estandarización de la técnica HISC	23
5.6.2. Técnica de HISC	25
5.7. Visualización de los resultados de la HISC	28
5.8. Cuantificación de la expresión de los miARNs obtenidos de la HISC mediante el programa FIJI.....	28
5.9. Bioseguridad	29
5.10 Ética.....	29
6. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	29
7. RESULTADOS.....	30
8. DISCUSIÓN.....	35
9. CONCLUSIÓN.....	41
10. BIBLIOGRAFÍA.....	41

www.bdigital.ula.ve

I. ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Formas morfológicas de <i>Trypanosoma cruzi</i>	5
Figura 2. Ciclo biológico de <i>T. cruzi</i> (vía vectorial).....	6
Figura 3. Estructura esquemática de la placenta	11
Figura 4. Expresión diferencial de los niveles del miR-515-5p durante infección <i>ex vivo</i> de EPH con <i>T. cruzi</i>	18
Figura 5. Expresión diferencial de los niveles del miR-515-5p durante infección <i>ex vivo</i> de EPH con <i>T. cruzi</i>	19
Figura 6. Estandarización de la técnica de Hibridación <i>in situ</i> Cromatográfica (HISC).....	24
Figura 7. Expresión diferencial del ADN parasitario de <i>T. cruzi</i> durante la infección <i>ex vivo</i> de EPH durante diferentes tiempos de infección.....	30
Figura 8. Expresión diferencial de miR-512-3p durante infección <i>ex vivo</i> de EPH.....	31
Figura 9. Expresión diferencial de miR-515-5p durante infección <i>ex vivo</i> de EPH.....	32
Figura 10. Expresión diferencial de los miARNs miR-512-3p y miR-515-5p durante infección <i>ex vivo</i> de EPH.....	33
Figura 11. Expresión diferencial de miR-512-3p en el trofoblasto durante infección <i>ex vivo</i> de EPH.....	34
Figura 12. Expresión diferencial de miR-512-3p en el trofoblasto durante infección <i>ex vivo</i> de EPH.....	35

II. ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Oligonucleótidos diana usados como oligos para qPCR específico para ADN.....	22
Tabla 2. Oligonucleótidos diana usados como oligos para RT-qPCR de miARN.....	23
Tabla 3. Proceso de desparafinación	25
Tabla 4. Preparación de la mezcla de hibridación	26
Tabla 5. Proceso de lavado de las láminas	27
Tabla 6. Proceso de deshidratación de las láminas después del contraste nuclear	28

www.bdigital.ula.ve

III.- RESUMEN

La enfermedad de Chagas (EC) es causada por el parásito *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*) y puede ser transmitida congénitamente. Estimaciones de la Organización Mundial de la Salud (OMS) indican que más de 1 millón de mujeres en edad fértil están infectadas con el parásito en América Latina y que entre el 20-25% de los casos nuevos de EC son congénitos. Interesantemente, sólo un porcentaje de las madres infectadas transmiten el parásito a sus fetos, sugiriendo que la placenta posee mecanismos de defensa antiparasitarios tales como el recambio epitelial de trofoblasto. El trofoblasto es un epitelio de revestimiento en directo contacto con la sangre materna, siendo el primer tejido de la barrera placentaria, compuesta además por el estroma vellositario y los capilares fetales; que debe superar el parásito para infectar al feto. El recambio epitelial del trofoblasto implica una orquestación precisa de diferentes procesos celulares tales como proliferación, diferenciación y muerte celular. *T. cruzi* induce todos éstos en el trofoblasto, lo que implica un profundo cambio en la expresión génica de este epitelio.

La expresión génica está regulada, entre otros, postranscripcionalmente por miARNs que reprimen ARNm. Una de las regiones genómicas que codifican a miARNs, es el *clúster* C19MC que es placenta-específico. Entre los miARNs codificados por C19MC están miR-512-3p y miR-515-5p que regulan la diferenciación y muerte celular en el trofoblasto y que según resultados previos son modulados por *T. cruzi* durante la infección *ex vivo* de explantes de placenta humana (EPH). Sin embargo, no se han estudiado la localización de estos miARNs en EPH.

Se propuso la siguiente **Hipótesis:** *T. cruzi* aumenta y disminuye, respectivamente, en el trofoblasto los niveles de expresión de miR-512-3p y de miR-515-5p durante la infección *ex vivo* de EPH. Los **objetivos específicos** asociados son: Determinar en EPH infectados *ex vivo* con tripomastigotes de *T. cruzi* i) los niveles de expresión de miR-512-3p y miR515-5p, y ii) la localización de miR-512-3p y miR515-5p mediante las técnicas de RT-qPCR e hibridación *in situ* cromogénica (HISC). El estudio de miARNs placentarios y modulados por el parásito permitirá tener un mayor conocimiento sobre la fisiopatología de la transmisión congénita de *T. cruzi*, identificar posibles herramientas diagnósticas y terapéuticas de la EC congénita. **Resultados:** La infección con *T. cruzi* aumenta y disminuye los niveles de expresión en el trofoblasto de los miR-512-3p y miR-515-5p, respectivamente, durante la infección *ex vivo* en EPH **Conclusión:** La infección con *T. cruzi* modula la expresión de los niveles de los miARNs miR-512-3p y miR-515-5p en el trofoblasto. Sin embargo, aún no se ha determinado el mecanismo que regula este fenómeno.

Palabras clave: *Trypanosoma cruzi*, transmisión congénita, miARNs, hibridación *in situ*.

1. ESTADO ACTUAL DEL CONOCIMIENTO DEL PROBLEMA

1.1. *Epidemiología*

La enfermedad de Chagas (EC), también conocida como Tripanosomiasis Americana, es causada por el parásito protozoario *Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi (T. cruzi)* (Chagas, 1909) (Monge-Maillo & López-Vélez, 2017; Pérez-Molina & Molina, 2018). Es considerada por la Organización Mundial de la Salud (OMS) como una de las enfermedades tropicales más desatendidas (WHO, 2020). Afecta entre 6 y 7 millones de personas en el continente americano, extendiéndose desde Estados Unidos hasta Argentina y Chile (Bern et al., 2019; WHO, 2020). Así, en países endémicos se calcula que ocurren 24.000 nuevos casos por año y aproximadamente 12.000 muertes por año. Además, se estima que, mundialmente, entre 65 a 100 millones de personas viven en zonas de riesgo donde pueden contraer la infección (Lidani et al., 2019).

La EC constituye un problema de salud pública creciente en América Latina y en áreas no endémicas como Canadá, Estados Unidos, Europa, Australia y Japón (Bern et al., 2019; Medina et al., 2018; Monge-Maillo & López-Vélez, 2017; Rassi et al., 2010) debido a la constante migración de individuos desde las áreas endémicas y las formas de transmisión no vectoriales (Bern et al., 2019; Lidani et al., 2019; Schmunis, 2007).

1.2. *Ciclo biológico de T. cruzi*

El ciclo biológico del parásito incluye tres estadios morfológicos principales caracterizados por las posiciones relativas del flagelo, el kinetoplasto y el núcleo (**Figura 1.**) (De Souza & Barrias, 2020; Zuma et al., 2020):

1) **Tripomastigote:** Corresponde a la forma celular infectiva y no replicativa; mide aproximadamente 20 micrómetros (μm) de longitud, es fusiforme, posee un flagelo emergente y un kinetoplasto subterminal.

2) **Epimastigote:** Corresponde a la forma celular replicativa extracelular que también mide $20\mu\text{m}$ de longitud y es fusiforme con un flagelo emergente. Sin embargo, a diferencia de la forma tripomastigote, el kinetoplasto se localiza anterior al núcleo.

3) **Amastigote:** Corresponde a la forma celular replicativa intracelular; mide aproximadamente $2\mu\text{m}$ de diámetro, es redondo y el flagelo no es emergente.

Además de estos estadios morfológicos bien definidos y caracterizados de *T. cruzi*, también se observan formas celulares intermedias (Gonçalves et al., 2018; Kollien & Schaub, 2000; Zuma et al., 2020). Así, teniendo en cuenta las principales etapas intermedias, se pueden clasificar más de 18 formas

diferentes dentro del insecto vector (delimitadas con números romanos del I-XVIII) (Chagas, 1909; Kollien & Schaub, 2000).

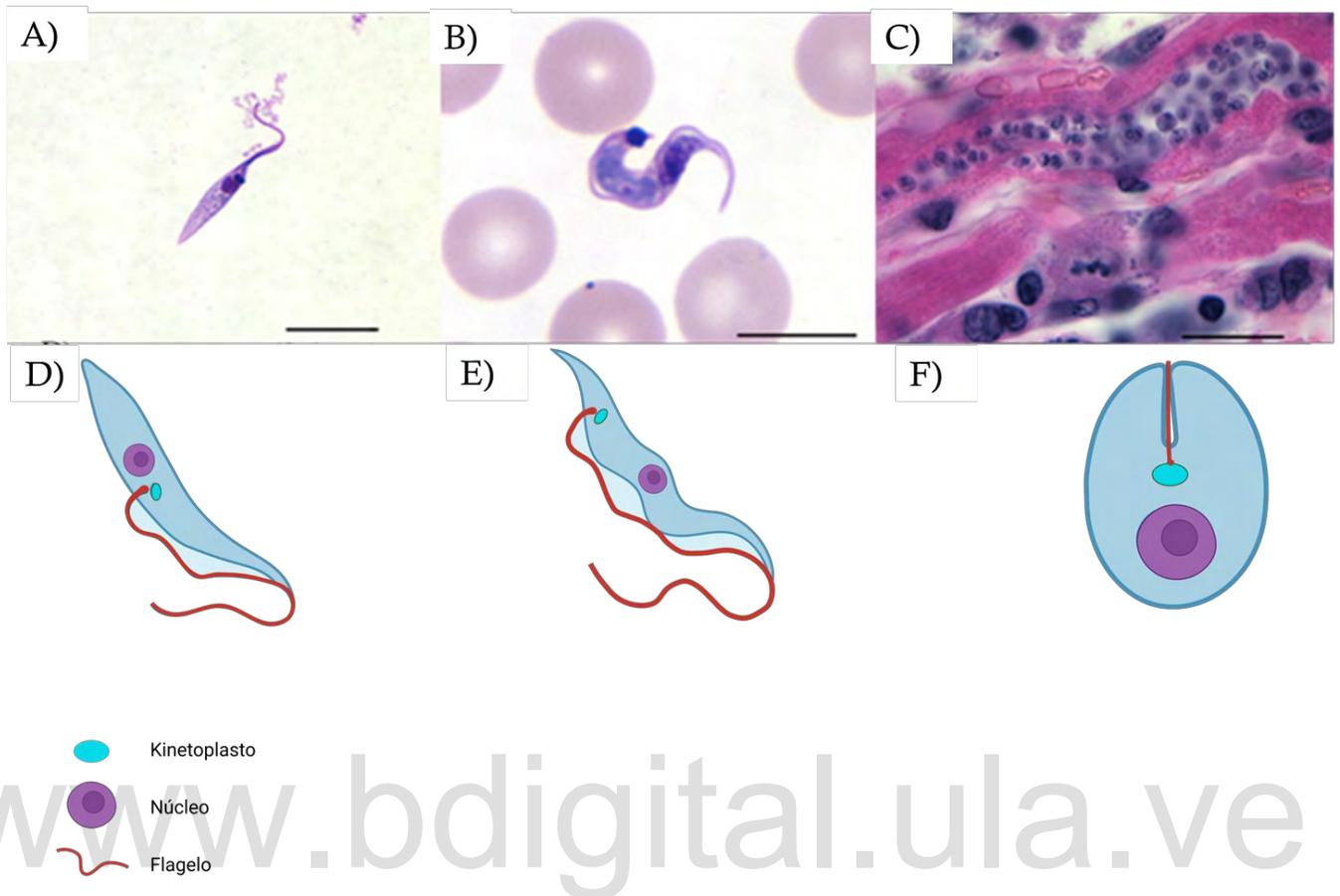


Figura 1. Formas morfológicas de *Trypanosoma cruzi*. Panel superior: **A)** Forma epimastigote en cultivo axénico (Tinción con Giemsa); barra de aumento 10µm. **B)** Forma tripomastigote en frotis de sangre periférica (Tinción con Giemsa); barra de aumento 5µm. **C)** Nido de amastigotes en un cardiomiocito (Tinción con hematoxilina-eosina); barra de aumento 5µm. (Bern et al., 2019). Panel inferior: Formas morfológicas de *T. cruzi*: **D)** Forma epimastigote. **E)** Forma tripomastigote. **F)** Forma amastigote (Creación propia con BioRender.com basada en Chagas, 1909)).

El ciclo biológico de *T. cruzi* es digenético e involucra un insecto vector y un hospedador mamífero (**Figura 2**). En este ciclo, un insecto vector de tipo triatomino hematófago (Hemiptera, *Reduviidae*, *Triatominae*) de los géneros *Triatoma*, *Rhodnius* y *Panstrongylus* (Lidani et al., 2017) se alimenta de un hospedador mamífero infectado e ingiere junto con su sangre el parásito en forma tripomastigote. En el intestino anterior del insecto, el tripomastigote se diferencia a epimastigote, y se multiplica. En la porción distal del intestino del insecto, aproximadamente 10 días después, el epimastigote se diferencia a tripomastigote metacíclico. Los tripomastigotes metacíclicos son expulsados desde la ampolla rectal al exterior junto con las deyecciones postprandiales del insecto durante y después de la ingesta de sangre. Así, el parásito, aprovechando las disrupciones en la piel o a través de las mucosas, penetra en el hospedador mamífero (Pearson, 2020; Tyler & Engman, 2001). En el mamífero, el parásito invade una variedad de células del tejido local donde se diferencia en amastigotes y como tal se multiplica varias

veces. Posteriormente los amastigotes se diferencian a tripomastigotes que lisan las células hospederas, entran a la circulación sanguínea para luego invadir a nuevas células y tejidos diana, extendiéndose de esta forma la infección a través de todo el organismo (Altcheh et al., 2003). Significativamente, estos cambios en la morfología y el metabolismo implican cambios en la expresión génica del parásito durante su ciclo biológico (De Souza & Barrias, 2020).

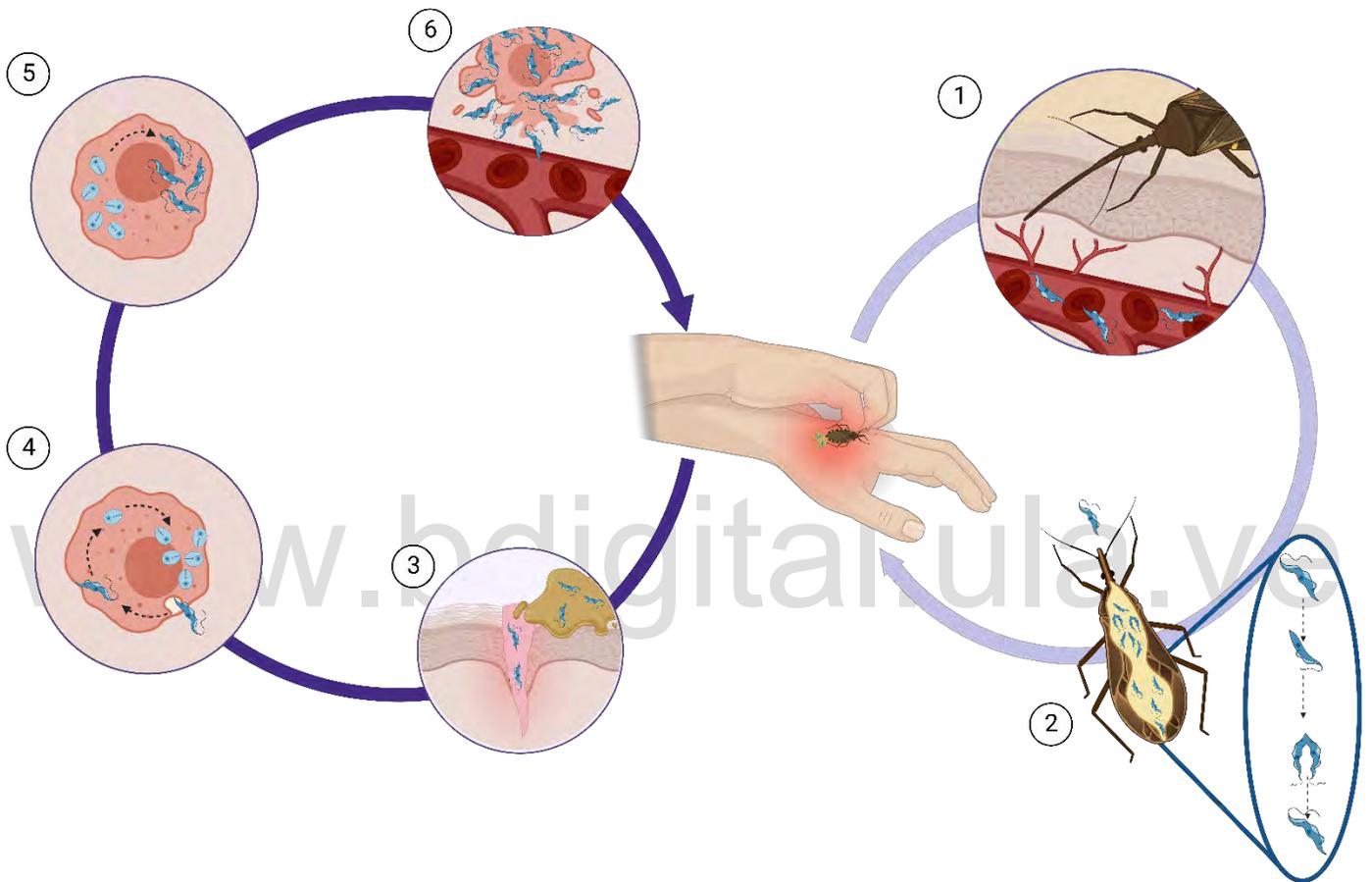


Figura 2. Ciclo biológico de *T. cruzi* (vía vectorial): (1) Picadura del vector e ingesta de tripomastigotes sanguíneos desde un hospedador vertebrado (mamífero) infectado. (2) Tripomastigotes ingeridos se diferencian en el intestino del insecto a epimastigotes e inician el proceso de división celular, posteriormente éstos se diferencian a tripomastigotes metacíclicos. (3) Las deyecciones del parásito contienen tripomastigotes metacíclicos que son depositados sobre piel o mucosas del hospedador. (4) Los tripomastigotes son internalizados por la célula huésped, (5) en la cual los tripomastigotes se diferencian a amastigotes. La forma amastigote se multiplica en el citoplasma y luego se (6) diferencian a tripomastigotes los cuales (7) lisan a la célula. Finalmente, (8) los tripomastigotes pueden infectar otras células (Creación propia con BioRender.com basada en De Souza & Barrias, 2020).

1.3. Clasificación de *T. cruzi* en Unidades Discretas de Tipificación (DTUs)

Actualmente se clasifica a *T. cruzi* en siete linajes o unidades discretas de tipificación (por sus siglas en inglés “Discreet Typing Units, DTU”): TcI-VI siendo añadida hace poco TcBat, asociada a murciélagos (Kemmerling et al., 2019; Muñoz et al., 2013; Padilla et al., 2017; Zingales et al., 2012).

Las DTUs son definidas como un "conjunto de stocks que están genéticamente más próximos entre sí que con cualquier otro stock y son identificables por marcadores moleculares, genéticos, bioquímicos o inmunológicos" (Tibayrenc, 1998, 2003). Cada DTU presenta diferentes características basadas en su distribución geográfica, manifestaciones clínicas de la enfermedad y asociaciones epidemiológicas (Padilla et al., 2017).

1.4. Vías de transmisión

Además del contagio vía vectorial existen otras vías de transmisión que incluyen: transfusión de sangre (Diaz & Brener, 1984), trasplantes de órganos (Vazquez et al., 1996), consumo de alimentos contaminados (Cardoso et al., 2006; Shikanai-Yasuda et al., 1991), accidentes de laboratorio (Hofflin et al., 1987), transmisión sexual (Amato Neto et al., 2000) y congénita (de madre a hijo) (Dao, 1949; Fretes et al., 2012; Kemmerling et al., 2019; Liempi et al., 2020).

1.5. Aspectos clínicos de la enfermedad de Chagas

La EC presenta dos fases clínicas, una aguda y otra crónica. La fase aguda generalmente es asintomática, pero en algunas ocasiones puede presentarse una lesión cutánea (chagoma) o edema bipalpebral (signo de Romaña) dependiendo del sitio de entrada del parásito, junto con linfadenopatía local y un cuadro febril autolimitante. Otros síntomas inespecíficos incluyen, cefalea, dolor muscular, disnea, edema, dolor abdominal, tos, hepatoesplenomegalia, esplenomegalia, entre otros. Sin embargo, se observa mortalidad como consecuencia a una severa miocarditis, meningoencefalitis o ambas en el 5 y 10% de los casos (WHO, 2015, 2020).

