



Tesis de Doctorado

PEDECIBA – Biología

Subárea Biología Molecular y Celular

Aislamiento y caracterización de tripanosomátidos  
circulantes en Uruguay y de importancia en salud  
(*Leishmania infantum* y *Trypanosoma cruzi*)

Autora

Mag. María Paula Faral Tello

Tutor

Dr. Carlos Robello

Laboratorio de Interacciones Hospedero Patógeno  
Unidad de Biología Molecular  
Institut Pasteur de Montevideo

Montevideo

2021

### **Integrantes del tribunal de tesis:**

Dr. Uriel Koziol

Profesor Adjunto de la Sección Biología Celular  
Facultad de Ciencias - UdelaR

Dra. María Duhagon

Profesora Adjunta del Departamento de Genética  
Facultad de Medicina - UdelaR

#### Presidenta del tribunal

Dra. Lucía Piacenza

Profesora Agregada del Departamento de Bioquímica  
Facultad de Medicina - UdelaR

### **Integrantes de la Comisión de Admisión y Seguimiento**

Dr. Juan Arbiza

Profesor Titular de la Sección Virología  
Facultad de Ciencias – UdelaR

Dra. Lucía Piacenza

Profesora Agregada del Departamento de Bioquímica  
Facultad de Medicina - UdelaR

## 1. TABLA DE CONTENIDO

|       |                                                                                                                                                |    |
|-------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 1.    | Tabla de contenido .....                                                                                                                       | 3  |
| 2.    | Indice de figuras .....                                                                                                                        | 6  |
| 3.    | AGRADECIMIENTOS .....                                                                                                                          | 8  |
| 4.    | PRÓLOGO.....                                                                                                                                   | 10 |
|       | <b>PRIMERA PARTE:</b> .....                                                                                                                    | 14 |
|       | <b>Caracterización de aislados de <i>Leishmania infantum</i> circulantes en Uruguay.....</b>                                                   | 14 |
| 5.    | Resumen y principales resultados y conclusiones.....                                                                                           | 14 |
| 6.    | Artículos publicados en el marco de esta tesis .....                                                                                           | 14 |
|       | <b>SEGUNDA PARTE:</b> .....                                                                                                                    | 15 |
|       | <b>Los aislados de <i>Trypanosoma cruzi</i> adaptados a la infección congénita muestran una estrategia única de transmisión vertical .....</b> | 15 |
| 7.    | RESUMEN.....                                                                                                                                   | 15 |
| 7.1.  | Resumen en español .....                                                                                                                       | 15 |
| 7.2.  | Resumen en inglés .....                                                                                                                        | 16 |
| 8.    | Introducción .....                                                                                                                             | 17 |
| 8.1.  | Enfermedad de Chagas .....                                                                                                                     | 17 |
| 8.2.  | Quimioterapia y vacunas .....                                                                                                                  | 18 |
| 8.3.  | <i>Trypanosoma cruzi</i> y ciclo de vida.....                                                                                                  | 19 |
| 8.4.  | Transmisión vertical de <i>Trypanosoma cruzi</i> .....                                                                                         | 22 |
| 8.5.  | Placenta, pasaje transplacentario y estudios transcriptómicos .....                                                                            | 25 |
| 9.    | Antecedentes y justificación.....                                                                                                              | 30 |
| 10.   | Hipótesis .....                                                                                                                                | 31 |
| 11.   | Objetivos .....                                                                                                                                | 31 |
| 11.1. | Objetivo General.....                                                                                                                          | 31 |
| 11.2. | Objetivos específicos.....                                                                                                                     | 31 |
| 12.   | Materiales y Métodos .....                                                                                                                     | 32 |
| 12.1. | Casos clínicos y diagnóstico .....                                                                                                             | 32 |
| 12.2. | Aislamiento y mantenimiento de cepas .....                                                                                                     | 32 |
| 12.3. | Tipificación molecular.....                                                                                                                    | 33 |
| 12.4. | Experimentos <i>in vitro</i> .....                                                                                                             | 33 |