La fase crónica a su vez se divide en indeterminada y sintomática. La fase crónica indeterminada es un período de infección latente, con baja parasitemia, sin sintomatología clínica evidente y resultados serológicos o xenodiagnósticos positivos; puede perdurar indefinidamente en el tiempo o progresar hacia la fase crónica sintomática incluso 10 o 15 años post-infección. La fase crónica sintomática se desarrolla en aproximadamente un 30% de los pacientes, en los cuales se presentan cardiomiopatías tales como arritmias y disfunción cardíaca. También se pueden producir desórdenes gastrointestinales como megaesófago y megacolon, que se caracterizan por fallas en la motilidad (Rassi et al., 2010; Tustin & Bowman, 2016). En esta fase los parásitos son difícilmente detectables en circulación (Muñoz-Saravia et al., 2010; Rassi et al., 2010).

La EC congénita se considera como una infección aguda en los recién nacidos. La mayoría de los infantes son asintomáticos o presentan sintomatología leve; sólo un porcentaje bajo (menor al 12%) presenta sintomatología severa o incluso la muerte (Bern et al., 2019). Sin embargo, a largo plazo los

recién nacidos asintomáticos que no han recibido tratamiento médico pueden desarrollar enfermedades cardíacas severa en el transcurso de sus vidas (Buekens et al., 2008; Cofré et al., 2016). Por otra parte, las mujeres que reciben terapia antichagásica antes de la concepción son significativamente menos propensas a transmitir el parásito a sus hijos (Livingston et al., 2021; Murcia et al., 2012; Suárez et al., 2022), un estudio realizado en Argentina durante el 2017 demostró que en las mujeres seropositivas para la EC tratadas con Benznidazol disminuyó la prevalencia de recién nacidos infectados vía congénita en contraparte con mujeres no tratadas (Álvarez et al., 2017).

1.6. Tratamiento

Actualmente, sólo dos drogas nitro heterocíclicas están disponibles como tratamiento contra la EC, Nifurtimox (NFX) y Benznidazol (BZN).

El BZN requiere de las enzimas metabólicas del parásito para estar en su forma activa. Así, los metabolitos activos actúan mediante múltiples mecanismos, incluyendo la interrupción de las vías de la síntesis de las moléculas antioxidantes glutatión y tripanotión (Müller Kratz et al., 2018). Por otra parte, NFX también actúa mediante diversos mecanismos, incluyendo la alteración del metabolismo de carbohidratos de *T. cruzi* a través de la inhibición de la síntesis del ácido pirúvico (Bern et al., 2019).

Lamentablemente, la eficacia de BZN y NFX dista mucho de ser óptima para pacientes infectados crónicamente puesto que presentan una alta incidencia de reacciones adversas (Jackson et al., 2020) y son teratogénicos (Rojo et al., 2014; Sales et al., 2017). Actualmente no existe ninguna vacuna disponible para prevenir la infección por *T. cruzi* u otro tratamiento para la EC (Bern et al., 2019; Sales et al., 2017).

1.7. Transmisión congénita

En los últimos años la transmisión congénita ha ganado importancia epidemiológica en países endémicos y no endémicos. A pesar de que sus tasas de transmisión son bajas (4 a 7 %) (Carlier & Torrico, 2010; Pérez-Molina & Molina, 2018), constituye una de las rutas de transmisión parcialmente responsables de la globalización de la enfermedad. Más aún, si se interrumpiera totalmente la transmisión vectorial, la transmisión por vía congénita continuaría siendo un problema de salud pública hasta que las mujeres infectadas en período de gestación disminuyan proporcionalmente. Por lo que se estima que seguirán apareciendo casos de EC congénita por más de treinta años (Pérez-Aguilar et al., 2012). Actualmente, los casos de transmisión congénita representan entre el 22 al 25 % de los casos nuevos por año (Picado et al., 2018; Stillwaggon et al., 2018).

La mayoría de las mujeres infectadas y en edad gestacional adquirieron la infección durante la infancia. Según estimaciones de la OMS, 1.125.000 mujeres en edad fértil están infectadas con *T. cruzi*

en América Latina, con una incidencia de infección congénita de alrededor de 9.000 casos por año y cientos de casos en Estados Unidos y Europa (WHO, 2015). Es importante destacar que la transmisión materno-fetal de *T. cruzi* puede repetirse en cada embarazo y observarse de una generación a otra, de esta manera la transmisión puede extenderse fácilmente en el tiempo (Messenger et al., 2017).

La probabilidad de transmisión congénita depende de factores propios del parásito (virulencia, cepa, parasitemia, entre otros), del sistema inmunitario materno como fetal en desarrollo y de la placenta (Castillo, Medina, et al., 2017; Duaso et al., 2010; Fretes & Kemmerling, 2012; Kemmerling et al., 2019; Liempi et al., 2016; Medina et al., 2020, 2022; Sturm et al., 2003).

1.8. Respuesta inmunitaria materna y fetal en desarrollo

Durante el embarazo, el sistema inmunitario materno se caracteriza por un reforzamiento del reconocimiento celular y molecular, comunicación y reparación; siendo capaz de enviar señales alarma para mantener el bienestar de la madre y el feto (Mor et al., 2017; Mor & Cardenas, 2010). Por otro lado, el feto presenta un sistema inmunitario activo en desarrollo que modificará la forma en que la madre responde al medio ambiente, proporcionando una singularidad de las respuestas defensivas durante el embarazo (Mor & Cardenas, 2010). El éxito del embarazo en mamíferos depende del establecimiento y mantenimiento de una interfaz materno-fetal adecuada y de la tolerancia inmunitaria materna hacia el feto semi-alogénico (Bidarimath et al., 2014). Así, durante el embarazo el útero sufre cambios en su entorno celular y molecular para sustentar la implantación del embrión y mantener la supervivencia fetal (Moffett & Loke, 2006). Esto se ve facilitado por una interacción coordinada entre dos órganos distintos: el endometrio y la placenta (Bidarimath et al., 2014; Moffett & Loke, 2006).

1.9. Placenta

La placenta es un órgano temporal que separa los compartimientos maternos y fetales durante el embarazo (Arora et al., 2017); es la encargada del intercambio metabólico y síntesis de hormonas fundamentales para el feto, asegurando su crecimiento/desarrollo normal y apoyando los cambios relacionados con el embarazo en los sistemas fisiológicos maternos (Benirschke, 2012). A su vez, la placenta desempeña un papel crucial en la regulación tanto de las respuestas inmunitarias maternas como fetales y de las defensas inmunitarias innatas locales (Castillo, Medina, et al., 2017; Delorme-Axford et al., 2014; Liempi et al., 2016). Por ende, la placenta, se considera como un mediador inmunológico clave durante el embarazo, protegiendo al feto contra varios patógenos (Delorme-Axford et al., 2014; Mor et al., 2017).

La placenta se clasifica según el tipo de barrera placentaria que separa la sangre materna de la sangre fetal y el grado de invasión en el endometrio: en hemocorial (muy invasiva), endoteliocorial (moderadamente invasiva) y epiteliocorial (poco invasiva). Interesantemente, el tipo de barrera placentaria se ha correlacionado con la probabilidad de transmisión de patógenos, ya que éstos la deben atravesar para infectar al feto (Liempi et al., 2020). Así, la placenta humana clasifica como discoidal vellositaria hemocorial y está compuesta por una porción fetal desarrollada a partir del corión frondoso y una porción materna o decidua basal que se origina en el endometrio. La unidad morfofuncional básica corresponde a la vellosidad coriónica libre, en la cual se encuentra la barrera placentaria formada por el trofoblasto y el estroma vellositario que contiene los vasos fetales y láminas basales que sustentan a los distintos epitelios (trofoblasto y endotelio fetal). En este tipo de barrera la sangre materna está en contacto directo con el trofoblasto (Benirschke, 2012; Liempi et al., 2016, 2019), el mantenimiento de esta barrera anatómica depende en parte del recambio epitelial del trofoblasto (Kemmerling et al., 2019; Liempi et al., 2016).

www.bdigital.ula.ve

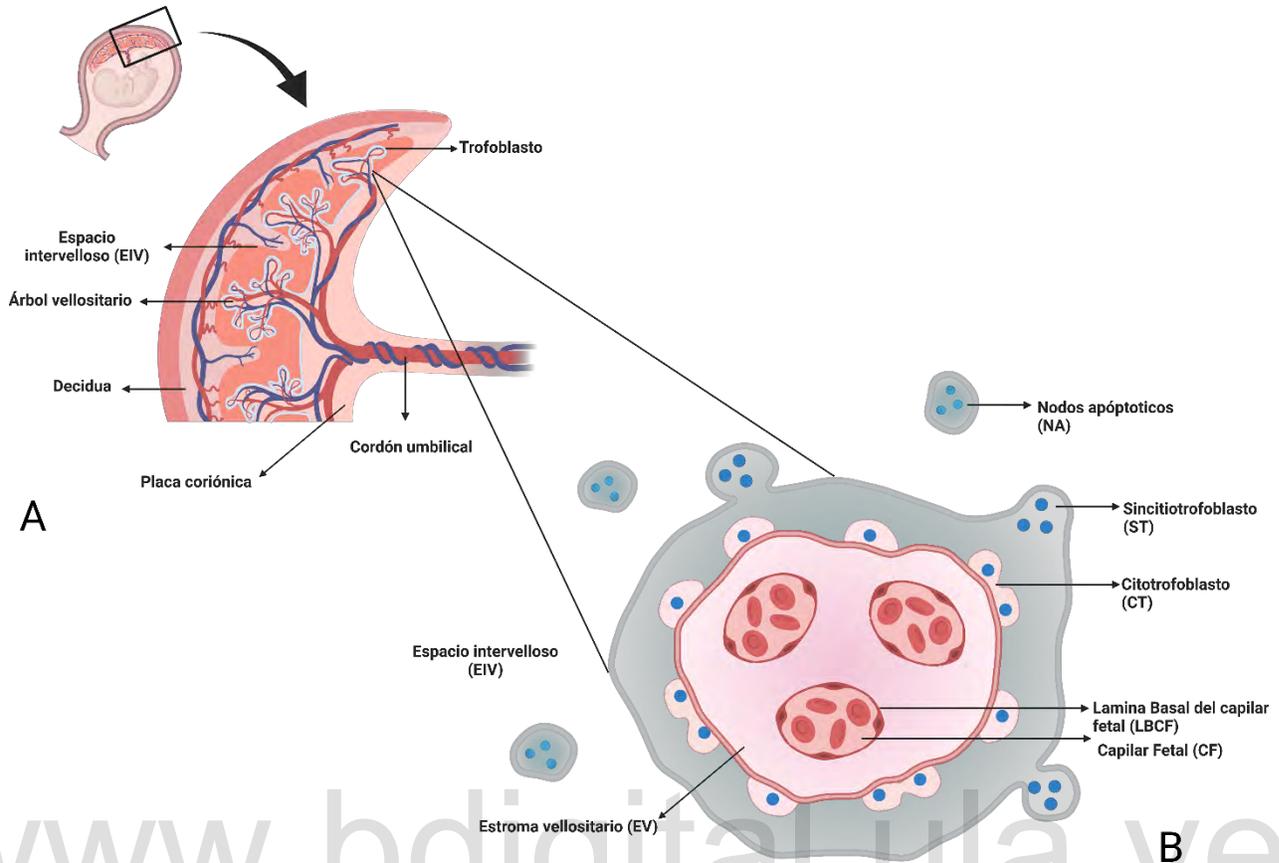


Figura 3. Estructura esquemática de la placenta. (A) La placenta está compuesta por una parte fetal y una parte materna. La parte materna se forma por la decidua que es parte del endometrio; la parte fetal está compuesta por la placa coriónica de la cual emergen las arborizaciones vellositarias. Miometrio, cordón umbilical, líquido amniótico no forman parte de la placenta. Barrera placentaria: Las unidades morfofuncionales, donde se encuentra la barrera placentaria son las vellosidades coriónicas (prolongaciones del árbol vellositario) formadas por el trofoblasto y estroma veloso (EV). La sangre materna entra a la placenta por las arterias espiraladas y se pone en contacto con el trofoblasto en el espacio intervellositario (EVS). (B) El trofoblasto es un epitelio de revestimiento biestratificado compuesto por un estrato superficial no proliferativo (sincitiotrofoblasto (ST), y una capa germinal proliferativa, el citotrofoblasto (CT). Durante el recambio epitelial ocurre la muerte celular fisiológica en el trofoblasto que se manifiesta mediante la formación de nodos sinciciales apoptóticos, que se liberan en la sangre materna. El trofoblasto a su vez está conectado y separado del EV y de los capilares fetales por una lámina basal. El capilar fetal posee pericitos que lo envuelven para mantener su estructura, además de ayudar con el movimiento contráctil del capilar. (Creación propia con BioRender.com basada en Delorme-Axford et al., 2014; Kemmerling et al., 2019; A. Liempi et al., 2016).

Importantemente, células y tejidos de la placenta humana han sido ampliamente utilizados en estudios biomédicos (Fretes & Kemmerling, 2012; Turco et al., 2018) y ofrecen posibilidades únicas para estudiar las interacciones parásito-huésped. La placenta se obtiene fácilmente después del parto y ya no es necesaria para el recién nacido o la madre. A pesar de que hoy en día, ha sido imposible establecer modelos de laboratorio que asemejen las complejidades de este órgano, el uso de explantes de placenta humana (EPH) a partir de placentas de embarazos a término es una forma ampliamente utilizada y bien establecida de estudiar los mecanismos de interacción patógeno-hospedador (Castillo et al., 2018;

Castillo, Medina, et al., 2017; Duaso et al., 2010; Fretes & Kemmerling, 2012; Kemmerling et al., 2010; Liempi et al., 2016; Lowe et al., 2018; Luján et al., 2004; Medina et al., 2020; Rojo et al., 2014).

Se ha propuesto que la placenta posee mecanismos de defensas locales contra *T. cruzi* (Kemmerling et al., 2019; Liempi et al., 2014, 2016, 2019).

1.10. Mecanismos de defensa placentarias anti-T. cruzi

Hay varios hechos que indican que la placenta presenta una defensa efectiva contra *T. cruzi*:

i) Las tasas de transmisión congénitas son bajas (Carlier et al., 2015; Carlier & Torrico, 2015).

ii) Los nidos típicos de amastigotes, que son característicos en otros tejidos, no pueden observarse en placentas de madres con EC en fase crónica (Duaso et al., 2012) ni en EPH infectados *ex vivo* con el parásito (Duaso et al., 2010; Fretes et al., 2012; Luján et al., 2004).

iii) Sólo unos pocos antígenos parasitarios y ADN se pueden identificar en el estroma vellositario de EPH (Duaso et al., 2010; Luján et al., 2004).

iv) Los EPH infectados *ex vivo* son menos susceptibles a la infección de *T. cruzi* en comparación con otras células de mamíferos, como el fibroblasto (Díaz-Luján et al., 2012).

Respecto a los posibles mecanismos anti-*T. cruzi* de la placenta se ha demostrado uno de ellos es el recambio epitelial del trofoblasto vellositario. Este recambio epitelial se considera parte del sistema inmunitario innato ya que los patógenos, antes de la invasión celular, deben unirse a la superficie de las células. A medida que estas células se eliminan continuamente, los patógenos unidos se eliminan con ellos (Liempi et al., 2014, 2016).

El trofoblasto es un epitelio biestratificado (Carrillo et al., 2016; Liempi et al., 2014, 2016) compuesto por el sincitiotrofoblasto superficial (ST) y el citotrofoblasto basal (CT) (**Figura 3**). El CT muestra propiedades proliferativas altas, mientras que el ST diferenciado pierde su capacidad generativa y ya no es capaz de proliferar. El ST es multinucleado, continuo y normalmente ininterrumpido, cubriendo todos los árboles vellositarios de la placenta humana (Benirschke, 2012).

El recambio epitelial del trofoblasto implica una orquestación precisa de diferentes procesos celulares que incluyen la proliferación celular de la CT, la diferenciación celular (es decir, la fusión sincitial mediante la incorporación de células CT en el ST y la diferenciación de las células CT de fusión previa con el ST) y la muerte celular programada (Huppertz & Gauster, 2011; Mayhew, 2014) (**Figura 3**). Cabe destacar que, *T. cruzi* induce todos los procesos celulares en EPH (Castillo et al., 2018; Kemmerling et al., 2017, 2019; Liempi et al., 2019; Medina et al., 2018).

La diferenciación celular del trofoblasto es uno de los procesos mejor estudiados e involucra a proteínas fusogénicas, proteasas y proteínas del citoesqueleto, así como también citoquinas, hormonas y factores de transcripción (Benirschke, 2012; Gauster et al., 2009). Entre los factores considerados como marcadores de diferenciación se destacan:

a) Factor de transcripción hGCM-1 (“human glial cell missing homolog-1”): Es un factor de transcripción específico de la placenta, se ha demostrado que está directamente relacionado con el inicio de la fusión del trofoblasto, regulando la expresión de las sincitinas. Al mismo tiempo, la actividad del hGCM-1 sólo se inicia cuando una célula del CT ha abandonado el ciclo celular. Así, la actividad del hGCM-1 se correlaciona negativamente con la proliferación del trofoblasto (Baczyk et al., 2009). Se ha demostrado previamente que *T. cruzi* induce la expresión de hGCM-1 en EPH (Liempi et al., 2014).

b) Caspasa-8: Es una proteasa cisteína-aspartato específica y tiene un rol crucial en la cascada de la apoptosis, actuando como iniciador. La activación inicial de la caspasa-8 tiene lugar en células del CT justo antes de la fusión, se mantiene activa durante un corto tiempo y luego se inactiva (Huppertz & Gauster, 2011). Una de las funciones asociadas a la caspasa-8 es la escisión de las proteínas del citoesqueleto, como la alfa-fodrina (Gauster et al., 2009). Por otra parte, la activación de la caspasa-8 media la traslocación de la fosfatidilserina (FS) desde la cara interna a la cara externa de la membrana plasmática. La FS es el fosfolípido más abundante en la membrana plasmática que, en circunstancias normales, predomina en la cara interna de la célula (Daleke, 2007). La exposición de FS en la cara externa de la membrana plasmática no sólo se ha asociado al proceso de muerte celular tipo apoptosis sino también a la fusión celular (Gauster et al., 2009). La remodelación del citoesqueleto por parte de caspasas (inicialmente caspasa-8, luego caspasas efectoras 3, 6 ó 7) junto con la expresión de proteínas fusogénicas, causarían la formación de un poro de fusión entre el CT y el ST suprayacente. A partir de esto, los componentes celulares del CT como el núcleo, organelos y las proteínas citoplasmáticas, son incorporadas al ST. La caspasa-8 activa también es modulada por c-FLIP (proteína inhibidora de FLICE). Este inhibidor está presente en dos variantes y actúa directamente sobre la caspasa-8, induciendo la activación o inhibición de esta (D. W. Chang et al., 2002). Por lo tanto, en el ST la caspasa-8 disminuye su actividad después de la fusión sincicial por acción de Bcl-2 (Linfoma de células B) y c-FLIP. El parásito activa e induce la actividad enzimática de caspasa 8 en una línea celular de trofoblasto, más aún la inhibición de la enzima aumenta la infección parasitaria (Liempi et al., 2016; Medina et al., 2020).

c) Proteínas de la familia de las sincitinas, que son codificadas por genes fusogénicos de retrovirus endógenos humanos (HERV), como lo son la sincitina-1 la cual es codificada por el gen HERV-W y la sincitina-2 por el gen HERV-FRD (Dupressoir et al., 2012; Mi et al., 2000; Wang et al., 2018).

d) Marcadores bioquímicos: como la producción de la hormona gonadotropina coriónica humana (hCG) que ocurre únicamente en el ST. La hCG es una glicoproteína compuesta de una subunidad alfa (α -hCG) (común en las gonadotropinas secretadas en la pituitaria, tales como la hormona luteinizante (LH), la hormona folículo estimulante (FSH) y la hormona estimulante de la tiroides (TSH)) y la subunidad beta (β -HCG) la que confiere la especificidad biológica a esta hormona (Handschuh et al., 2007). La manutención del embarazo durante el primer trimestre depende de la síntesis de la hCG que impide la regresión del cuerpo lúteo, lo que permite el mantenimiento de la secreción de progesterona ovárica. La hCG aumenta su propia síntesis en una forma autocrina mediante la inducción de la formación de ST a través del receptor de la hormona luteinizante/coriogonadotropina (LHCGR) y la proteína cinasa A (PKA) dependiente de adenosín monofosfato cíclico (AMPC) (Cronier, 1998). La secreción de hCG y de lactógeno placentario (hPL) son los principales marcadores bioquímicos de la diferenciación de trofoblasto *in vitro*.

En particular, todas estas respuestas celulares y tisulares implican profundos cambios en la expresión génica.

1.11. MicroARNs

La expresión génica en el hospedador es regulada tanto a nivel transcripcional como postranscripcional. Particularmente los ARNs no codificantes (ncARNs), entre ellos los microARNs (miARNs), regulan la expresión de genes al nivel postranscripcional (Laugier et al., 2020) mediante la represión de los ARN mensajeros (ARNm) (Bartel, 2004, 2009; de la Fuente Jiménez et al., 2020; Liu et al., 2018).

Los miARNs son pequeñas moléculas de ARN monocatenario no codificante de aproximadamente 22 nucleótidos (nt) de largo. Los miARNs regulan la expresión de más del 60% de los genes fundamentales involucrados en procesos biológicos claves, incluyendo desarrollo, proliferación celular, diferenciación, muerte celular (incluyendo la apoptosis), metabolismo y respuesta inmunitaria (Paul et al., 2020; Salehi & Sharifi, 2018; Zheng et al., 2013). Durante el embarazo, los miARNs participan en procesos esenciales para la regulación de la implantación del embrión, placentación, desarrollo fetal y adaptación materna. De hecho, la desregulación de los miARNs durante la gestación se asocia a complicaciones tales como parto prematuro (Liu et al., 2018).

Los miARNs reprimen los ARNm de manera secuencia-específica mediante uno de los siguientes mecanismos: i) a través del proceso de degradación del ARNm o ii) a través de la inhibición de la traducción de ARNm (Hayder et al., 2018; Ojha et al., 2016; Salehi & Sharifi, 2018).

Alrededor del 70% de los precursores de miARN se localizan dentro de los intrones o exones de genes de codificación de proteínas; el otro 30% de ellos se encuentran en las áreas intergénicas (Hayder et al., 2018; Salehi & Sharifi, 2018).

1.12. Síntesis de miARNs

La mayoría de los genes que codifican para miARN son expresados bajo el control de sus propios promotores y secuencias regulatorias. Por otra parte, otros se agrupan en clústers y pueden ser co-regulados entre ellos mismos, pudiendo sus productos génicos colaborar aditivamente para regular un set de ARNm (Ambros, 2004). Dichos clústeres se encuentran altamente conservados entre especies (Altuvia et al., 2005). Por lo tanto, diferentes miARNs pueden actuar sobre el mismo ARNm y distintos ARNm pueden ser regulados por un mismo miARN, todo esto asociado al patrón de complementariedad entre los mismos (Prieto & Markert, 2011).

La transcripción de los miARNs es mediada por la ARN polimerasa II, generándose pri-miARNs que poseen una longitud mayor de 1kb y que adoptan una estructura de doble hebra por complementariedad de bases. Los pri-miARNs son procesados por el complejo "microprocesador", que incluye la endonucleasa ARNasa III Drosha, la proteína de unión de ARN de doble hebra ("dsRNA-binding protein") y la proteína DGCR8 ("DiGeorge syndrome critical region gene 8"), para dar origen a los pre-miARNs de 60-70 nt de longitud, doble hebra y con forma de bucle. Los pre-miARNs son exportados desde el núcleo al citoplasma a través de la Exportina-5 (XPO5). En el citoplasma los pre-miARNs son procesados por la ribonucleasa Dicer que inicia la formación del complejo RISC ("RNA-induced silencing complex"). Primero se forma una doble estructura compuesta por dos hebras de miARN que luego se desensambla formando dos hebras individuales de miARN maduro. El miARN maduro se une a la proteína Argonauta 2 (Ago2) que forma parte del complejo RISC (Bidarimath et al., 2014; Gregory et al., 2004; Krol et al., 2010). La unión de los miARN con los ARNm (según complementariedad parcial o total) conduce a la regulación de su expresión ya sea por degradación del ARNm o inhibiendo su traducción (Paul et al., 2020; Rojas-pirela et al., 2022; Treiber et al., 2019).

1.13. Regulación de la expresión génica mediante miARNs

El mecanismo de represión mediado por los miARNs depende de la interacción entre los miARN y los ARNm, la cual ocurre por medio del apareamiento complementario de bases en secuencias consenso (2-7 nucleótidos) que se encuentran en el miARN y en el 3'UTR del ARNm (Bartel, 2009). Sin embargo, en casos excepcionales también pueden asociarse a la región codificante o al 5'UTR (Cleys et al., 2014).

Si el apareamiento es extenso la cascada culmina en la ruptura del ARNm por medio de Dicer y su exposición a exonucleasas, mientras que si el apareamiento es incompleto se produce la represión traduccional del ARNm (Cheng et al., 2005) mediante la desestabilización del ARNm y transferencia del ARNm hacia los cuerpos de tratamiento (P-bodies) donde el ARNm es degradado.

1.14. miARNs como herramientas diagnósticas

Los miARNs se consideran potenciales herramientas diagnósticas y de pronóstico prometedoras, así como blancos terapéuticos para diferentes patologías, incluyendo cáncer e infecciones (Salehi & Sharifi, 2018), ya que:

i) Los cambios en la expresión de miARNs en patologías son detectables en fluidos biológicos (Obad et al., 2011; Sadovsky et al., 2015).

ii) La expresión de estas moléculas es tejido-específica (Lu et al., 2005; Sadovsky et al., 2015). Los miARNs son estables en tejidos fijados en formalina e incluidos en parafina (Li et al., 2007).

iii) Los miARNs se pueden modular de múltiples maneras, ya sea a nivel de biogénesis o ajustando su modo de acción. Además, actualmente se estudian y desarrollan diferentes sistemas de entrega de miARN (como sistemas de entrega biomimética y nanopartículas sintéticas) (Anthiya et al., 2018).

iv) Los miARNs pueden administrarse *in vivo* y aparentemente carecen de eventos adversos cuando se administran por vía intravenosa (Obad et al., 2011; Sadovsky et al., 2015).

1.15. miARNs y *T. cruzi*

T. cruzi no posee ARNs pequeños canónicos, como miARNs y ARNs interferentes (Fernandez-Calero et al., 2015; Franzén et al., 2011). Este hecho permite estudiar a los miARNs humanos placenta específico inducidos por infección por *T. cruzi*, asegurando que los posibles cambios en los miARNs corresponden al hospedador.

Por otra parte, se ha descrito ampliamente que *T. cruzi* induce cambios en la expresión de miARNs en el hospedador (Ferreira et al., 2014; Laugier et al., 2020; Zheng et al., 2013), incluido en la placenta humana (Medina et al., 2020).

1.16. microARNs en placenta

En humano, el clúster más grande de miARN está codificado en el cromosoma 19 (C19MC) (19q13.41) que se expresa casi exclusivamente en la placenta (Bortolin-Cavaille et al., 2009; Donker et al., 2012; Sadovsky et al., 2015), y particularmente en el trofoblasto (Bounds et al., 2017; Sadovsky et al., 2015). Los miARNs derivados, así como no derivados del C19MC se han asociado con el desarrollo

placentario (Bounds et al., 2017; Hayder et al., 2018) y con diversas patologías del embarazo como la preeclampsia y la restricción del crecimiento intrauterino, además de infecciones (Hayder et al., 2018; Hromadnikova et al., 2015; Sadovsky et al., 2015). Particularmente los miARNs derivados del C19MC se han implicado en la regulación de la proliferación celular, la diferenciación y la muerte celular en el trofoblasto (Mouillet et al., 2014, 2015).

El C19MC mide aproximadamente ~100 kb y comprende 46 genes de impronta paterna que generan a 58 miARNs maduros (Apicella et al., 2019). La expresión de éstos está controlada por la metilación en la región promotora rica en CpG aguas arriba a 17,6 kb de C19MC y aumenta notablemente en el trofoblasto de placenta desde el primer hasta el tercer trimestre (Hromadnikova et al., 2019). Los miARN que se expresan en el trofoblasto también se conocen como “trofomiRs” y alguno de éstos confieren resistencia a la infección viral en tipos de células no placentarias (Bayer et al., 2015; Delorme-Axford et al., 2014).

Particularmente miR-512-3p y miR-515-5p son dos trofomiRs que regulan el recambio epitelial del trofoblasto, por ende, son moléculas interesantes para estudiar en la interacción *T. cruzi*-placenta.

1.17. miR-512-3p

miR-512-3p (Secuencia: AAGUGCUGUCAUAGCUGAGGUC) confiere resistencia al virus de la estomatitis vesicular en células receptoras no placentarias (Delorme-Axford et al., 2013) y promueve el recambio del trofoblasto. Así, este miARN reprime el inhibidor de la caspasa 8, c-FLIP; en consecuencia, aumenta la actividad de la caspasa 8 (Chen et al., 2010).

Como se describió anteriormente, la caspasa 8 regula la diferenciación trofoblasto y la muerte celular apoptótica, ambos procesos son inducidos por *T. cruzi* (Carrillo et al., 2016; Liempi et al., 2014, 2016).

De hecho, resultados previos indican que el parásito aumenta la expresión de este miARN en EPH (Figura 4) (Medina et al., 2022).

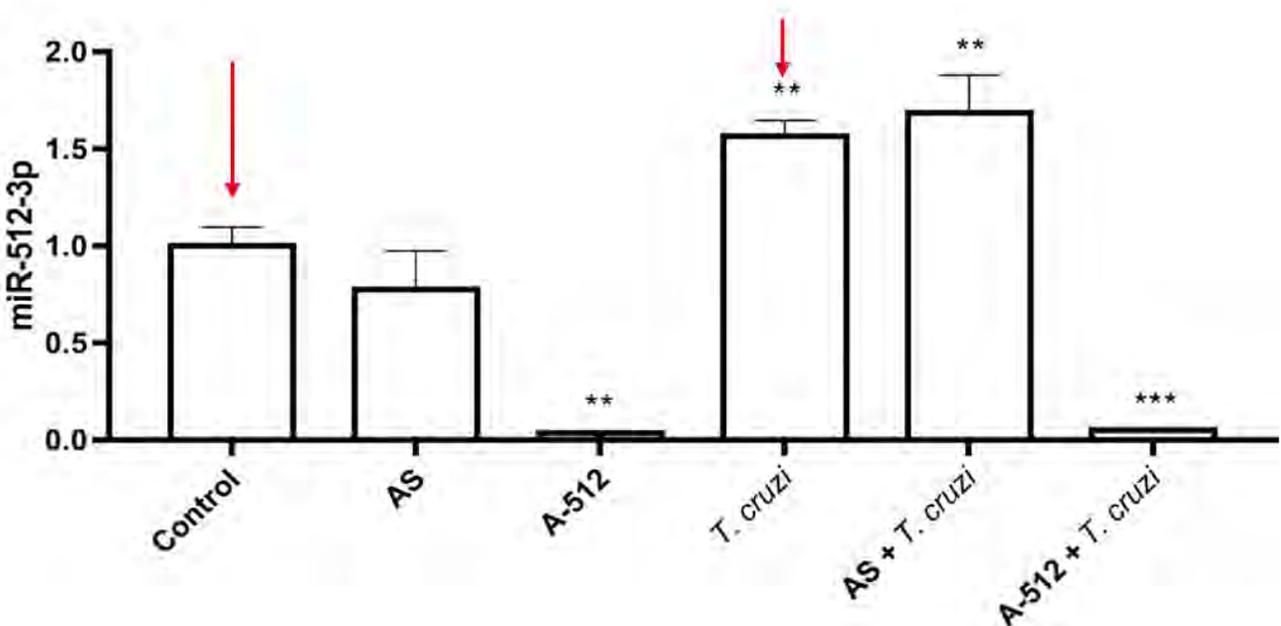


Figura 4. Expresión diferencial de los niveles del miR-515-5p durante infección *ex vivo* de EPH con *T. cruzi*.

Los EPH fueron transfectados con 100nM de los antagonistas de miR-512-3p (A-512) y su respectivo scramble (AS) durante 24h. Posteriormente fueron infectados durante 2h con tripomastigotes de *T. cruzi* a una concentración de 10^5 tripomastigotes/ml. La expresión del microARN fue determinada mediante PCR en tiempo real. Todos los valores se dan como medias \pm SD; los datos se normalizaron a valores de control y se analizaron a través de ANOVA unidireccional y post-test de Dunnett. * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$ (Medina et al., 2022).

1.18. miR-515-5p

miR-515-5p (Secuencia: UUCUCCAAAAGAAAGCACUUUCUG) se relaciona con la inhibición de la diferenciación trofoblasto, ya que reprime directamente los genes aromatasa P450 (hCYP19A1), Frizzled 5 (Fzd5) y al factor de transcripción hGCM1. Este último media, como se describió más arriba, la expresión de la hCG y de la sincitina (Huppertz & Gauster, 2011). Curiosamente, ambas moléculas son inducidas por *T. cruzi* en los cultivos EPH (Liempi et al., 2014, 2016). Más aún, resultados previos muestran que *T. cruzi* disminuye la expresión de miR-515-5p (Figura 5) (Medina et

al., 2022). Además, la desregulación de éste miARN está relacionada con la preeclampsia (Zhang et al., 2016).

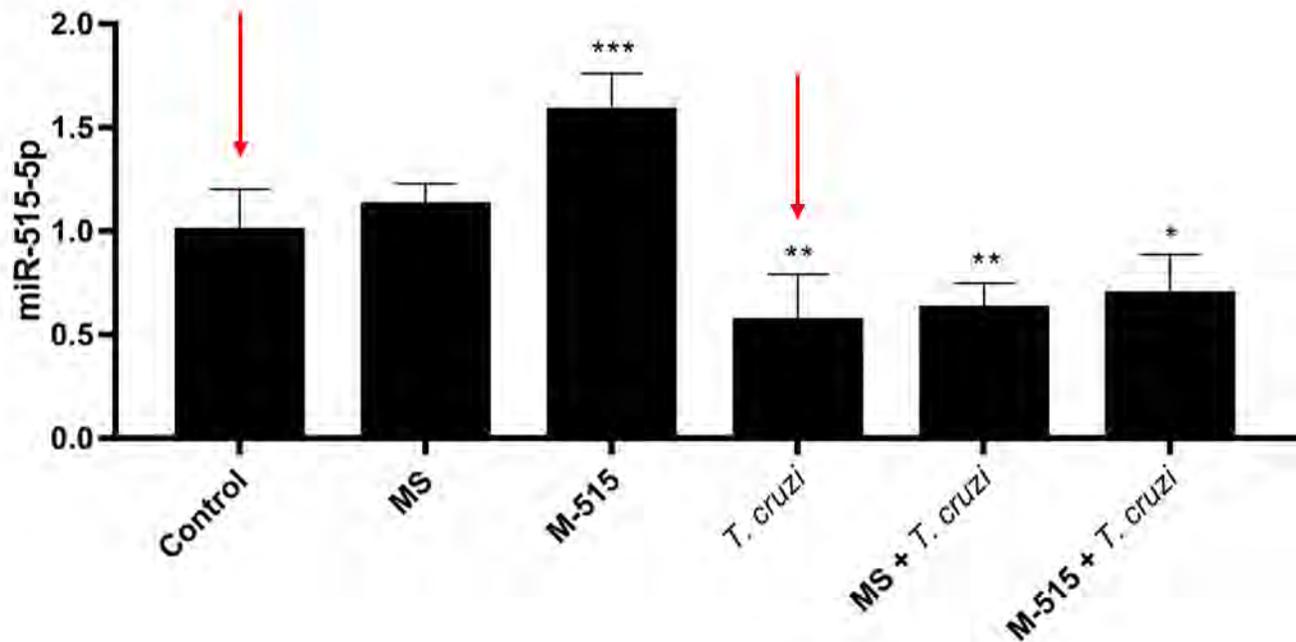


Figura 5. Expresión diferencial de los niveles del miR-515-5p durante infección ex vivo de EPH con *T. cruzi*. Los EPH fueron transfectados con 100nM de los mimics de miR-512-3p (M-515) y su respectivo scramble (MS) durante 24h. Posteriormente fueron infectados durante 2h con tripomastigotes de *T. cruzi* a una concentración de 10^5 tripomastigotes/ml. La expresión del microARN fue determinada mediante PCR en tiempo real. La presencia del miARN fue determinada por RT-qPCR. Los datos representan el promedio \pm SD; los datos se normalizaron través de ANOVA unidireccional y post-test de Dunnett. * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$ (Medina et al., 2022).

Sin embargo, aún se desconoce el rol de miR-512-3p y miR515-5p en el recambio epitelial del trofoblasto inducido por el parásito. Particularmente, se desconocen los cambios en su expresión y localización durante este proceso.

Tomando en cuenta que: i) La interacción patógeno-hospedador determina la probabilidad de infección (Sen et al., 2016); ii) *T. cruzi* induce el recambio epitelial del trofoblasto, particularmente proliferación celular (Liempi et al., 2016), diferenciación (Carrillo et al., 2016; Castillo, Gallardo, et al., 2017; Liempi et al., 2014) y muerte celular tipo apoptosis (Carrillo et al., 2016; Castillo, Medina, et al., 2017; Duaso et al., 2010); iii) *T. cruzi* modula las vías de transducción de señal relacionadas con el recambio del trofoblasto, incluida a la vía extrínseca de la apoptosis que involucra a la caspasa 8 (Carrillo et al., 2016; Castillo, Ramírez, et al., 2013; Liempi et al., 2016); iv) Los procesos antes mencionados están regulados por miARNs (Esteller, 2011; Hayder et al., 2018; Salehi & Sharifi, 2018; Zheng et al., 2013) y v) que resultados previos indican que *T. cruzi* modula la expresión de miR-512-3p y miR-515-5p en EPH (**Figuras 4 y 5**) (Medina et al., 2022); en este proyecto de investigación se propuso estudiar los niveles de expresión y localización de miR-512-3p y miR515-5p en respuesta a la infección del

parásito en explantes de placenta humana mediante las técnicas de RT-qPCR e hibridación *in situ* cromogénica (HISC).

Por lo que este proyecto de investigación constituye un aporte para mejorar el entendimiento de las complejas interacciones hospedador-parásito y de los mecanismos involucrados para generar resistencia o susceptibilidad a la infección congénita.

2. HIPÓTESIS

T. cruzi aumenta y disminuye, respectivamente, en el trofoblasto los niveles de expresión de miR-512-3p y de miR-515-5p durante la infección *ex vivo* de EPH.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo general

Evaluar los niveles de expresión y localización tisular de miARNs (miR-512-3p y miR-515-5p) en explantes de placenta humana en respuesta a la infección por *T. cruzi*.

3.2. Objetivos específicos

Determinar en EPH infectados *ex vivo* con tripomastigotes de *T. cruzi*:

- 1) Los niveles de expresión de miR-512-3p y miR515-5p mediante RT-qPCR y HISC.
- 2) La localización de miR-512-3p y miR515-5p mediante HISC.

4. JUSTIFICACIÓN Y APLICABILIDAD DE LOS RESULTADOS

El rol exacto de la placenta en la transmisión congénita de *T. cruzi* todavía no ha sido dilucidado. Sin embargo, para que ocurra la infección al feto, el parásito debe atravesar a la barrera placentaria mientras que el hospedador intenta mantener la integridad de esta.

Este estudio constituye un aporte a futuras investigaciones que en conjunto permitirán lograr el esclarecimiento de las complejas interacciones de los mecanismos involucrados para generar resistencia o susceptibilidad a la infección congénita. Así, la identificación y conocimiento del rol de los miARNs en este proceso es fundamental y abre la posibilidad de nuevas herramientas de diagnóstico, pronóstico y terapéuticas. Por lo tanto, es necesario profundizar los estudios que permitan esclarecer el papel del parásito, la respuesta genética del hospedador y la respuesta inmunitaria generada con la finalidad de dilucidar los mecanismos a través de los cuales ocurre la transmisión congénita por *T. cruzi*. En particular, miR-512-3p y miR515-5p podrían eventualmente ser biomarcadores para la transmisión congénita de *T. cruzi*.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1. Cultivo de células VERO®

Para el mantenimiento y obtención de la forma infectiva de *T. cruzi* se requieren células de mamífero, para ello se utilizaron células VERO® (fibroblasto de riñón de mono verde africano (*Cercopithecus aethiops*)), las cuales fueron cultivadas con medio de cultivo RPMI (Gibco®) suplementado con bicarbonato de sodio (NaHCO₃) 2mg/ml, estreptomicina 100 µg/ml, penicilina 100 UI/ml y enriquecido al 5% con suero fetal bovino inactivado (SFB), a 37°C en un ambiente húmedo con 5% de CO₂, reemplazando el medio cada 24 o 48 horas (Liempi et al., 2014; Salas et al., 2008).

5.2. Obtención de forma infectiva tripomastigote de *T. cruzi*

Los EPH se co-cultivaron en presencia de tripomastigotes de *T. cruzi* en una concentración de 10⁵ parásitos/mL durante 2, 24 o 48 horas en 1 mL de medio RPMI 1640 suplementado con 5% de SFBi. Para los ensayos de RT-qPCR los EPH se mantuvieron en solución RNA Later® a 4°C durante toda la noche y luego congelados a -20°C hasta su procesamiento (Duaso et al., 2010; Liempi et al., 2014). Los EPH destinados a la extracción de ADN se mantuvieron en etanol al 95% a -20°C hasta su procesamiento.

5.3. Obtención e infección de explantes de placenta humana con *T. cruzi*

Las placentas fueron obtenidas desde el Servicio de Obstetricia y Ginecología del Hospital San José, Servicio de Salud Metropolitano Norte, Santiago - Chile, con previo consentimiento informado para el uso experimental de la placenta, el cual fue autorizado por cada paciente según las regulaciones del Comité de Ética Humana del Servicio de Salud Metropolitano Norte (Aprobación #AE 010/2019).

Para este proyecto se utilizaron placentas humanas de embarazos a término (mayor a 37 semanas), de madres sanas con embarazos monogestacionales y fetos con desarrollo normal a partir de partos por cesárea electiva (con la finalidad de asegurar la asepsia y preservación de la muestra). Los criterios de exclusión para la obtención de estas placentas fue el presentar cualquier patología materna, placentaria o fetal.

Una vez terminado el proceso de parto, las placentas fueron colectadas en una solución buffer fosfato salino (PBS: agua destilada, NaCl 135 mM, KCl 2,7 mM, Na₂HPO₄ 10 mM, KH₂PO₄ 1,8 mM, ajustado a pH a 7,4) a 37°C.

Los explantes se obtuvieron de tejido placentario de la parte central de los cotiledones, por el lado materno. Por medio de disección se obtuvieron explantes de un tamaño aproximado de 0,5 cm³ aproximadamente, los cuales se lavaron al menos 3 veces con PBS, con el fin de remover la sangre

presente en el tejido y luego se incubaron en medio RPMI 1640 suplementado con antibióticos y 5% SFBi (Liempi et al., 2014).

5.4. Verificación de la infección efectiva de los tripomastigotes de *T. cruzi* en los EPH

Se realizó mediante la cuantificación del ADN parasitario durante diferentes tiempos: 2h, 24h y 48h de infección con tripomastigotes de *T. cruzi*. Mediante el siguiente procedimiento:

5.4.1. Extracción del ADN de los EPH

Primeramente, se aisló el ADN total mediante técnicas estandarizadas del laboratorio, que consistieron en: la homogeneización del tejido con un ultraturrex y una posterior extracción de ADN mediante un kit de purificación de ADN Genomic Wizard (Promega®) de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Castillo, Gallardo, et al., 2017)

5.4.2. Cuantificación del ADN extraído de los EPH mediante RT-qPCR

Luego de extraído el ADN fue cuantificado mediante el sistema fotométrico μ DROP (TermoFisher®) y leído en un multiespectrofotómetro VariosKan Flash (TermoFisher®). Para la amplificación del ADN humano y del parásito, se usaron los oligos mostrados en la **Tabla 1**. Cada reacción contenía 10 μ L de SensiFAST™ SYBR® Hi-ROX Kit (Bioline®), 1 μ L de cada oligo a 10nM y 3 μ L de agua ultrapura libre de ADNasas, para un volumen total de 20 μ L y 1 ng/ μ L de DNA genómico. El programa térmico consistió en una pre-incubación a 95°C durante 3 minutos seguido de 40 ciclos de PCR de desnaturalización a 95°C 5 segundos y apareamiento a 60°C durante 30 segundos. Para finalizar se agregó una fase de disociación que correspondió a 95°C durante 15 segundos, 60°C durante 1 minuto, 95°C durante 15 segundos y por último 60°C durante 15 segundos. La expresión relativa se calculó por el método de doble control comparativo $\Delta\Delta C_t$ usando como control endógeno la expresión del gen constitutivo hGAPDH (Pfaffl, 2001), que codifica para la enzima gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (Sikand et al., 2012).

Tabla 1. Oligonucleótidos diana usados como oligos para qPCR específico para ADN

Oligos qPCR	Primer Forward	Primer Reverse
<i>T. cruzi</i>	5'-GCTCTTGCCACAMGGGTGC-3'	5'-CAAGCAGCGGATAGTTCAGG-3'
hGAPDH	5'-TGATGCGTGTACAAGCGTTTT-3'	5'-ACATGGTATTCACCACCCCACTAT-3'

5.5. Cuantificación de la expresión de los miARNs (miR-512-3p y miR-515-5p) mediante RT-qPCR

La expresión de miR-512-3p y miR-515-5p se determinó mediante RT-qPCR de dos colas (Androvic et al., 2017). La concentración de los miARNs fue medida con Quant-iT™ microARN Assay Kit (Molecular probes).

Para la síntesis de cADN a partir de miARNs se usó el sistema de la mezcla de síntesis MystiCq microARN cADN (Sigma-Aldrich), siguiendo las instrucciones del fabricante.

La reacción de qPCR se realizó con un detector de secuencia ABI Prism 7300 (Applied Biosystems®). Para ello se utilizó un volumen de reacción de 25 µL que contenía: 12,5 µL de la mezcla 2X MystiCq microARN SYBR Green qPCR Ready Mezcla, 0,5 µL del oligo MystiCq Universal PCR Primer 10 µM, 0,5 µL del oligo Primer MystiCq microARN qPCR Assay 10 µM (Tabla 2), 10,5 µL de agua libre de nucleasas, y 1 ng/µL de cADN.

El programa de temperaturas utilizado en la qPCR consistió en una pre-incubación a 95°C durante 2 minutos, seguido de 40 ciclos de desnaturalización a 95°C durante 5 segundos y apareamiento a 60°C durante 30 segundos. Para finalizar se agregó una fase de disociación que correspondió a 95°C durante 15 segundos, 60°C durante 1 minuto, 95°C durante 15 segundos y por último 60°C durante 15 segundos. Se calculó la expresión relativa por el método de doble control (Androvic et al., 2017; Pfaffl, 2001) comparativo $\Delta\Delta C_t$ usando como control endógeno la expresión del gen constitutivo ARN RNU6B (RNU6-1) (Kaija et al., 2020; Sauer et al., 2014).

Tabla 2. Oligonucleótidos diana usados como oligos para RT-qPCR de miARN.

Oligos qPCR	Secuencia
miR-512-3p	5'-AAGUGCUGUCAUAGCUGAGGUC-3'
miR-515-5p	5'-U UCUCCAAAGAAAGCACUUUCUG-3'
RNU6-1	5'-GUGCUCGCUUCGGCAGCACAUUACUAAAAUUGGAA CGAUACAGAGAAGAUUAGCAUGGCCCCUGCGCAAGG AUGACACGCAAUUCGUGAAGCGUCCAUAUUUU-3'

5.6. Localización y cuantificación de la expresión de los miARNs (miR-512-3p y miR-515-5p) mediante HISC

Para realizar la HISC fue necesario estandarizar la técnica en diferentes aspectos, incluyendo un pretratamiento, desnaturalización de las sondas e hibridación. Describiéndose consecuentemente:

5.6.1. Estandarización de la técnica HISC

Durante el proceso de estandarización se realizaron 15 hibridaciones con diferentes placentas, evaluando diferentes concentraciones de los reactivos y tiempos de los procesos. Siguiendo las

instrucciones del fabricante (QUIAGEN®, 2019) se realizó el primer proceso de la HISC y a partir del mismo se realizaron modificaciones. Los siguientes pasos para la estandarización de la técnica de HISC (Figura 6).

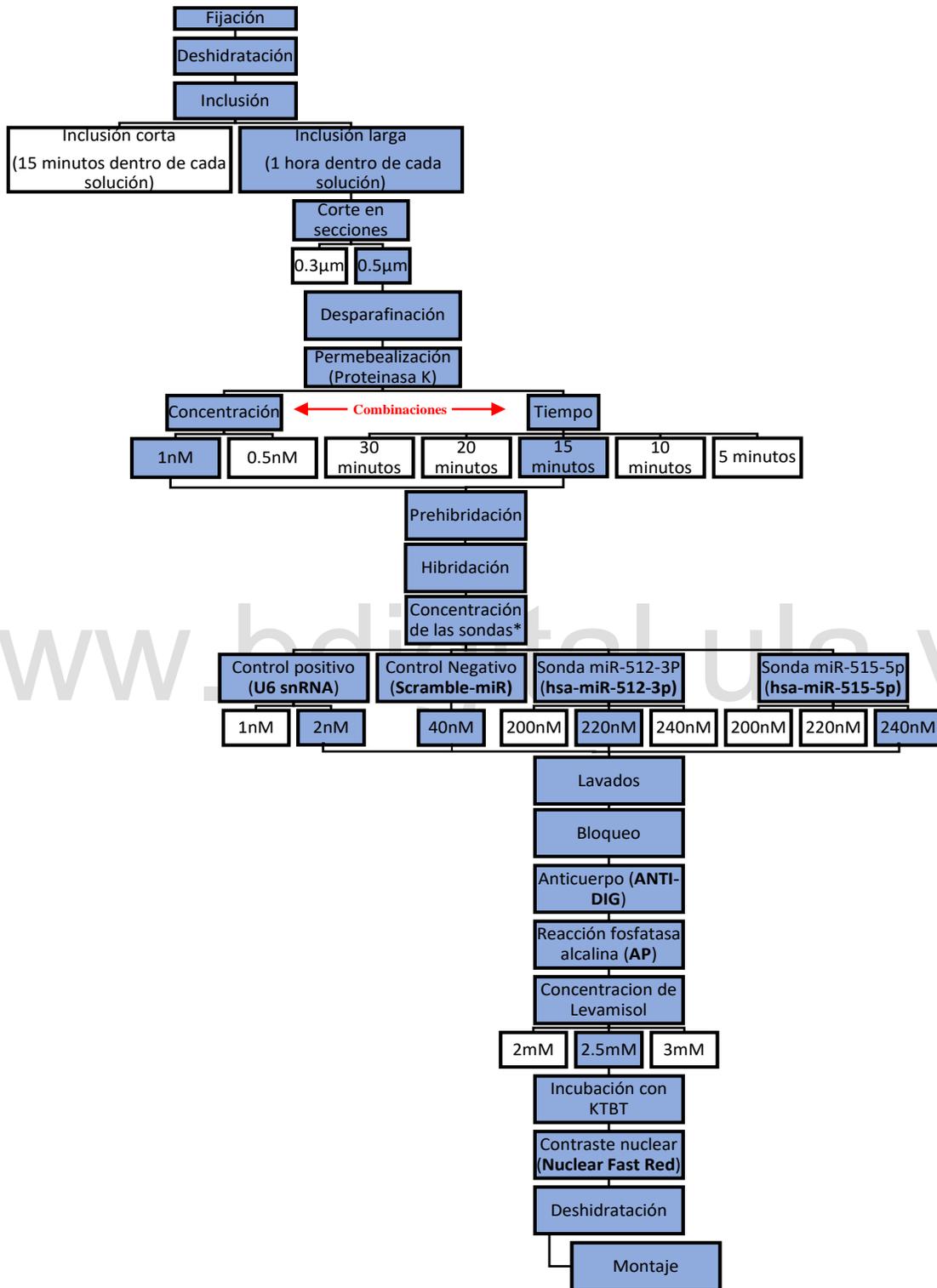


Figura 6. Estandarización de la técnica de Hibridación *in situ* Cromatográfica (HISC). Procesos que se siguieron para la estandarización de la técnica HISC. Las cuadrillas con fondo oscuro hacen referencia a la selección realizada.

5.6.2. Técnica de HISC

-Formación de tacos: Primeramente, fue necesario formar tacos de parafina con los tejidos a evaluar. De este modo, los EPH, tanto infectados como no infectados, fueron procesados mediante métodos histológicos convencionales. Así, las muestras fueron fijadas en formalina tamponada al 10% en una proporción 1:10 durante 12 horas, luego fueron introducidos los explantes en casetes para ser deshidratados las muestras en concentraciones crecientes de alcoholes (50%, 70%, 80%, 95%, 100% I, 100% II y 100% III durante 10 minutos en cada alcohol) y aclaradas en xilol (xilol I, II y III durante cada 15 minutos en cada xilol), para posteriormente ser incluidas en parafina (parafina I, II, III y IV durante 1h en cada parafina). Luego de la última inclusión, y con la ayuda de un Microarray de tejidos (Quick-Ray™) se realizaron perforaciones donde se encontraban los explantes para conformar un taco que contuviera las condiciones a evaluar (explantes control sin infectar, y explantes infectados con tripomastigotes de *T. cruzi*). El taco obtenido de la inclusión se cortó con un micrótopo (Leitz 1512®) para obtener secciones de 5µm de espesor que fueron extendidas en agua caliente a unos 40°C para luego ser situadas sobre portaobjetos y colocados estos sobre una plancha térmica regulable durante 12 horas posterior a este tiempo se dejaron 1 hora en la estufa. Luego se almacenaron a 4°C en un ambiente libre de ARNasas.

-Desparafinación: Las láminas obtenidas se procedieron a desparafinar las láminas en soluciones de Xilol y Etanol a temperatura ambiente (15-25°C) ubicándolas dentro de vasos que contuvieron las soluciones, de acuerdo con la siguiente tabla:

Tabla 3. Proceso de desparafinación. Soluciones y tiempo de procesamiento de las láminas dentro de los vasos.

Solución	Tiempo
Xilol I	5 minutos
Xilol II	5 minutos
Xilol III	5 minutos
Etanol 100% I	Sumergir 10 veces
Etanol 100% II	Sumergir 10 veces
Etanol 100% III	5 minutos
Etanol 96% I	Sumergir 10 veces
Etanol 96% II	5 minutos
Etanol 70% I	Sumergir 10 veces
Etanol 70% II	5 minutos
PBS	4 minutos

-Permeabilización (Proteinasa K): Luego se preparó el reactivo de la proteinasa K (1nM) inmediatamente antes de su uso, para ello se agregó 2μL de proteinasa K y se aforo hasta un volumen de 8mL. Se colocaron las láminas sobre una superficie plana y se aplicó sobre ellas (sin tocar el portaobjeto y/o el tejido) 400μL del reactivo de la proteinasa K y se dejó durante 15 minutos.

-Prehibridación: Se situó a cada lámina en la cámara húmeda 300μL (humedecida con agua + di etilo piro carbonato (DEPC)) y se agregó sobre ellas 400μL del buffer de hibridación (72.072g urea (4M concentración final), 75mL SSC 20X (70.12g NaCl (3M), 35.40g Citrato de sodio tribásico deshidratado (0.3M), se ajustó pH 7 y se aforo a 400mL) (5x SSC concentración final), 3mL 100x de solución de Denhardt (1x concentración final), 0.150g (500 μg/mL yeast tRNA concentración final), aforar con agua con DEPC hasta los 300mL). Luego se colocaron en la estufa a 37°C por 1 hora.

-Hibridación: Luego, se prepararon las sondas a utilizar, primero se desnaturalizaron a 90°C por 4 minutos. Posteriormente se procedió a preparar la mezcla de hibridación donde se agregó la cantidad necesaria de la sonda para llegar a las concentraciones deseadas y luego se aforo con el búfer de hibridación (descrito más arriba) hasta llegar al volumen deseado según la siguiente tabla. Se usaron las sondas de detención específica 5'-DIG- y 3'-DIG hsa-miR-512-3p (YD00612202®) y hsa-miR-515-5p (YD00612297®). La sonda de control LNA U6 snARN con etiqueta de 5'-DIG (5'-DIG/CACGAATTTGCGTGTCATCCTT/-3') se utilizó como control positivo y la sonda de control de miARN "scramble" LNA con etiqueta de 5'-DIG (YD00699004®) se utilizó como control negativo.

Tabla 4. Preparación de la mezcla de hibridación. Volúmenes de las sondas a utilizar, concentración y volumen final.

Sonda	Volumen que utilizar (μL)	Concentración final (nM)	Volumen final (μL)
Scramble-miR (control negativo)	1.6	40	1000
U6 snRNA (control positivo)	4	2	1000
hsa-miR-512-3p (miR-512-3p)	4.4	220	500
hsa-miR-515-5p (miR-515-5p)	4.4	220	500

Dentro de la misma cámara húmeda se agregó 100µL de la mezcla de hibridación a evaluar a cada lamina y se colocó sobre ella un cubreobjeto, evitando que se formaran burbujas. Luego se dejó dentro del RapidFISH (El horno de hibridación de láminas Boeckel Scientific RapidFISH) a 55°C durante 1 hora.

-Lavados: Una a una, se removieron gentilmente los cubreobjetos e inmediatamente se colocaron dentro de vasos que contenga SSC 5x (100mL SSC 20x, luego se aforó con agua con DEPC hasta 400mL). Luego, se colocaron las láminas dentro de vasos que contengan las siguientes soluciones en el orden específico, para mantener la rigurosidad del proceso se realizó este proceso en vasos que estaban en baño de maría a la temperatura de hibridación (55°C).

Tabla 5. Proceso de lavado de las láminas. Soluciones, tiempo y temperatura a las cuales se deben dejar las láminas

<i>Solución</i>	<i>Tiempo</i>	<i>Temperatura</i>
SSC 5x	5 minutos	55°C
SSC 1x	5 minutos	55°C
SSC 1x	5 minutos	55°C
SSC 0.2x	5 minutos	55°C
SSC 0.2x	5 minutos	55°C
SSC 0.2x	5 minutos	55°C

-Bloqueo: Antes de aplicar la solución de bloqueo se colocaron las láminas dentro de vasos que contenían PBS; una a una se aplicó sobre ellas una barrera hidrofóbica alrededor de las secciones de tejido utilizando un DakoPen. Consecuentemente se situaron nuevamente en una cámara húmeda, y se aplicó sobre ellas 400µL de la solución de bloqueo (5mL de PBS-T, 150µL suero de oveja (2% concentración final), 165µL BSA 30%) y se dejaron a temperatura ambiente durante 15 minutos.

-Anticuerpo (ANTI-DIG): Se removió la solución de bloqueo y se aplicó sobre las láminas, dentro de la membrana hidrofóbica, 400µL de la solución del reactivo anti-DIG (anti-DIG 1:800 en la solución de 2.5mL PBS, 165µL BSA 30%, 2.5mL PBS-T con suero de oveja 2%) y se dejó tapada incubando durante 1 hora. Luego se lavaron las láminas con PBS-T durante 3 minutos en triplicado.

-Reacción AP: Se aplicó la solución de sustrato AP (Inmediatamente antes del uso, se disolvió una tableta de NTB-BCIP (nitro azul de tetrazolio - 5-bromo-4-cloro-3-indolil fosfato) en agua ultrapura y se agregó 62.5µL de levamisol (concentración final 2.5mM)) a las secciones dentro de la membrana hidrofóbica.

Se dejaron incubando por 2 horas a 30°C dentro del RapidFISH. protegiéndose de la luz durante este proceso.

-Incubación KTBT: Se incubaron las láminas en el búfer KTBT (tampón de potasio-tris con tritón) (25mL Tris-HCl (50mM), 4.383g NaCl (150mM), 0.373g KCl (10mM), se aforo con agua con DEPC hasta un volumen de 500mL)2 veces por 5 minutos cada una para detener la reacción de la fosfatasa alcalina.

-Contrastado nuclear (Nuclear Fast Red): Se aplicó 300µL de Nuclear Fast Red (contrastante nuclear) a las láminas dentro de la membrana hidrofóbica durante 1 minuto. Luego se dejaron en una rejilla debajo de agua corriendo por 10 minutos.

-Deshidratación: Se deshidrataron las láminas en etanol de acuerdo con los pasos que se exponen en la siguiente tabla:

Tabla 6. Proceso de deshidratación de las láminas después del contraste nuclear. Concentración de etanol y tiempo de duración en que estuvieron sometidas las láminas.

<i>Solución</i>	<i>Tiempo</i>
Etanol 70% I	Sumergir 10 veces
Etanol 70% II	1 minuto
Etanol 96 % I	Sumergir 10 veces
Etanol 96 % II	1 minuto
Etanol 100% I	Sumergir 10 veces
Etanol 100% II	1 minuto

-Montaje: Se colocaron las láminas dentro de vasos que contuvieron Xilol. Luego se aplicó sobre el cubreobjeto una o dos gotas de Entellán (medio de montaje), con la ayuda una varilla de metal. Posteriormente se colocó cuidadosamente el cubreobjeto (con el Entellán) sobre el portaobjeto, evitando que se formen burbujas, y se dejó sobre papel absorbente en la plancha durante la noche.

5.7. Visualización de los resultados de la HISC

Una vez secas las láminas se observaron a través del microscopio óptico asociado a una cámara y se tomaron fotografías de las láminas a un aumento de 40X.

5.8. Cuantificación de la expresión de los miARNs obtenidos de la HISC mediante el programa FIJI

Las imágenes obtenidas de la HISC fueron cargadas en el software FIJI[®] v.2.6.0 (Schindelin et al., 2012) para su análisis. La intensidad de la tinción (azul) se extrajo de las imágenes con un algoritmo de desconvolución de color, integrado en el software FIJI[®]. Después de la conversión de los valores de luminosidad de píxeles a una escala de densidad óptica, la densidad óptica integrada se midió en las imágenes de tinción positiva previamente extraídas y se normalizó por el área positiva en cada

microfotografía. La intensidad de la señal se calculó como $I=10 \cdot \Sigma OD/A$ en dB/ μm^2 , siendo ΣOD la densidad óptica integrada, y A el área de tinción positiva (μm^2).

5.9. Bioseguridad

El laboratorio se encuentra ubicado en el Instituto de Ciencias Biomédicas en la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile y cuenta con los requerimientos básicos de Bioseguridad, certificado por la "Unidad de Prevención de Riesgos y Bioseguridad de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile"

5.10 Ética

Este estudio cuenta con la aprobación del Comité de Ética del Servicio de Salud Metropolitano Norte. Además, se entregó un consentimiento informado acerca del uso experimental de la placenta a cada paciente según lo estipulado por el Comité de Ética Humana de la Facultad de Medicina, Universidad de Chile (AE N°010/2019)

6. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Cada experimento fue realizado en triplicado y en tres oportunidades distintas. Los resultados se expresaron como promedio más desviación o error estándar según corresponda. La significancia de las variables cuantitativas se evaluó mediante el Test de Student.

Las variables múltiples se analizaron mediante ANOVA de una vía seguido por el post test de Dunnett's.

Adicionalmente, se utilizó el programa computacional GraphPad Software PRISM 8.0 (GraphPad Software, San Diego, EE. UU.) para la elaboración de los gráficos. Se consideró un $p \leq 0,05$ como estadísticamente significativo. Siempre que fue posible, se proporcionaron valores exactos de p.

7. RESULTADOS

Los niveles de expresión del ADN parasitario aumentan significativamente en diferentes tiempos de incubación en presencia de tripomastigotes de T. cruzi en EPH

Se infectaron los EPH con tripomastigotes de *T. cruzi* a una concentración de 10^5 parásitos/mL con diferentes tiempos de infección 2, 24 y 48 horas. Se observó que en presencia del parásito a diferentes tiempos aumenta la carga del ADN parasitario: 24 horas ($172.6\% \pm 7\%$) ($p \leq 0,001$), 48 horas ($188.5\% \pm 42\%$) ($p \leq 0,001$). Tomando como control el tiempo de infección de 2 horas (**Figura 7**).

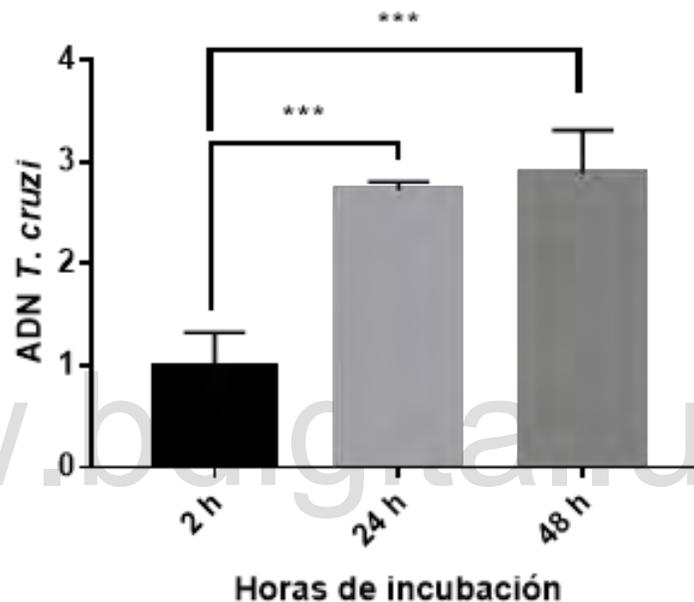


Figura 7. Expresión diferencial del ADN parasitario de *T. cruzi* durante la infección *ex vivo* de EPH durante diferentes tiempos de infección. La presencia del ADN fue determinada mediante RT-qPCR. Todos los valores se expresan como la media \pm SD, los niveles de expresión los datos se normalizaron en función de los valores del control y se analizaron mediante ANOVA de una vía y post-test de Dunnett. *** $p \leq 0.001$.

*La infección con T. cruzi aumenta los niveles de expresión del miR-512-3p durante la infección *ex vivo* en EPH*

Los EPH se co-cultivaron en presencia y ausencia de tripomastigotes de *T. cruzi* a una concentración de 10^5 parásitos/mL durante 2 horas. Se observó que la infección de *T. cruzi* aumenta significativamente los niveles de miR-512-3p ($37,9\% \pm 5\%$) ($p \leq 0,001$) respecto a las muestras controles sin infectar (**Figura 8**).

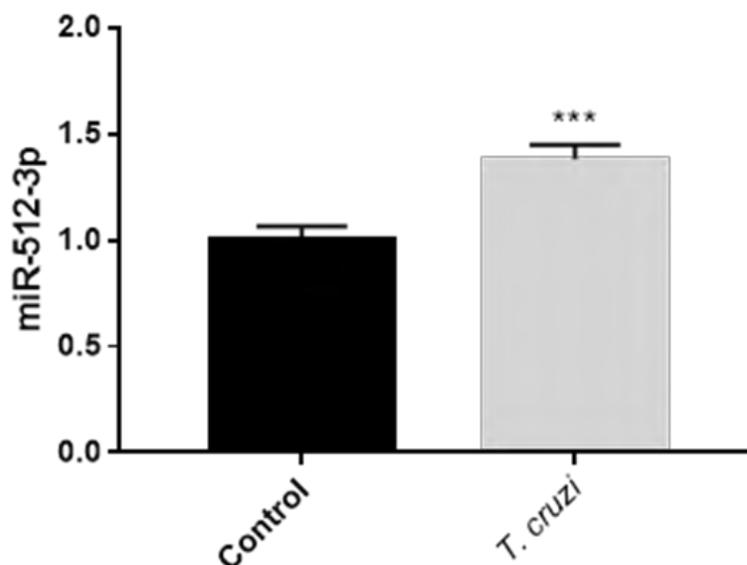


Figura 8. Expresión diferencial de miR-512-3p durante infección *ex vivo* de EPH. EPH fueron infectados con tripomastigotes de *T. cruzi* (10^5 parásitos/mL) durante 2 horas. La presencia del miARN fue determinada por RT-qPCR. Los datos representan el promedio \pm SD analizada por la prueba de t-Student de dos colas. *** $p \leq 0.001$.

La infección con T. cruzi disminuye los niveles de expresión del miR-515-5p durante la infección ex vivo en EPH

Los EPH se co-cultivaron en presencia y ausencia de tripomastigotes de *T. cruzi* a una concentración de 10^5 parásitos/mL durante 2 horas. Se observó que la infección de *T. cruzi* disminuye significativamente los niveles de miR-515-5p ($41,8\% \pm 17\%$) ($p \leq 0,05$) respecto a las muestras controles sin infectar (**Figura 9**).

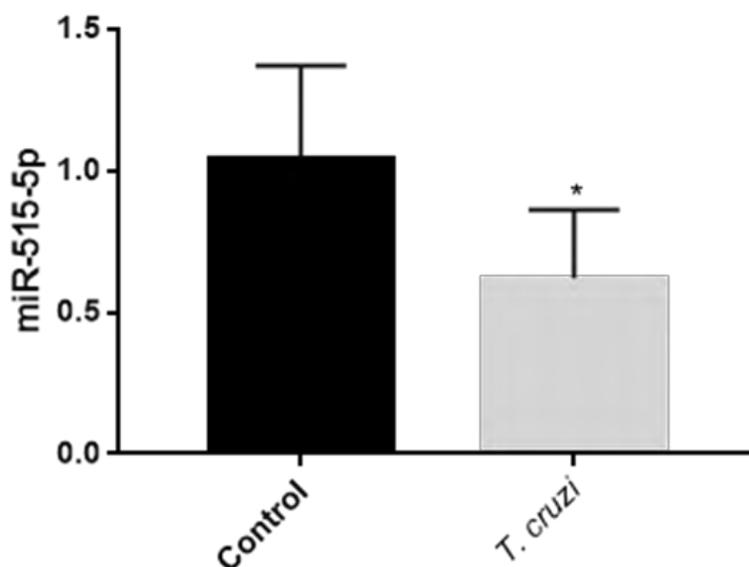


Figura 9. Expresión diferencial de miR-515-5p durante infección *ex vivo* de EPH. EPH fueron infectados con tripomastigotes de *T. cruzi* (10^5 parásitos/mL) durante 2 horas. La presencia del miARN fue determinada por RT-qPCR. Los datos representan el promedio \pm SD analizada por la prueba de t-Student de dos colas. * $p \leq 0.05$

La localización de los microARNs miR-512-3p y miR-515-5p en EPH es en el trofoblasto

El aumento y disminución de la expresión del miR-512-3p y del miR-515-5p se corroboró mediante hibridación *in situ* cromogénica donde se evidencia: una mayor intensidad de color en la sonda del miR-512-3p y una menor intensidad de color en la sonda del miR-515-5p en las muestras incubadas en presencia del parásito. Adicionalmente, se observó los miARNs estudiados se localizan preferentemente en el trofoblasto que recubre las vellosidades coriónicas (Flechas de color rojo) (**Figura 10**).

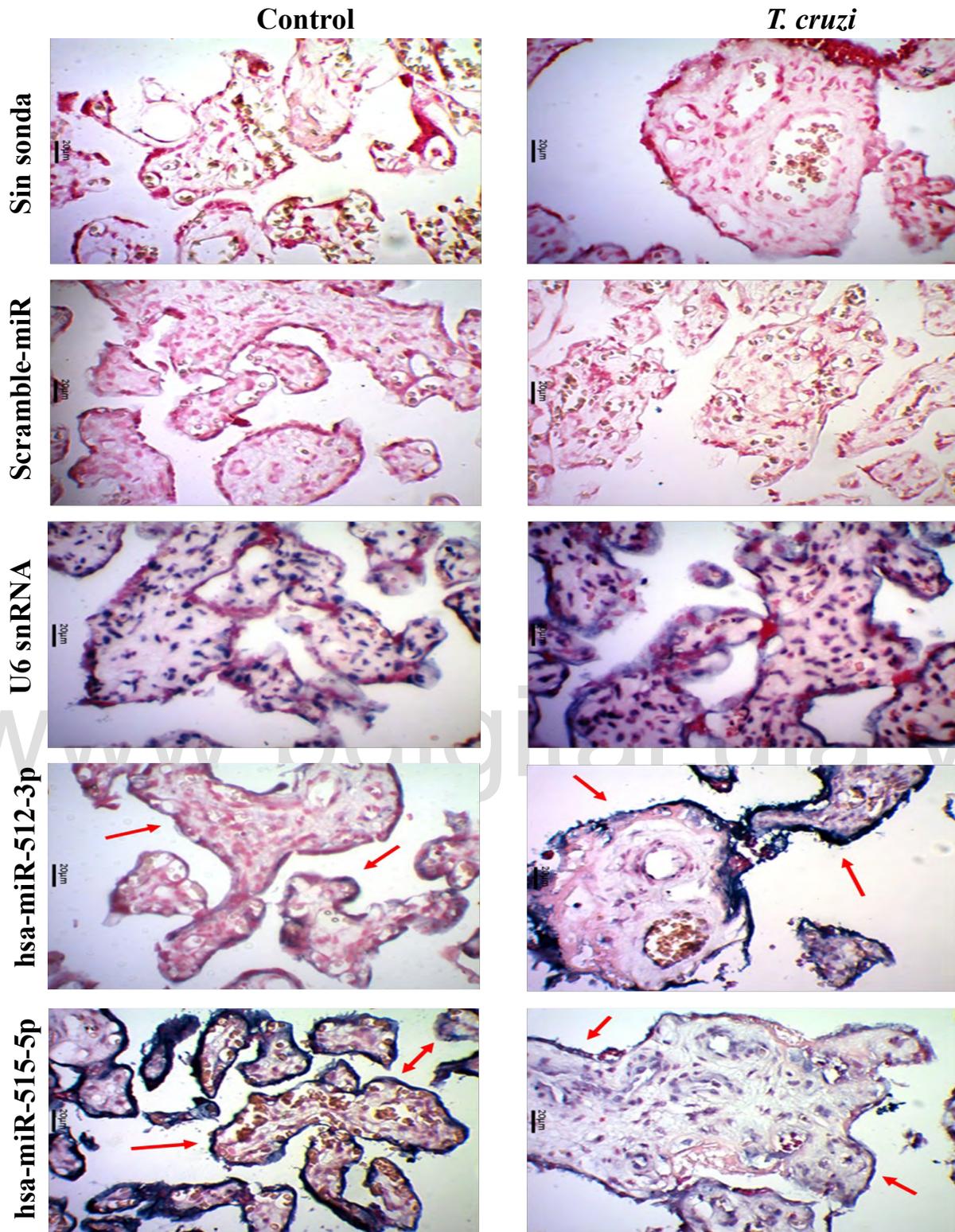


Figura 10. Expresión diferencial de los miARNs miR-512-3p y miR-515-5p durante infección *ex vivo* de EPH. Los EPH se incubaron en presencia o ausencia de tripomastigotes de *T. cruzi* (10^5 parásitos/mL) durante 2 horas. Las muestras se procesaron con técnicas histológicas de rutina. Se muestran imágenes representativas de la hibridación *in situ* cromogénica, Scramble-miR y U6 snRNA son los controles negativos y positivos, respectivamente; hsa-miR-512-3p corresponde a la sonda específica para el miARN miR-512-3p y hsa-miR-515-5p corresponde a las sondas específicas del miR-515-5p. Los tejidos se contrastaron tiñendo el núcleo con Cellular Nuclear Fast Red. Barra de aumento 20 μ m.

La infección con T. cruzi aumenta los niveles de expresión del miR-512-3p durante la infección ex vivo en el trofoblasto en EPH

A partir de las imágenes obtenidas de la HISC se realizó un análisis de la intensidad de tinción de la sonda, siendo esta proporcional a la expresión del miARN a estudiar. Se observó que la infección de *T. cruzi* aumenta significativamente los niveles de miR-512-3p ($98\% \pm 15\%$) ($p \leq 0,01$) en el trofoblasto con respecto a las muestras controles sin infectar (**Figura 11**).

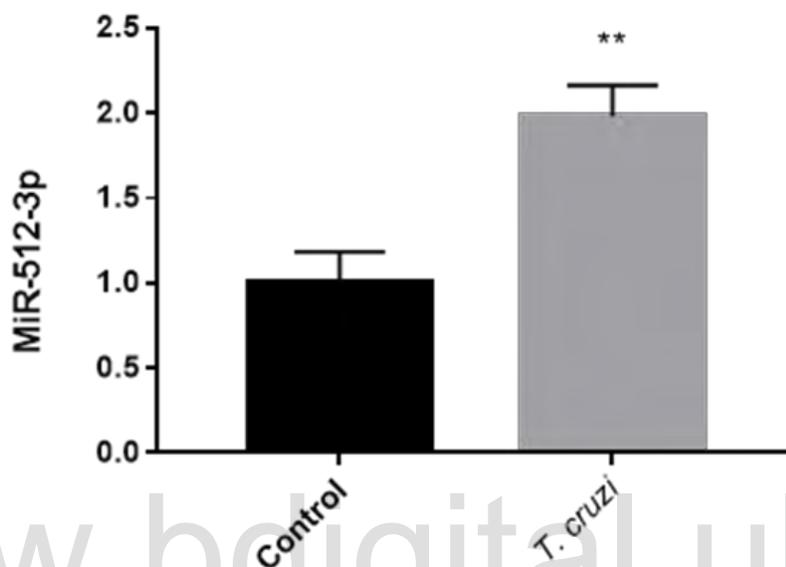


Figura 11. Expresión diferencial de miR-512-3p en el trofoblasto durante infección *ex vivo* de EPH. EPH fueron infectados con tripomastigotes de *T. cruzi* (10^5 parásitos/mL) durante 2 horas. La presencia del miARN fue determinada por HISC. Los datos representan el promedio \pm SD analizada por la prueba de t-Student de dos colas. ** $p \leq 0.01$.

La infección con T. cruzi disminuye los niveles de expresión del miR-515-5p durante la infección ex vivo en el trofoblasto en EPH

A partir de las imágenes obtenidas de la HISC se realizó un análisis de la intensidad de tinción de la sonda, siendo esta proporcional a la expresión del miARN a estudiar. Se observó que la infección *T. cruzi* disminuye significativamente los niveles de miR-515-5p ($41.5\% \pm 5\%$) ($p \leq 0,01$) en el trofoblasto con respecto a las muestras controles sin infectar (**Figura 12**).

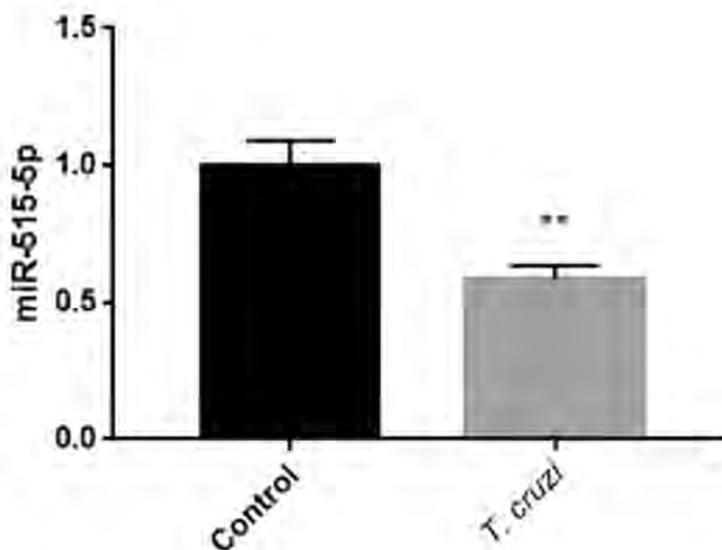


Figura 12. Expresión diferencial de miR-512-3p en el trofoblasto durante infección *ex vivo* de EPH. Los EPH fueron infectados con tripomastigotes de *T. cruzi* (105 parásitos/mL) durante 2 horas. La presencia del miARN fue determinada por HISC. Los datos representan el promedio \pm SD analizada por la prueba de t-Student de dos colas. ** $p \leq 0.01$

8. DISCUSIÓN

La transmisión congénita de la EC se considera exitosa cuando el parásito *T. cruzi* llega al feto, para ello es necesario que atraviese la barrera placentaria (Duaso et al., 2010; Kemmerling et al., 2019). La barrera placentaria es el primer tejido que está en contacto con la sangre materna en la cual circula el parásito es el trofoblasto (Duaso et al., 2012; Kemmerling et al., 2010). La compleja interacción entre factores parasitarios y los del hospedero determinan el éxito o fracaso de la infección (Zheng et al., 2013).

Previamente se ha demostrado que *T. cruzi* produce alteraciones tisulares ocasionadas por sus enzimas proteolíticas durante el proceso de invasión e infección de la placenta (Duaso et al., 2010). Cuando ocurre una lesión, la injuria estimula en la placenta su sistema de defensa a través de la secreción de interleucinas, la activación tanto de receptores tipo Toll (Castillo, Medina, et al., 2017), como de las vías de señalización de NF κ B (Liempi et al., 2019) y por último, por medio de la modulación en la expresión de miARNs placentarios (Medina et al., 2020).

A lo largo de la década pasada los ARNs no codificantes (ncARNs), incluyendo los microARNs se han convertido en un tema tendencia de investigación científica (Paulsen et al., 2021). Los microARN regulan más del 60% de la expresión de genes fundamentales, y están involucrados en procesos biológicos donde se incluye la diferenciación celular y la respuesta inmunitaria, que son procesos determinantes para el éxito o fallo de una infección (Medina et al., 2020; Paul et al., 2020; Zheng et al., 2013).

Los miARN representan un novedoso biomarcador de diagnóstico debido a su mayor estabilidad en comparación con los ARN, puesto que permanecen estables después de ser sometidos a condiciones extremas que normalmente degradarían la mayoría de los ARN, como ebullición, niveles de pH muy bajos o altos, almacenamiento prolongado y ciclos de congelación y descongelación. Incluso en una expresión abundante baja, el miARN puede amplificarse y detectarse en un entorno clínico mediante PCR cuantitativa (qPCR) en tiempo real, un enfoque utilizado en pruebas clínicas aprobadas por la Administración de Alimentos y Medicamentos (Giza et al., 2014).

Existen diferentes metodologías que se usan para la detección de microARNs en muestras de tejido, entre las que se encuentran Microarray y secuenciación, RT-qPCR cuantitativo, Northern Blot, entre otros; sin embargo, estos métodos solo revelan el perfil de expresión del microARN de toda la muestra y no donde o en que células actúan los microARNs detectados (Paulsen et al., 2021). Precisamente es lo que se observa en los resultados obtenidos a través de la técnica de RT-qPCR donde se asocia a los niveles de expresión de los miARNs evaluados solo a nivel de tejido de los EPH (**Figura 8 y 9**).

La hibridación “*in situ*” (HIS) es una técnica utilizada para la localización y detección de secuencias específicas tanto de ADN o de ARN en células, a partir de FFPE (Jensen, 2014), una de las peculiaridades y preferencias para elegir esta técnica es que precisamente permite localizar y visualizar los productos dentro de las células preservando la integridad celular (Chu et al., 2019). Una de las variantes de la HIS es la hibridación *in situ* cromogénica (HISC), esta técnica utiliza una sonda marcada con digoxigenina (en este caso) que es reconocida por un anticuerpo anti-digoxigenina (anti-DIG) que contuvo a su vez la molécula de fosfatasa alcalina. Una vez se hibridó la sonda con la secuencia de miARN a localizar y unido a su vez el anticuerpo a la digoxigenina al añadir NBT/BCIP, la reacción de la fosfatasa alcalina con el NBT/BCIP da como resultado la formación de un precipitado azul que permite observar el lugar de localización de la sonda a evaluar (Dai & Cai, 2018; Nizyaeva et al., 2017)

Sin embargo, existen diferentes dificultades cuando se trabaja con microARN e HIS. Condiciones de fijación de formalina, tales como la concentración, el tiempo o la temperatura, influyen en la detección exitosa de microARN. Además, las condiciones para la permeabilización difieren entre tejidos; por lo tanto, algunos tejidos experimentan una fuerte permeabilización debido a la menor accesibilidad de unión de la sonda al microARN. Por ejemplo, el microARN objetivo en los linfocitos requiere un enfoque de pretratamiento más suave en comparación con la detección del microARN objetivo en el epitelio escamoso. Además, el grosor de las secciones de FFPE es un parámetro importante a la hora de elegir un método de recuperación de microARN suficiente y, por lo general, se requieren regímenes de pretratamiento más suaves cuando se aplican en secciones delgadas (QUIAGEN®, 2019). En el

protocolo estandarizado se demuestra que el proceso puede ser fácilmente realizado manualmente en tejido placentario. Con respecto a los valores estandarizados: existe un amplio espectro de acuerdo al espesor de la sección del corte de los tejidos fijados en formalina e incluidos en parafina (FFPE), los cuales varían desde los 4µm hasta los 40µm de espesor, sin embargo de acuerdo a la bibliografía no se ha considerado relevante estandarizar un espesor fijo en el corte de los tacos de parafina cuando se trabaja con miARNs (Nuovo et al., 2010; Planell-saguer et al., 2010; Renwick et al., 2013). No obstante, de acuerdo con el proceso de estandarización evaluado se encontró más óptimo el uso de secciones con un grosor de 5µm puesto que con secciones más finas se perdía tejido a lo largo de la técnica HISC. Con respecto a la permeabilización se han demostrado el uso de la proteinasa K, de hecho, y como se mencionó anteriormente para la elección de la concentración, el tiempo de incubación y de una posible temperatura de incubación es necesario tomar en cuenta el tejido a evaluar (Chaudhuri et al., 2013; Lei et al., 2018; Pena et al., 2009) y el tiempo de inclusión que lleve el tejido, resultando que al tratarse de tejidos procesados en a lo máximo una semana después de su inclusión, el tratamiento no requiere una alta concentración de proteinasa K ni tanto tiempo de incubación realizándose a temperatura ambiente; por otro lado, se han descrito otras opciones de tratamiento de permeabilización que podrían ser interesantes de evaluar cuando se lleva a cabo la HISC para los microARNs evaluados (miR-512-3p y miR-515-5p).

El examen de FFPE es la piedra angular para el diagnóstico histológico y de patología molecular. A su vez, combinado con el diagnóstico basado en miARNs, se está convirtiendo rápidamente en un área prometedora del tratamiento clínico, por ejemplo, en el cáncer. Se han aplicado varias metodologías para detectar miARN en muestras FFPE. Sin embargo, un ensayo de HIS tiene la característica única de determinar los compartimentos celulares de expresión alterada de miARN que, como se muestra, es fundamental para interpretar con precisión la importancia clínica de los cambios de expresión de los miARN (Sempere et al., 2010). El uso de HISC para la detección de miARNs, en este caso de los miR-512-3p y miR-515-5p puede abrir un campo para utilizarlos como potenciales herramientas diagnósticas y de pronóstico prometedoras, así como blancos terapéuticos en la EC.

Como se mencionó anteriormente el principal factor que determina el éxito de la infección es la interacción entre el hospedador y el parásito. La interacción parásito-hospedador incluye la evasión del parásito de las barreras primarias de defensa (como la barrera placentaria), la evasión de las defensas del hospedador, la replicación del parásito en el hospedador y la capacidad inmunológica del hospedador de controlar o eliminar el parásito (Sen et al., 2016). La posibilidad de infección por *T. cruzi* depende además de varios factores entre los cuales están: factores propios del parásito, del sistema inmunitario tanto materno como fetal en desarrollo y de la placenta (Castillo, Medina, et al., 2017; Duaso et al., 2010;

Fretes & Kemmerling, 2012; Kemmerling et al., 2019; Liempi et al., 2016; Medina et al., 2020, 2022; Sturm et al., 2003). Entre los factores del parásito se pueden encontrar cambios ya sea en la cepa, DTU, factor de virulencia, entre otros. De hecho, se ha propuesto que los diferentes genotipos de *T. cruzi* y su asociada patogenicidad, virulencia y tropismo del tejido puede jugar un papel importante en la transmisión congénita (Juiz et al., 2016), como es el caso entre la cepa VD y la cepa Y, DTU IV y II respectivamente donde se demostró que la cepa VD es más infectiva que la cepa Y (Medina et al., 2018). Sin embargo, no se han encontrado relación entre la distribución de los casos de transmisión congénita y las respectivas poblaciones del parásito. Lo que lleva a pensar que la posibilidad de la transmisión congénita va más allá de la genética del parásito e involucra otros factores. Con respecto a la respuesta inmunitaria, esta inicia por la activación de los receptores de patrones de patógenos (PRRs) como los receptores tipo Toll (TLRs); cada TLR reconoce diferentes estructuras químicas, que están muy conservadas en los microorganismos y se denominan colectivamente patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP). Entre estos se encuentran los lípidos, carbohidratos, ácidos nucleicos y diversas proteínas derivadas de bacterias, virus, hongos, protozoos y parásitos helmintos. Además, las vías de señalización de TLR también pueden ser activadas por componentes propios liberados por el daño o la inflamación del tejido, los llamados patrones moleculares asociados al daño (DAMP), que alertan al sistema inmunitario del peligro que resulta de una agresión estéril o de una infección (Rodrigues et al., 2012). En placenta, más aún, en el trofoblasto se expresan diez de los TLRs conocidos funcionales, y se ha demostrado que *T. cruzi* activa a varios TLRs como como TLR2, TLR4 (receptores de superficie) que reconocen el glicosilfosfatidilinositol (GPI)-anclado a glicoproteínas similares a la mucina de la superficie de *T. cruzi* (Castillo, Medina, et al., 2017; Liempi et al., 2014), y los TLRs TLR-7 y TLR-9 que reconocen el material genético del parasito

La modulación de la expresión génica del hospedador es parte de la estrategia de invasión de los patógenos como de la respuesta del hospedador (Zheng et al., 2013). Se ha descrito que *T. cruzi* induce un perfil específico de miARN en explantes, muy diferente de otros parásitos protozoarios como *Toxoplasma gondii* (*T. gondii*) lo cual podría explicar la baja incidencia en transmisión congénita para *T. cruzi* y la alta tasa de transmisión para *T. gondii* (Liempi et al., 2020). Sin embargo, y como se mencionó anteriormente a pesar de que el parasito pueda alterar la expresión de los microARNs hay que considerar los factores externos tanto maternos, fetales como de la placenta y el entorno, para determinar un éxito de la infección. Durante el embarazo la expresión de los miARNs en la placenta puede regular múltiples factores incluyendo hormonas, oxígeno, factores inflamatorios, entre otros. Recientemente, los miARNs han sido destacados como reguladores claves capaces de influir en varios procesos celulares que incluyen diferenciación, proliferación, apoptosis, desarrollo, así como angiogénesis y funciones de

células endoteliales, los cuales están asociados con la aparición y manifestación de preeclampsia. Reportando que existe una alteración de varios miARNs circulantes en pacientes con preeclampsia con respecto a pacientes control a principios y mediados de la gestación, entre los que se encuentran los miR-512-3p y el miR-515-5p (Hromadnikova et al., 2015; Liu et al., 2018). Además, la alteración de la expresión de miARNs se ha relacionado con múltiples enfermedades patológicas como el cáncer de mama y de cuello uterino (Dai & Cai, 2018).

Los resultados de la HISC realizada muestran que los microARNs miR-512-3p y miR-515-5p en explantes de placentas de embarazos normales están localizados mayormente en las células del trofoblasto (**Figura 10**). Estos resultados son concordantes con investigaciones simultáneas que se realizaron en el laboratorio que vinculan el rol de estos microARNs con el recambio epitelial del trofoblasto en EPH durante la infección de *T. cruzi* (Medina et al., 2022). Particularmente estos miARNs regulan la diferenciación del trofoblasto (Chen et al., 2010; Zhang et al., 2016), un proceso celular relacionado con recambio epitelial del trofoblasto, considerado un mecanismo local de defensa placentaria contra *T. cruzi* (Carlier, 2020; Carrillo et al., 2016; Kemmerling et al., 2019; Liempi et al., 2014, 2016). El recambio epitelial se considera parte de la inmunidad innata, ya que los patógenos, antes de la invasión celular, deben adherirse a la superficie de las células. Como estas células se eliminan continuamente, los patógenos adheridos se eliminan (S. Chang et al., 2013; Liempi et al., 2014). Es más, las células epiteliales infectadas tienen un sistema de alarma para alertar a las células vecinas no infectadas por transferencia de señales de peligro a través de la unión gap, lo que permite que el epitelio se deshaga de células huésped infectadas (S. Chang et al., 2013; Kasper et al., 2010). Las señales de peligro se propagan a través del factor nuclear kappa B (NFκB) y señalización de proteína quinasa activadora de mitógenos (MAPK), vías que activan *T. cruzi* en EPH (Castillo, Villarroel, et al., 2013; Liempi et al., 2019).

Cuando se evaluó la expresión de los microARNs miR-512-3p y miR-515-5p en el trofoblasto se observó que la expresión del miR-512-3p aumenta y la del miR-515-5p disminuye en el trofoblasto (**Figura 11 y 12**) esto se puede observar en la intensidad de color azul/morado en las imágenes con la sonda con respecto al control. Cuantitativamente los resultados arrojaron que los niveles del miR-512-3p aumentaron $98\% \pm 15\%$ (**Figura 11**) y que los niveles de expresión del miR-515-5p disminuyeron $41.5\% \pm 5\%$ (**Figura 12**) en el trofoblasto. Resultados que son compatibles con los resultados a nivel de explante obtenidos a través de la técnica de RT-qPCR (**Figura 8 y 9**) donde también se ve esta tendencia de aumento del $37,9\% \pm 5\%$ en los niveles del miR-512-3p y disminución del $41,8\% \pm 17\%$ de los niveles del miR-515-5p, solo que como se mencionó anteriormente esta última técnica solo nos expresa los niveles de expresión a nivel de explante.

El miR-512-3p regula la diferenciación del trofoblasto reprimiendo al inhibidor de la caspasa 8 c-FLIP, lo que tiene como consecuencia un incremento de la actividad de la caspasa 8 (Chen et al., 2010). Caspasa 8 regula la diferenciación del trofoblasto y muerte celular apoptótica y es activado por *T. cruzi* (Medina et al., 2022). El mecanismo de acción de la caspasa 8 actúa como iniciador. La activación inicial de la caspasa-8 tiene lugar en células del CT justo antes de que ocurra la fusión entre el CT y el ST; se mantiene activa durante un corto tiempo y luego se inactiva (Huppertz & Gauster, 2011). Una de las funciones asociadas a la caspasa-8 es la escisión de las proteínas del citoesqueleto, como la alfa-fodrina (Gauster et al., 2009). Por otra parte y como se mencionó anteriormente, la activación de la caspasa-8 media la traslocación de la FS desde la cara interna a la cara externa de la membrana plasmática. La FS es el fosfolípido más abundante en la membrana plasmática que, en circunstancias normales, predomina en la cara interna de la célula (Daleke, 2007) y su exposición hacia la cara externa de la membrana plasmática no sólo se asocia al proceso de muerte celular tipo apoptosis sino también a la fusión celular (Gauster et al., 2009), proceso que está ocurriendo durante el recambio epitelial entre las células del CT y ST mediante remodelación del citoesqueleto por parte de caspasas (inicialmente caspasa-8, luego caspasas efectoras 3, 6 ó 7) junto con la expresión de proteínas fusogénicas, lo que causan la formación de un poro de fusión entre el CT y el ST suprayacente. A partir de esto, los componentes celulares del CT como el núcleo, organelos y las proteínas citoplasmáticas, son incorporadas al ST. La caspasa-8 activa también es modulada por c-FLIP (proteína inhibidora de FLICE). Este inhibidor está presente en dos variantes y actúa directamente sobre la caspasa-8, induciendo la activación o inhibición de esta (D. W. Chang et al., 2002). Esto explica que en el ST la caspasa-8 disminuye su actividad después de la fusión sincicial por acción de Bcl-2 (Linfoma de células B) y c-FLIP.

Por otro lado, el miR-515-5p, se relaciona con la regulación de la diferenciación del trofoblasto (Chen et al., 2010; Zhang et al., 2016). Así, la expresión de miR-515-5p se inhibe durante la diferenciación del trofoblasto lo cual promueve que su gen diana hGCM-1 aumente su expresión, este gen induce la expresión de la Sincitina 1 la cual a su vez induce los eventos de fusión y la expresión del factor de crecimiento placentario (Zhang et al., 2016). Por lo que durante la infección de *T. cruzi*, al inhibir la expresión de este gen se estaría promoviendo la diferenciación celular del trofoblasto.

El ó los mecanismos por el cual *T. cruzi* es capaz de infectar al feto no están dilucidados, tampoco se sabe como el parásito es capaz de inducir e inhibir los cambios en los niveles de expresión de los miR-512-3p y miR-515-5p respectivamente, o si estos están determinados por factores de virulencia de *T. cruzi* o son respuestas innatas del sistema inmunitario. Entre las propuestas que se pueden presentar en este trabajo que traten de explicar el cómo *T. cruzi* induce e inhibe los cambios de los niveles de expresión de estos microARNs están:

1) Como se explicó anteriormente se ha demostrado que *T. cruzi* es capaz de activar los PRRs, en específico los TLR como TLR2, TLR4 (receptores de superficie) (Castillo, Medina, et al., 2017; Liempi et al., 2014), y los TLRs TLR-7 y TLR-9. El NFκB se encuentra en el citoplasma en forma inactiva unido a proteínas inhibitoras, las cuales después de un estímulo adecuado son fosforiladas, ubiquitinizadas y degradadas por el proteosoma, permitiendo así la liberación de NFκB que se transloca al núcleo donde regula la transcripción de varios genes dentro de los cuales se pueden encontrar los microARNs de interés en este proyecto (miR-512-3p y miR-515-5p).

2) Del mismo modo se ha reportado que la vía NFκB no solo está involucrada en la regulación de microARNs sino también de clúster de microARNs, dentro de los cuales puede encontrarse el C19.

3) Por último, se ha descrito un mecanismo de regulación para *Leishmania major* en donde se involucra una proteína presente en su superficie células, GP63; esta proteína es capaz de escindir a DICER por lo que se estaría inhibiendo la vía canónica de síntesis de microARNs al no poder sintetizar los pre-microARNs. Además, se ha demostrado además que la proliferación, la expresión del receptor y el IFN-γ liberado por las células “Natural killer” (NK) se ven afectados por la proteína GP63 de *L. major*, lo que podría tener un impacto importante al inhibir la respuesta inmune Th1, crucial para controlar la infección del parásito (Lieke et al., 2008). A pesar de la proteína GP63 se ha demostrado que no se encuentra en la superficie de la membrana de *T. cruzi*, se ha reportado que dentro de las vesículas extracelulares como exosomas expulsados por el parásito.

Mediante el aporte de esta investigación y futuras investigaciones acerca del tema se espera poder usar las alteraciones en los niveles de expresión de los miARNs miR-512-3p y miR-515-5p como biomarcadores para la posibilidad de infección de *T. cruzi* por medio de la transmisión congénita.

9. CONCLUSIÓN

La infección con *T. cruzi* induce un cambio en la expresión de los niveles de los miARNs aumentando en un $98\% \pm 15\%$ el miR-512-3p y disminuyendo en un $41.5\% \pm 5\%$ miR-515-5p en el trofoblasto. Sin embargo, aún no se ha determinado el mecanismo que regula este fenómeno, o si existe alguna relación entre la respuesta inmunitaria ante patógenos y el aumento de los microARNs evaluados que no vincule la inducción e inhibición de los niveles de microARNs por parte del parásito.

10. BIBLIOGRAFÍA

- Altcheh, J., Corral, R., Biancardi, M. A., & Freilij, H. (2003). Anticuerpos anti-F2/3 como marcador de curacion en niños con infeccion congenita por Trypanosoma cruzi. *Medicina*, 63(1), 37–40.
- Altuvia, Y., Landgraf, P., Lithwick, G., Elefant, N., Pfeffer, S., Aravin, A., Brownstein, M. J., Tuschl, T., & Margalit, H. (2005). Clustering and conservation patterns of human microRNAs. *Nucleic*

Acids Research, 33(8), 2697–2706. <https://doi.org/10.1093/nar/gki567>

- Álvarez, M. G., Vigliano, C., Lococo, B., Bertocchi, G., & Viotti, R. (2017). Acta Tropica Prevention of congenital Chagas disease by Benznidazole treatment in reproductive-age women . An observational study. *Acta Tropica*, 174(September 2016), 149–152. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2017.07.004>
- Amato Neto, V., Setsu, E., de Souza, R., & Pinto Dias, J. (2000). Outras formas de transmissão do *Trypanosoma cruzi*. *Rev. Pat Top*, 29, 115–129.
- Ambros, V. (2004). The functions of animal microRNAs. *Nature*, 431(7006), 350–355. <https://doi.org/10.1038/nature02871>
- Androvic, P., Valihrach, L., Elling, J., Sjoback, R., & Kubista, M. (2017). Two-tailed RT-qPCR: A novel method for highly accurate miRNA quantification. *Nucleic Acids Research*, 45(15). <https://doi.org/10.1093/nar/gkx588>
- Anthiya, S., Griveau, A., Loussouarn, C., Baril, P., Issartel, J., Garcion, E., Anthiya, S., Griveau, A., Loussouarn, C., Baril, P., & Garnett, M. (2018). *MicroRNA-based Drugs for Brain Tumours To cite this version : HAL Id : inserm-01691531 MicroRNA-based Drugs for Brain Tumours*.
- Apicella, C., Ruano, C. S. M., Méhats, C., Miralles, F., & Vaiman, D. (2019). The role of epigenetics in placental development and the etiology of preeclampsia. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(11). <https://doi.org/10.3390/ijms20112837>
- Arora, N., Sadovsky, Y., Dermody, T. S., & Coyne, C. B. (2017). Microbial Vertical Transmission during Human Pregnancy. *Cell Host and Microbe*, 21(5), 561–567. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2017.04.007>
- Baczyk, D., Drewlo, S., Proctor, L., Dunk, C., Lye, S., & Kingdom, J. (2009). Glial cell missing-1 transcription factor is required for the differentiation of the human trophoblast. *Cell Death and Differentiation*, 16(5), 719–727. <https://doi.org/10.1038/cdd.2009.1>
- Bartel, D. (2004). MicroRNAs: Genomics, Biogenesis, Mechanism, and Function. *Cell*, 116, 281–297. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2017.04.001>
- Bartel, D. (2009). MicroRNAs: Target Recognition and Regulatory Functions. *Cell*, 136(2), 215–233. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.01.002>
- Bayer, A., Delorme-Axford, E., Sleighter, C., Frey, T. K., Trobaugh, D. W., Klimstra, W. B., Emert-Sedlak, L. A., Smithgall, T. E., Kinchington, P. R., Vadia, S., Seveau, S., Boyle, J. P., Coyne, C. B., & Sadovsky, Y. (2015). Human trophoblasts confer resistance to viruses implicated in perinatal infection. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 212(1), 71.e1-71.e8. <https://doi.org/10.1016/j.ajog.2014.07.060>

- Benirschke, K. (2012). *Patology of de Human Placenta* (6 ed). Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
<https://doi.org/doi:10.1007/978-3-642-23941-0>
- Bern, C., Messenger, L. A., Whitman, J. D., & Maguire, J. H. (2019). Chagas disease in the united states: A public health approach. *Clinical Microbiology Reviews*, 33(1), 1–42.
<https://doi.org/10.1128/CMR.00023-19>
- Bidarimath, M., Khalaj, K., Wessels, J. M., & Tayade, C. (2014). MicroRNAs, immune cells and pregnancy. *Cellular and Molecular Immunology*, 11(6), 538–547.
<https://doi.org/10.1038/cmi.2014.45>
- Bortolin-Cavaille, M. L., Dance, M., Weber, M., & Cavaille, J. (2009). C19MC microRNAs are processed from introns of large Pol-II, non-protein-coding transcripts. *Nucleic Acids Research*, 37(10), 3464–3473. <https://doi.org/10.1093/nar/gkp205>
- Bounds, K. R., Chiasson, V. L., Pan, L. J., Gupta, S., & Chatterjee, P. (2017). MicroRNAs: New Players in the Pathobiology of Preeclampsia. *Frontiers in Cardiovascular Medicine*, 4(September).
<https://doi.org/10.3389/fcvm.2017.00060>
- Buekens, P., Almendares, O., Carlier, Y., Dumonteil, E., Eberhard, M., Gamboa-Leon, R., James, M., Padilla, N., Wesson, D., & Xiong, X. (2008). Mother-to-child transmission of chagas' disease in North America: Why don't we do more? *Maternal and Child Health Journal*, 12(3), 283–286.
<https://doi.org/10.1007/s10995-007-0246-8>
- Cardoso, A. V. N., Lescano, S. A. Z., Amato Neto, V., Gakiya, É., & Santos, S. V. (2006). Survival of Trypanosoma cruzi in sugar cane used to prepare juice. *Revista Do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo*, 48(5), 287–289. <https://doi.org/10.1590/s0036-46652006000500009>
- Carlier, Y. (2020). *Placenta , Trypanosoma cruzi , and Congenital Chagas Disease*.
- Carlier, Y., Sosa-Estani, S., Luquetti, A. O., & Buekens, P. (2015). Congenital Chagas disease: An update. *Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz*, 110(3), 363–368. <https://doi.org/10.1590/0074-02760140405>
- Carlier, Y., & Torrico, F. (2010). Congenital infection with Trypanosoma cruzi: From mechanisms of transmission to strategies for diagnosis and control (Am J Trop Med Hyg (2003) 81, 6, (927-933)). *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 82(3), 518.
<https://doi.org/10.4269/ajtmh.2010.09-0257e>
- Carlier, Y., & Torrico, F. (2015). Congenital Chagas disease as an ecological model of interactions between Trypanosoma cruzi parasites, pregnant women, placenta and fetuses. *Acta Tropica*, 151(1), 103–115. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2015.07.016>
- Carrillo, I., Droguett, D., Castillo, C., Liempi, A., Muñoz, L., Maya, J. D., Galanti, N., & Kemmerling,

- U. (2016). Caspase-8 activity is part of the BeWo trophoblast cell defense mechanisms against *Trypanosoma cruzi* infection. *Experimental Parasitology*, *168*, 9–15. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2016.06.008>
- Castillo, C., Carrillo, I., Libisch, G., Juiz, N., Schijman, A., Robello, C., & Kemmerling, U. (2018). Host-parasite interaction: Changes in human placental gene expression induced by *Trypanosoma cruzi*. *Parasites and Vectors*, *11*(1), 1–13. <https://doi.org/10.1186/s13071-018-2988-0>
- Castillo, C., Gallardo, C., Muñoz, L., Carrillo, I., Liempi, A., Galanti, N., Maya, J. D., & Kemmerling, U. (2017). Ex vivo infection of human placental chorionic villi explants with *Trypanosoma cruzi* and *Toxoplasma gondii* induces different Toll-like receptor expression and cytokine/chemokine profiles. *American Journal of Reproductive Immunology*, *78*(1), 1–8. <https://doi.org/10.1111/aji.12660>
- Castillo, C., Medina, L., Muñoz, L., Carrillo, I., Liempi, A., Galanti, N., Maya, J. D., & Kemmerling, U. (2017). Toll-like receptor-2 mediates local innate immune response against *Trypanosoma cruzi* in ex vivo infected human placental chorionic villi explants. *Placenta*, *60*, 40–46. <https://doi.org/10.1016/j.placenta.2017.10.005>
- Castillo, C., Ramírez, G., Valck, C., Aguilar, L., Maldonado, I., Rosas, C., Galanti, N., Kemmerling, U., & Ferreira, A. (2013). The Interaction of Classical Complement Component C1 with Parasite and Host Calreticulin Mediates *Trypanosoma cruzi* Infection of Human Placenta. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, *7*(8). <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002376>
- Castillo, C., Villarroel, A., Duaso, J., Galanti, N., Cabrera, G., Maya, J. D., & Kemmerling, U. (2013). Phospholipase C gamma and ERK1/2 Mitogen Activated Kinase Pathways are differentially modulated by *Trypanosoma cruzi* during tissue invasion in human placenta. *Experimental Parasitology*, *133*(1), 12–17. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2012.10.012>
- Chagas, C. (1909). Nova tripanozomíaze humana: estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi* n. gen., n. sp., agente etiológico de nova entidade morbida do homem. In *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* (Vol. 1, Issue 2, pp. 159–218). <https://doi.org/10.1590/s0074-02761909000200008>
- Chang, D. W., Xing, Z., Pan, Y., Algeciras-Schimmich, A., Barnhart, B. C., Yaish-Ohad, S., Peter, M. E., & Yang, X. (2002). C-FLIPL is a dual function regulator for caspase-8 activation and CD95-mediated apoptosis. *EMBO Journal*, *21*(14), 3704–3714. <https://doi.org/10.1093/emboj/cdf356>
- Chang, S., Lee, S., Yang, J., Kim, D. W., Yoon, J., Ogawa, M., Sasakawa, C., & Kweon, M. (2013). *Autophagy Controls an Intrinsic Host Defense to Bacteria by Promoting Epithelial Cell Survival: A Murine Model*. *8*(11), 1–12. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0081095>

- Chaudhuri, A. D., Yelamanchili, S. V., & Fox, H. S. (2013). *Combined fluorescent in situ hybridization for detection of microRNAs and immunofluorescent labeling for cell-type markers*. 7(September), 1–8. <https://doi.org/10.3389/fncel.2013.00160>
- Chen, F., Zhu, H.-H., Zhou, L.-F., Wu, S.-S., Wang, J., & Chen, Z. (2010). Inhibition of c-FLIP expression by miR-512-3p contributes to Taxol-induced apoptosis in hepatocellular carcinoma cells. *Oncology Reports*, 23, 1457–1462. <https://doi.org/10.3892/or>
- Cheng, A. M., Byrom, M. W., Shelton, J., & Ford, L. P. (2005). Antisense inhibition of human miRNAs and indications for an involvement of miRNA in cell growth and apoptosis. *Nucleic Acids Research*, 33(4), 1290–1297. <https://doi.org/10.1093/nar/gki200>
- Chu, Y. H., Hardin, H., Zhang, R., Guo, Z., & Lloyd, R. V. (2019). In situ hybridization: Introduction to techniques, applications and pitfalls in the performance and interpretation of assays. *Seminars in Diagnostic Pathology*, 36(5), 336–341. <https://doi.org/10.1053/j.semmp.2019.06.004>
- Cleys, E. R., Halleran, J. L., Mcwhorter, E., Hergenreder, J., Enriquez, V. A., da Silveira, J. C., Bruemmer, J. E., Winger, Q. A., & Bouma, G. J. (2014). Identification of microRNAs in exosomes isolated from serum and umbilical cord blood, as well as placentomes of gestational day 90 pregnant sheep. *Molecular Reproduction and Development*, 81(11), 983–993. <https://doi.org/10.1002/mrd.22420>
- Cofré, F., Delpiano, L., Labraña, Y., Reyes, A., Sandoval, A., & Izquierdo, G. (2016). TORCH Syndrome: Rational approach of pre and post natal diagnosis. Recommendations of the advisory committee on neonatal infections. Sociedad Chilena de Infectología, 2016. *Revista Chilena de Obstetricia y Ginecología*, 33(2), 191–216. <https://doi.org/10.4067/S0717-75262017000200011>
- Cronier, L. (1998). Desamethasone Stimulates Gap Junctional Communication, Peptide Hormone Production and Differentiation of Human trophoblast. *Trophoblast Res*, 11, 35–49.
- Dai, X., & Cai, Y. (2018). Down-regulation of microRNA let-7d inhibits the proliferation and invasion of trophoblast cells in preeclampsia. *Journal of Cellular Biochemistry*, 119(1), 1141–1151. <https://doi.org/10.1002/jcb.26282>
- Daleke, D. L. (2007). Phospholipid flippases. *Journal of Biological Chemistry*, 282(2), 821–825. <https://doi.org/10.1074/jbc.R600035200>
- Dao, L. (1949). Otros casos de enfermedad de Chagas en el estado Guárico (Venezuela): formas agudas y crónicas; observación sobre la enfermedad de Chagas congénita. *Revista Policlínica Caracas*, 17, 17–32.
- de la Fuente Jiménez, J. L., Sharma, A., & Paul, S. (2020). Characterization of miRNAs from sardine (*Sardina pilchardus* Walbaum, 1792) and their tissue-specific expression analysis in brain and liver.

- 3 *Biotech*, 10(7), 1–9. <https://doi.org/10.1007/s13205-020-02298-y>
- De Souza, W., & Barrias, E. S. (2020). May the epimastigote form of *Trypanosoma cruzi* be infective? *Acta Tropica*, 212(June), 105688. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2020.105688>
- Delorme-Axford, E., Donker, R. B., Mouillet, J. F., Chu, T., Bayer, A., Ouyang, Y., Wang, T., Stolz, D. B., Sarkar, S. N., Morelli, A. E., Sadovsky, Y., & Coyne, C. B. (2013). Human placental trophoblasts confer viral resistance to recipient cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(29), 12048–12053. <https://doi.org/10.1073/pnas.1304718110>
- Delorme-Axford, E., Sadovsky, Y., & Coyne, C. B. (2014). The placenta as a barrier to viral infections. *Annual Review of Virology*, 1(1), 133–146. <https://doi.org/10.1146/annurev-virology-031413-085524>
- Díaz-Luján, C., Triquell, M. F., Schijman, A., Paglini, P., & Fretes, R. E. (2012). Differential susceptibility of isolated human trophoblasts to infection by *Trypanosoma cruzi*. *Placenta*, 33(4), 264–270. <https://doi.org/10.1016/j.placenta.2012.01.005>
- Diaz, J., & Brener, S. (1984). Chagas' disease and blood transfusion. *Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro*, 79, 139–147. <https://doi.org/10.1590/s0074-02761984000500025>
- Donker, R. B., Mouillet, J. F., Chu, T., Hubel, C. A., Stolz, D. B., Morelli, A. E., & Sadovsky, Y. (2012). The expression profile of C19MC microRNAs in primary human trophoblast cells and exosomes. *Molecular Human Reproduction*, 18(8), 417–424. <https://doi.org/10.1093/molehr/gas013>
- 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. <https://doi.org/10.1016/j.placenta.2010.05.007>
- Duaso, Yanez, E., Castillo, C., Galanti, N., Cabrera, G., Corral, G., Maya, J. D., Zulantay, I., Apt, W., Kemmerling, U., 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? *Journal of Tropical Medicine*, 2012. <https://doi.org/10.1155/2012/758357>
- Dupressoir, A., Lavielle, C., & Heidmann, T. (2012). From ancestral infectious retroviruses to bona fide cellular genes: Role of the captured syncytins in placentation. *Placenta*, 33(9), 663–671. <https://doi.org/10.1016/j.placenta.2012.05.005>
- Esteller, M. (2011). Non-coding RNAs in human disease. *Nature Reviews Genetics*, 12(12), 861–874. <https://doi.org/10.1038/nrg3074>

- Fernandez-Calero, T., Garcia-Silva, R., Pena, A., Robello, C., Persson, H., Rovira, C., Naya, H., & Cayota, A. (2015). Profiling of small RNA cargo of extracellular vesicles shed by *Trypanosoma cruzi* reveals a specific extracellular signature. *Molecular and Biochemical Parasitology*, *199*(1–2), 19–28. <https://doi.org/10.1016/j.molbiopara.2015.03.003>
- Ferreira, L. R. P., Frade, A. F., Santos, R. H. B., Teixeira, P. C., Baron, M. A., Navarro, I. C., Benvenuti, L. A., Fiorelli, A. I., Bocchi, E. A., Stolf, N. A., Chevillard, C., Kalil, J., & Cunha-Neto, E. (2014). MicroRNAs miR-1, miR-133a, miR-133b, miR-208a and miR-208b are dysregulated in Chronic Chagas disease Cardiomyopathy. *International Journal of Cardiology*, *175*(3), 409–417. <https://doi.org/10.1016/j.ijcard.2014.05.019>
- Franzén, O., Arner, E., Ferella, M., Nilsson, D., Respuela, P., Carninci, P., Hayashizaki, Y., Åslund, L., Andersson, B., & Daub, C. O. (2011). The short non-coding transcriptome of the protozoan parasite *Trypanosoma cruzi*. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, *5*(8). <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0001283>
- Fretes, R. E., & Kemmerling, U. (2012). Mechanism of *Trypanosoma cruzi* placenta invasion and infection: The use of human chorionic villi explants. *Journal of Tropical Medicine*, *2012*. <https://doi.org/10.1155/2012/614820>
- Fretes, R. E., Kemmerling, U., & Sarr, D. (2012). Congenital transmission by protozoan. *Journal of Tropical Medicine*, *2012*. <https://doi.org/10.1155/2012/173437>
- Gauster, M., Siwetz, M., & Huppertz, B. (2009). Fusion of Villous Trophoblast can be Visualized by Localizing Active Caspase 8. *Placenta*, *30*(6), 547–550. <https://doi.org/10.1016/j.placenta.2009.03.007>
- Giza, D. E., Vasilescu, C., & Calin, G. A. (2014). *Key principles of miRNA involvement in human diseases*. *2*(4), 1–10. <https://doi.org/10.15190/d.2014.26>
- Gonçalves, C. S., Ávila, A. R., De Souza, W., Motta, M. C. M., & Cavalcanti, D. P. (2018). Revisiting the *Trypanosoma cruzi* metacyclogenesis: Morphological and ultrastructural analyses during cell differentiation. *Parasites and Vectors*, *11*(1), 1–14. <https://doi.org/10.1186/s13071-018-2664-4>
- Gregory, R. I., Yan, K. P., Amuthan, G., Chendrimada, T., Doratotaj, B., Cooch, N., & Shiekhattar, R. (2004). The Microprocessor complex mediates the genesis of microRNAs. *Nature*, *432*(7014), 235–240. <https://doi.org/10.1038/nature03120>
- Handschuh, K., Guibourdenche, J., Tsatsaris, V., Guesnon, M., Laurendeau, I., Evain-Brion, D., & Fournier, T. (2007). Human chorionic gonadotropin produced by the invasive trophoblast but not the villous trophoblast promotes cell invasion and is down-regulated by peroxisome proliferator-activated receptor- γ . *Endocrinology*, *148*(10), 5011–5019. <https://doi.org/10.1210/en.2007-0286>

- Hayder, H., O'Brien, J., Nadeem, U., & Peng, C. (2018). MicroRNAs: Crucial regulators of placental development. *Reproduction*, *155*(6), 1–39. <https://doi.org/10.1530/REP-17-0603>
- Hofflin, J. M., Sadler, R. H., & Araujo, F. G. (1987). *Laboratory-acquired Chagas disease*.
- Hromadnikova, I., Dvorakova, L., Kotlabova, K., & Krofta, L. (2019). The prediction of gestational hypertension, preeclampsia and fetal growth restriction via the first trimester screening of plasma exosomal C19MC microRNAs. *International Journal of Molecular Sciences*, *20*(12). <https://doi.org/10.3390/ijms20122972>
- Hromadnikova, I., Kotlabova, K., Ondrackova, M., Pirkova, P., Kestlerova, A., Novotna, V., Hympanova, L., & Krofta, L. (2015). Expression profile of C19MC microRNAs in placental tissue in pregnancy-related complications. *DNA and Cell Biology*, *34*(6), 437–457. <https://doi.org/10.1089/dna.2014.2687>
- Huppertz, B., & Gauster, M. (2011). Trophoblast fusion. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, *713*, 81–95. https://doi.org/10.1007/978-94-007-0763-4_6
- Jackson, Y., Wyssa, B., & Chappuis, F. (2020). Tolerance to nifurtimox and benznidazole in adult patients with chronic Chagas' disease. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, *75*(3), 690–696. <https://doi.org/10.1093/jac/dkz473>
- Jensen, E. (2014). Technical review: In situ hybridization. *Anatomical Record*, *297*(8), 1349–1353. <https://doi.org/10.1002/ar.22944>
- Juiz, N. A., Cayo, N. M., Burgos, M., Salvo, M. E., Nasser, J. R., Búa, J., Longhi, S. A., & Schijman, A. G. (2016). *Human Polymorphisms in Placentally Expressed Genes and Their Association With Susceptibility to Congenital Trypanosoma cruzi Infection*. *213*, 1299–1306. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiv561>
- Kaija, H., Pakanen, L., & Porvari, K. (2020). RNU6B, a frequent reference in miRNA expression studies, differentiates between deaths caused by hypothermia and chronic cardiac ischemia. *International Journal of Legal Medicine*, *134*(1), 159–162. <https://doi.org/10.1007/s00414-019-02041-0>
- Kasper, C. A., Sorg, I., Schmutz, C., Tschon, T., Wischnewski, H., & Kim, M. L. (2010). *Article Cell-Cell Propagation of NF- κ B Transcription Factor and MAP Kinase Activation Amplifies Innate Immunity against Bacterial Infection*. *2*. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2010.10.015>
- Kemmerling, U., Bosco, C., & Galanti, N. (2010). Infection and invasion mechanisms of *Trypanosoma cruzi* in the congenital transmission of Chagas' disease: A proposal. *Medecine Et Hygiene*, 307–316.
- Kemmerling, U., Castillo, C., Liempi, A., Medina, L., Carrillo, I., Droguett, D., Maya, J. D., & Galanti, N. (2017). The immune response against *Trypanosoma cruzi* in the human placenta. *Emerging*

- Topics in Life Sciences*, 1(6), 573–577. <https://doi.org/10.1042/ETLS20170115>
- Kemmerling, U., Osuna, A., Schijman, A. G., & Truyens, C. (2019). Congenital transmission of trypanosoma cruzi: A review about the interactions between the parasite, the placenta, the maternal and the fetal/neonatal immune responses. *Frontiers in Microbiology*, 10(AUG). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01854>
- Kollien, A. H., & Schaub, G. A. (2000). The development of Trypanosoma cruzi in triatominae. *Parasitology Today*, 16(9), 381–387. [https://doi.org/10.1016/S0169-4758\(00\)01724-5](https://doi.org/10.1016/S0169-4758(00)01724-5)
- Krol, J., Loedige, I., & Filipowicz, W. (2010). The widespread regulation of microRNA biogenesis, function and decay. *Nature Reviews Genetics*, 11(9), 597–610. <https://doi.org/10.1038/nrg2843>
- Laugier, L., Ferreira, L. R. P., Ferreira, F. M., Cabantous, S., Frade, A. F., Nunes, J. P., Ribeiro, R. A., Brochet, P., Teixeira, P. C., Santos, R. H. B., Bocchi, E. A., Bacal, F., da Silva Cândido, D., Maso, V. E., Nakaya, H. I., Kalil, J., Cunha-Neto, E., & Chevillard, C. (2020). MiRNAs may play a major role in the control of gene expression in key pathobiological processes in chagas disease cardiomyopathy. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 14(12), 1–20. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0008889>
- Lei, Z., Mil, A. Van, Xiao, J., Metz, C. H. G., Eeuwijk, E. C. M. Van, Doevendans, P. A., & Sluijter, J. P. G. (2018). MMISH : Multicolor microRNA in situ hybridization for paraffin embedded samples. *Biotechnology Reports*, e00255. <https://doi.org/10.1016/j.btre.2018.e00255>
- Li, J., Smyth, P., Flavin, R., Cahill, S., Denning, K., Aherne, S., Guenther, S. M., O’Leary, J. J., & Sheils, O. (2007). Comparison of miRNA expression patterns using total RNA extracted from matched samples of formalin-fixed paraffin-embedded (FFPE) cells and snap frozen cells. *BMC Biotechnology*, 7, 1–6. <https://doi.org/10.1186/1472-6750-7-36>
- Lidani, K. C. F., Andrade, F. A., Bavia, L., Damasceno, F. S., Beltrame, M. H., Messias-Reason, I. J., & Sandri, T. L. (2019). Chagas disease: From discovery to a worldwide health problem. *Journal of Physical Oceanography*, 49(6), 1–13. <https://doi.org/10.3389/fpubh.2019.00166>
- Lidani, K. C. F., Bavia, L., Ambrosio, A. R., & de Messias-Reason, I. J. (2017). The complement system: A prey of Trypanosoma cruzi. *Frontiers in Microbiology*, 8(APR), 1–14. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00607>
- Lieke, T., Nylén, S., & Eidsmo, L. (2008). *Leishmania surface protein gp 63 binds directly to human natural killer cells and inhibits proliferation*. 221–230. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2249.2008.03687.x>
- Liempi, A., Castillo, C., Carrillo, I., Muñoz, L., Droguett, D., Galanti, N., Maya, J. D., & Kemmerling, U. (2016). A local innate immune response against Trypanosoma cruzi in the human placenta: The

- epithelial turnover of the trophoblast. *Microbial Pathogenesis*, 99, 123–129.
<https://doi.org/10.1016/j.micpath.2016.08.022>
- Liempi, A., Castillo, C., Duaso, J., Droguett, D., Sandoval, A., Barahona, K., Hernández, A., Galanti, N., Maya, J. D., & Kemmerling, U. (2014). Trypanosoma cruzi induces trophoblast differentiation: A potential local antiparasitic mechanism of the human placenta? *Placenta*, 35(12), 1035–1042.
<https://doi.org/10.1016/j.placenta.2014.09.017>
- Liempi, A., Castillo, C., Medina, L., Rojas-Pirela, M., Araneda, S., Maya, J. D., Parraguez, V. H., & Kemmerling, U. (2020). Ex vivo infection of canine and ovine placental explants with Trypanosoma cruzi and Toxoplasma gondii: differential activation of NF kappa B signaling pathways. *Acta Tropica*, 214, 105766. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2020.105766>
- Liempi, A., Castillo, C., Medina, L., Rojas, M., Maya, J. D., Parraguez, V. H., & Kemmerling, U. (2019). Ex vivo infection of human placental explants with Trypanosoma cruzi and Toxoplasma gondii: Differential activation of NF kappa B signaling pathways. *Acta Tropica*, 199(July), 105153.
<https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2019.105153>
- Liu, M., Bian, X., Wang, H., & Wang, Y. L. (2018). microRNAs in pregnancy: Implications for basic research and clinical management. In *Human Reproductive and Prenatal Genetics*. Elsevier Inc.
<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-813570-9.00014-0>
- Livingston, E. G., Duggal, R., & Dotters-katz, S. (2021). *Screening for Chagas Disease during Pregnancy in the United States — A Literature Review*.
- Lowe, D. E., Robbins, J. R., & Bakardjiev, A. I. (2018). Animal and human tissue models of vertical Listeria monocytogenes transmission and implications for other pregnancy-associated infections. *Infection and Immunity*, 86(6). <https://doi.org/10.1128/IAI.00801-17>
- Lu, J., Getz, G., Miska, E. A., Alvarez-Saavedra, E., Lamb, J., Peck, D., Sweet-Cordero, A., Ebert, B. L., Mak, R. H., Ferrando, A. A., Downing, J. R., Jacks, T., Horvitz, H. R., & Golub, T. R. (2005). MicroRNA expression profiles classify human cancers. *Nature*, 435(7043), 834–838.
<https://doi.org/10.1038/nature03702>
- Luján, 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. *Experimental Parasitology*, 108(3–4), 176–181.
<https://doi.org/10.1016/j.exppara.2004.07.013>
- Mayhew, T. M. (2014). Turnover of human villous trophoblast in normal pregnancy: What do we know and what do we need to know? *Placenta*, 35(4), 229–240.
<https://doi.org/10.1016/j.placenta.2014.01.011>

- Medina, L., Castillo, C., Liempi, A., Guerrero-Muñoz, J., Rojas-Pirela, M., Maya, J. D., Prieto, H., & Kemmerling, U. (2020). Trypanosoma cruzi and Toxoplasma gondii Induce a Differential MicroRNA Profile in Human Placental Explants. *Frontiers in Immunology*, *11*(November), 1–14. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.595250>
- Medina, L., Castillo, C., Liempi, A., Herbach, M., Cabrera, G., Valenzuela, L., Galanti, N., de los Angeles Curto, M., Schijman, A. G., & Kemmerling, U. (2018). Differential infectivity of two Trypanosoma cruzi strains in placental cells and tissue. *Acta Tropica*, *186*(January), 35–40. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2018.07.001>
- Medina, L., Guerrero-Muñoz, J. A., Liempi, A. I., Castillo, C., Ortega, Y., Sepúlveda, A., Salomó, F., Maya, J. D., & Kemmerling, U. (2022). Ex Vivo Infection of Human Placental Explants by Trypanosoma cruzi Reveals a microRNA Profile Similar to That Seen in Trophoblast Differentiation. *Pathogens*, *11*(3), 361. <https://doi.org/10.3390/pathogens11030361>
- Messenger, L. A., Gilman, R., Verastegui, M., Galdos-Cardenas, G., Sanchez, G., Valencia, E., Sanchez, L., Malaga, E., Rendell, V., Jois, M., Shah, V., Santos, N., Abastoflor, M. del C., LaFuente, C., Colanzi, R., Bozo, R., & Bern, C. (2017). Towards improving early diagnosis of congenital Chagas disease in an endemic setting. *Clinical Infectious Diseases*, *65*(2), 268–275.
- Mi, S., Lee, X., Li, X. ping, Veldman, G. M., Finnerty, H., Racie, L., LaVallie, E., Tang, X. Y., Edouard, P., Howes, S., Keith, J. C., & McCoy, J. M. (2000). Syncytin is a captive retroviral envelope protein involved in human placental morphogenesis. *Nature*, *403*(6771), 785–789. <https://doi.org/10.1038/35001608>
- Moffett, A., & Loke, C. (2006). Immunology of placentation in eutherian mammals. *Nature Reviews Immunology*, *6*(8), 584–594. <https://doi.org/10.1038/nri1897>
- Monge-Maillo, B., & López-Vélez, R. (2017). Challenges in the management of Chagas disease in Latin-American migrants in Europe. *Clinical Microbiology and Infection*, *23*(5), 290–295. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2017.04.013>
- Mor, G., Aldo, P., & Alvero, A. B. (2017). The unique immunological and microbial aspects of pregnancy. *Nature Reviews Immunology*, *17*(8), 469–482. <https://doi.org/10.1038/nri.2017.64>
- Mor, G., & Cardenas, I. (2010). The Immune System in Pregnancy: A Unique Complexity. *American Journal of Reproductive Immunology*, *63*(6), 425–433. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0897.2010.00836.x>
- Mouillet, J. F., Ouyang, Y., Bayer, A., Coyne, C. B., & Sadovsky, Y. (2014). The role of trophoblastic microRNAs in placental viral infection. *International Journal of Developmental Biology*, *58*(2–4), 281–289. <https://doi.org/10.1387/ijdb.130349ys>

- Mouillet, J. F., Ouyang, Y., Coyne, C. B., & Sadovsky, Y. (2015). MicroRNAs in placental health and disease. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 213(4), S163–S172. <https://doi.org/10.1016/j.ajog.2015.05.057>
- Müller Kratz, J., Garcia Bournissen, F., Forsyth, C. J., & Sosa-Estani, S. (2018). Clinical and pharmacological profile of benznidazole for treatment of Chagas disease. In *Expert Review of Clinical Pharmacology* (Vol. 11, Issue 10). Taylor & Francis. <https://doi.org/10.1080/17512433.2018.1509704>
- Muñoz-Saravia, S. G., Haberland, A., Wallukat, G., & Schimke, I. (2010). Chronic Chagas' heart disease: A disease on its way to becoming a worldwide health problem: Epidemiology, etiopathology, treatment, pathogenesis and laboratory medicine. *Heart Failure Reviews*, 17(1), 45–64. <https://doi.org/10.1007/s10741-010-9211-5>
- Muñoz, C., Solari, A., APT, W., & Zulantay, I. (2013). Caracterización de las Unidades Discretas de Tipificación de Trypanosoma cruzi según sus marcadores moleculares. *Ibero-Latinoamericana de Parasitología*, 72(July 2016), 5–21.
- Murcia, L., Carrilero, B., Muñoz-Davila, J., Thomas, M. C., López, M., & Segovia, M. (2012). Risk factors and primary prevention of congenital Chagas disease in a non- endemic country. *Clinical Infectious Diseases*, 56(4), 496–502.
- Nizyaeva, N. V., Kulikova, G. V., Nagovitsyna, M. N., Kan, N. E., Prozorovskaya, K. N., Shchegolev, A. I., & Sukhikh, G. T. (2017). Expression of MicroRNA-146a and MicroRNA-155 in Placental Villi in Early- and Late-Onset Preeclampsia. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*, 163(3), 394–399. <https://doi.org/10.1007/s10517-017-3812-0>
- Nuovo, G. J., Elton, T. S., Nana-sinkam, P., Volinia, S., Croce, C. M., & Schmittgen, T. D. (2010). *PROTOCOL A methodology for the combined in situ analyses of the precursor and mature forms of microRNAs and correlation with their putative targets*. 4(1), 107–116. <https://doi.org/10.1038/nprot.2008.215>
- Obad, S., Dos Santos, C. O., Petri, A., Heidenblad, M., Broom, O., Ruse, C., Fu, C., Lindow, M., Stenvang, J., Straarup, E. M., Hansen, H. F., Koch, T., Pappin, D., Hannon, G. J., & Kauppinen, S. (2011). Silencing of microRNA families by seed-targeting tiny LNAs. *Nature Genetics*, 43(4), 371–380. <https://doi.org/10.1038/ng.786>
- Ojha, C. R., Rodriguez, M., Dever, S. M., Mukhopadhyay, R., & El-Hage, N. (2016). Mammalian microRNA: an important modulator of host-pathogen interactions in human viral infections. *Journal of Biomedical Science*, 23(1), 1–11. <https://doi.org/10.1186/s12929-016-0292-x>
- Padilla, C. P., Alvarado, U., Ventura, G., Luna-caipo, D., & Suárez, M. (2017). Detección de unidades

- discretas de tipificación de *Trypanosoma cruzi* en triatominos recolectados en diferentes regiones naturales de Perú. *Biomédica*, 37(2), 167–179. <https://doi.org/10.7705/biomedica.v34i2.3559>
- Paul, S., Ruiz-Manriquez, L. M., Serrano-Cano, F. I., Estrada-Meza, C., Solorio-Diaz, K. A., & Srivastava, A. (2020). Human microRNAs in host–parasite interaction: a review. *3 Biotech*, 10(12). <https://doi.org/10.1007/s13205-020-02498-6>
- Paulsen, I. W., Bzorek, M., Olsen, J., Grum-Schwensen, B., Troelsen, J. T., & Pedersen, O. B. (2021). A novel approach for microRNA in situ hybridization using locked nucleic acid probes. *Scientific Reports*, 11(1), 1–14. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-83888-5>
- Pearson, R. (2020). *Enfermedad de Chagas*. MANUAL MSD Enfermedad de Chagas Fisiopatología Signos y Síntomas. <https://www.msmanuals.com/es-ve/professional/enfermedades-infeciosas/protozoos-extraintestinales/enfermedad-de-chagas>
- Pena, J. T. G., Sohn-lee, C., Rouhanifard, S. H., Ludwig, J., Hafner, M., Mihailovic, A., Lim, C., Holoch, D., Berninger, P., Zavolan, M., & Tuschl, T. (2009). *miRNA in situ hybridization in formaldehyde and EDC – fixed tissues*. 6(2), 139–141. <https://doi.org/10.1038/NMETH.1294>
- Pérez-Aguilar, M. C., Alarcón, M., Araujo, S., & Goncalves, L. (2012). Efecto de la infección congénita por *Trypanosoma cruzi* sobre el desarrollo intrauterino y la respuesta inmune fetal-neonatal. *Investigacion Clinica (Venezuela)*, 53(2), 190–204.
- Pérez-Molina, J. A., & Molina, I. (2018). Chagas disease. *The Lancet*, 391(10115), 82–94. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(17\)31612-4](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(17)31612-4)
- Pfaffl, M. (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Research*, 29(9), 2002–2007. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2966.2012.21196.x>
- Picado, A., Cruz, I., Redard-Jacot, M., Schijman, A. G., Torrico, F., Sosa-Estani, S., Katz, Z., & Ndung'u, J. M. (2018). The burden of congenital Chagas disease and implementation of molecular diagnostic tools in Latin America. *BMJ Global Health*, 3(5), e001069. <https://doi.org/10.1136/bmjgh-2018-001069>
- Planell-saguer, M. De, Rodicio, M. C., & Mourelatos, Z. (2010). Rapid in situ codetection of noncoding RNAs and proteins in cells and formalin-fixed paraffin-embedded tissue sections without protease treatment. *Nature Protocols*, 5(6), 1061–1073. <https://doi.org/10.1038/nprot.2010.62>
- Prieto, D. M. M., & Markert, U. R. (2011). MicroRNAs in pregnancy. *Journal of Reproductive Immunology*, 88(2), 106–111. <https://doi.org/10.1016/j.jri.2011.01.004>
- QUIAGEN®. (2019). *miRNA ISH Optimization Kits (FFPE) Handbook*. <https://www.qiagen.com/us/resources/resourcedetail?id=fd8cfa08-ae2-41c0-b847-2666ff0f63d8&lang=en>

- Rassi, A., Rassi, A., & Marin-Neto, J. A. (2010). Chagas disease. *The Lancet*, 375(9723), 1388–1402. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(10\)60061-X](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(10)60061-X)
- Renwick, N., Cekan, P., Masry, P. A., Mcgeary, S. E., Miller, J. B., Hafner, M., Li, Z., Mihailovic, A., Morozov, P., Brown, M., Gogakos, T., Mobin, M. B., Snorrason, E. L., Feilotter, H. E., Zhang, X., Perlis, C. S., Wu, H., Suárez-fariñas, M., Feng, H., ... Tuschl, T. (2013). *Multicolor microRNA FISH effectively differentiates tumor types*. 123(6). <https://doi.org/10.1172/JCI68760DS1>
- Rodrigues, M. M., Oliveira, A. C., & Bellio, M. (2012). *The Immune Response to Trypanosoma cruzi: Role of Toll-Like Receptors and Perspectives for Vaccine Development*. 2012. <https://doi.org/10.1155/2012/507874>
- Rojas-pirela, M., Andrade-alviárez, D., Medina, L., Castillo, C., Liempi, A., Guerrero-muñoz, J., Ortega, Y., Maya, J. D., Rojas, V., Quiñones, W., Michels, P. A., & Kemmerling, U. (2022). *MicroRNAs: master regulators in host – parasitic protist interactions*.
- Rojo, G., Castillo, C., Duaso, J., Liempi, A., Droguett, D., Galanti, N., Maya, J. D., López-Muñoz, R., & Kemmerling, U. (2014). Toxic and therapeutic effects of Nifurtimox and Benznidazol on Trypanosoma cruzi ex vivo infection of human placental chorionic villi explants. *Acta Tropica*, 132(1), 112–118. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2014.01.002>
- Sadovsky, Y., Mouillet, J. F., Ouyang, Y., Bayer, A., & Coyne, C. B. (2015). The function of trophomirs and other micrnas in the human placenta. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 5(8), 1–16. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a023036>
- Salas, C., Tapia, R. A., Ciudad, K., Armstrong, V., Orellana, M., Kemmerling, U., Ferreira, J., Maya, J. D., & Morello, A. (2008). Trypanosoma cruzi: Activities of lapachol and α - and β -lapachone derivatives against epimastigote and trypomastigote forms. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 16(2), 668–674. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2007.10.038>
- Salehi, M., & Sharifi, M. (2018). Exosomal miRNAs as novel cancer biomarkers: Challenges and opportunities. *Journal of Cellular Physiology*, 233(9), 6370–6380. <https://doi.org/10.1002/jcp.26481>
- Sales, P. A., Molina, I., Murta, S. M. F., Sánchez-Montalvá, A., Salvador, F., Corrêa-Oliveira, R., & Carneiro, C. M. (2017). Experimental and clinical treatment of Chagas disease: A review. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 97(5), 1289–1303. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.16-0761>
- Sauer, E., Babion, I., Madea, B., & Courts, C. (2014). An evidence based strategy for normalization of quantitative PCR data from miRNA expression analysis in forensic organ tissue identification. *Forensic Science International: Genetics*, 13, 217–223.

<https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2014.08.005>

- Schindelin, J., Arganda-Carreras, I., Frise, E., Kaynig, V., Longair, M., Pietzsch, T., Preibisch, S., Rueden, C., Saalfeld, S., Schmid, B., Tinevez, J. Y., White, D. J., Hartenstein, V., Eliceiri, K., Tomancak, P., & Cardona, A. (2012). Fiji: An open-source platform for biological-image analysis. *Nature Methods*, 9(7), 676–682. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2019>
- Schmunis, G. A. (2007). Epidemiology of Chagas disease in non-endemic countries: The role of international migration. *Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz*, 102(SUPPL. 1), 75–85. <https://doi.org/10.1590/s0074-02762007005000093>
- Sempere, L. F., Preis, M., Yezefski, T., Ouyang, H., Suriawinata, A. A., Silahtaroglu, A., Conejo-Garcia, J. R., Kauppinen, S., Wells, W., & Korc, M. (2010). Fluorescence-based codetection with protein markers reveals distinct cellular compartments for altered microRNA expression in solid tumors. *Clinical Cancer Research*, 16(16), 4246–4255. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-10-1152>
- Sen, R., Nayak, L., & De, R. K. (2016). A review on host–pathogen interactions: classification and prediction. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 35(10), 1581–1599. <https://doi.org/10.1007/s10096-016-2716-7>
- Shikanai-Yasuda, M. A., Marcondes, C. B., Guedes, L. A., Siqueira, G. S., Barone, A. A., Dias, J. C., Amato Neto, V., Tolezano, J. E., Peres, B. A., & Arruda Júnior, E. R. (1991). Possible oral transmission of acute Chagas' disease in Brazil. In *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo* (Vol. 33, Issue 5, pp. 351–357). <https://doi.org/10.1590/s0036-46651991000500003>
- Sikand, K., Singh, J., Ebron, J. S., & Shukla, G. C. (2012). Housekeeping Gene Selection Advisory: Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase (GAPDH) and β -Actin Are Targets of miR-644a. *PLoS ONE*, 7(10), 1–9. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0047510>
- Stillwaggon, E., Perez-Zetune, V., Bialek, S. R., & Montgomery, S. P. (2018). Congenital chagas disease in the United States: Cost savings through maternal screening. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 98(6), 1733–1742. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.17-0818>
- Sturm, N. R., Vargas, N. S., Westenberger, S. J., Zingales, B., & Campbell, D. A. (2003). Evidence for multiple hybrid groups in *Trypanosoma cruzi*. *International Journal for Parasitology*, 33(3), 269–279. [https://doi.org/10.1016/S0020-7519\(02\)00264-3](https://doi.org/10.1016/S0020-7519(02)00264-3)
- Suárez, C., Nolder, D., García-mingo, A., Moore, D. A. J., & Chiodini, P. L. (2022). *Diagnosis and Clinical Management of Chagas Disease : An Increasing Challenge in Non-Endemic Areas*. June, 25–40.
- Tibayrenc, M. (1998). Genetic epidemiology of parasitic protozoa and other infectious agents: The need for an integrated approach. *International Journal for Parasitology*, 28(1), 85–104.

[https://doi.org/10.1016/S0020-7519\(97\)00180-X](https://doi.org/10.1016/S0020-7519(97)00180-X)

- Tibayrenc, M. (2003). Genetic subdivisions within *Trypanosoma cruzi* (Discrete Typing Units) and their relevance for molecular epidemiology and experimental evolution. *Kinetoplastid Biology and Disease*, 2, 1–6. <https://doi.org/10.1186/1475-9292-2-12>
- Treiber, T., Treiber, N., & Meister, G. (2019). Regulation of microRNA biogenesis and its crosstalk with other cellular pathways. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 20(1), 5–20. <https://doi.org/10.1038/s41580-018-0059-1>
- Turco, M. Y., Gardner, L., Kay, R. G., Hamilton, R. S., Prater, M., Hollinshead, M. S., McWhinnie, A., Esposito, L., Fernando, R., Skelton, H., Reimann, F., Gribble, F. M., Sharkey, A., Marsh, S. G. E., O’rahilly, S., Hemberger, M., Burton, G. J., & Moffett, A. (2018). Trophoblast organoids as a model for maternal–fetal interactions during human placentation. *Nature*, 564(7735), 263–281. <https://doi.org/10.1038/s41586-018-0753-3>
- Tustin, A., & Bowman, N. (2016). Chagas’ disease. *Pediatrics in Review*, 37(4), 177–178. <https://doi.org/DOI:10.1542/pir.2015-0116>
- Tyler, K. M., & Engman, D. M. (2001). The life cycle of *Trypanosoma cruzi* revisited. *International Journal for Parasitology*, 31(5–6), 472–481. [https://doi.org/10.1016/S0020-7519\(01\)00153-9](https://doi.org/10.1016/S0020-7519(01)00153-9)
- Vazquez, M. C., Sabbatiello, R., Schiavelli, R., Maiolo, E., Jacob, N., Pattin, M., & Rearte, A. (1996). Chagas disease and transplantation. *Transplantation Proceedings*, 6, 3301–3303.
- Wang, X., Huang, J., & Zhu, F. (2018). Human endogenous retroviral envelope protein Syncytin-1 and inflammatory abnormalities in neuropsychological diseases. *Frontiers in Psychiatry*, 9(SEP), 1–9. <https://doi.org/10.3389/fpsy.2018.00422>
- WHO. (2015). Chagas disease in Latin America: an epidemiological update based on 2010 estimates. *Relevé Épidémiologique Hebdomadaire / Section d’hygiène Du Secrétariat de La Société Des Nations = Weekly Epidemiological Record / Health Section of the Secretariat of the League of Nations*, 90(6), 33–43.
- WHO. (2020). *La enfermedad de Chagas (tripanosomiasis americana)*. Datos y Cifras. [https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/chagas-disease-\(american-trypanosomiasis\)](https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/chagas-disease-(american-trypanosomiasis))
- Zhang, M., Muralimanoharan, S., Wortman, A. C., & Mendelson, C. R. (2016). Primate-specific miR-515 family members inhibit key genes in human trophoblast differentiation and are upregulated in preeclampsia. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 113(45), E7069–E7076. <https://doi.org/10.1073/pnas.1607849113>
- Zheng, Y., Cai, X., & Bradley, J. E. (2013). MicroRNAs in parasites and parasite infection. *RNA Biology*, 10(3), 371–379. <https://doi.org/10.4161/rna.23716>

Zingales, B., Miles, M. A., Campbell, D. A., Tibayrenc, M., Macedo, A. M., Teixeira, M. M. G., Schijman, A. G., Llewellyn, M. S., Lages-Silva, E., Machado, C. R., Andrade, S. G., & Sturm, N. R. (2012). The revised *Trypanosoma cruzi* subspecific nomenclature: Rationale, epidemiological relevance and research applications. *Infection, Genetics and Evolution*, 12(2), 240–253. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2011.12.009>

Zuma, A. A., dos Santos Barrias, E., & de Souza, W. (2020). Basic Biology of *Trypanosoma cruzi*. *Current Pharmaceutical Design*, 27(14), 1671–1732. <https://doi.org/10.2174/1381612826999201203213527>

www.bdigital.ula.ve