|                                                                                                                                                                              |    |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 12.4.1. Cultivos celulares .....                                                                                                                                             | 33 |
| 12.4.2. Epimastigogénesis.....                                                                                                                                               | 33 |
| 12.4.3. Susceptibilidad a Nifurtimox y Benznidazol .....                                                                                                                     | 34 |
| 12.4.4. Inmunofluorescencia indirecta .....                                                                                                                                  | 34 |
| 12.4.5. Índice de infectividad en células de mamífero.....                                                                                                                   | 35 |
| 12.5. Experimentos <i>in vivo</i> y procesamiento de muestras .....                                                                                                          | 35 |
| 12.5.1. Condiciones de cría de animales.....                                                                                                                                 | 35 |
| 12.5.2. Infecciones en ratones, monitoreo, curvas de parasitemia y supervivencia .....                                                                                       | 36 |
| 12.5.3. Evaluación de cópula, preñez, potencial abortogénico y transmisión vertical de<br>las diferentes cepas de <i>T. cruzi</i> .....                                      | 36 |
| 12.5.4. Determinación de la capacidad protectora .....                                                                                                                       | 38 |
| 12.5.5. Detección de ADN de <i>T. cruzi</i> por qPCR.....                                                                                                                    | 38 |
| 12.5.1. Expresión de citoquinas por qRT-PCR .....                                                                                                                            | 39 |
| 12.5.2. Extracción de ARN, secuenciación y análisis bioinformático.....                                                                                                      | 41 |
| 13. Resultados.....                                                                                                                                                          | 42 |
| 13.1. Parte A: Caracterización de los aislados de transmisión vertical .....                                                                                                 | 42 |
| 13.1.1. Los aislados de transmisión vertical pertenecen al linaje híbrido BCb (TcV).....                                                                                     | 42 |
| 13.1.2. Los tripomastigotas sanguíneos de los aislados de transmisión vertical no realizan<br>epimastigogénesis <i>in vitro</i> .....                                        | 43 |
| 13.1.3. Susceptibilidad de las cepas a Bzn y Nfx .....                                                                                                                       | 44 |
| 13.1.4. Los aislados de transmisión vertical presentan un fenotipo de baja virulencia ...                                                                                    | 45 |
| 13.1.5. Los aislados de TV colonizan los diferentes órganos de manera similar a cepas de<br>mayor virulencia.....                                                            | 46 |
| 13.1.6. Los aislados de TV inducen una respuesta inmune similar a la inducida por cepas<br>más virulentas.....                                                               | 48 |
| 13.1.7. La inmunización con un aislado de transmisión vertical protege a los ratones ante<br>una re-infección con una cepa altamente virulenta.....                          | 49 |
| 13.2. Parte B: Transmisión vertical, tropismo y respuesta placentaria .....                                                                                                  | 50 |
| 13.2.1. La infección con las cepas no afecta de manera significativa ni diferencial la<br>capacidad de las ratonas de reproducirse ni tampoco el resultado de la preñez..... | 50 |
| 13.2.2. Los aislados de transmisión vertical son más eficientes en su pasaje por la<br>placenta que Dm28c y Garbani.....                                                     | 51 |



|                                                                                                                                                   |     |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| 13.2.3. Los aislados de TV son más infectivas en células derivadas de trofoblasto que en fibroblastos comparadas con las cepas de referencia..... | 53  |
| 13.2.4. Los aislados de TV presentan un patrón único de respuesta placentaria .....                                                               | 55  |
| 14. Discusión.....                                                                                                                                | 64  |
| 15. CONCLUSIONES .....                                                                                                                            | 78  |
| 16. Perspectivas.....                                                                                                                             | 80  |
| 17. Referencias.....                                                                                                                              | 81  |
| 18. ANEXOS .....                                                                                                                                  | 91  |
| 18.1. Anexo 1. Heatmaps de conteos normalizados de genes diferencialmente expresados agrupados por término de ontología .....                     | 91  |
| 18.2. Anexo 2. Heatmaps de todos los genes relacionados a un proceso.....                                                                         | 101 |
| 18.3. Anexo 3. Otras publicaciones .....                                                                                                          | 103 |
| 18.4. Anexo 4. Publicaciones finales asociadas a esta tesis .....                                                                                 | 105 |

## 2. INDICE DE FIGURAS

|                                                                                                                               |    |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figura 1. Prevalencia global de la enfermedad de Chagas. ....                                                                 | 18 |
| Figura 2. Ciclo de vida de <i>Trypanosoma cruzi</i> .....                                                                     | 20 |
| Figura 3. Relaciones evolutivas del complejo <i>Trypanosoma cruzi</i> .....                                                   | 22 |
| Figura 4. Formas de transmisión de la Enfermedad de Chagas.....                                                               | 23 |
| Figura 5. Tipos de placenta.....                                                                                              | 26 |
| Figura 6. Representación esquemática de una vellosidad coriónica.....                                                         | 27 |
| Figura 7. Resumen de vías alteradas con la infección de <i>T. cruzi</i> en diferentes modelos de interfase materno fetal..... | 29 |
| Figura 8. Representación esquemática del experimento de transmisión vertical. ....                                            | 37 |
| Figura 9. Experimento de determinación de la capacidad protectora. ....                                                       | 38 |
| Figura 10. Tipificación molecular de las cepas de <i>T. cruzi</i> .....                                                       | 42 |
| Figura 11. Epimastigogénesis <i>in vitro</i> .....                                                                            | 44 |
| Figura 12. Efecto de Nifurtimox y Benznidazol en tripomastigotas. ....                                                        | 45 |
| Figura 13. Virulencia y curvas de parasitemia <i>in vivo</i> .....                                                            | 46 |
| Figura 14. Carga parasitaria en diferentes órganos para las cepas estudiadas .....                                            | 47 |
| Figura 15. Cuantificación relativa de expresión de citoquinas. ....                                                           | 49 |
| Figura 16. Experimento de determinación de la capacidad protectora. ....                                                      | 50 |
| Figura 17. Efecto de la infección sobre parámetros reproductivos y resultado de preñez.....                                   | 51 |
| Figura 18. Cuantificación relativa de parásitos en tejido placentario y fetal.....                                            | 52 |
| Figura 19. Porcentaje de reabsorciones y fetos viables positivos para <i>T. cruzi</i> . ....                                  | 53 |
| Figura 20. Infectividad de las diferentes cepas en dos líneas celulares humanas.....                                          | 54 |
| Figura 21. Transcriptómica de placenta, PCA y genes diferencialmente expresados.....                                          | 57 |
| Figura 22. Agrupamiento jerárquico de los genes diferencialmente expresados (DEGs).<br>.....                                  | 58 |
| Figura 23. Top 30 de genes que más cambian y top 30 de genes con cambio más significativo. ....                               | 60 |
| Figura 24. Enriquecimiento de genes en términos de ontología.....                                                             | 61 |
| Figura 25. Familias génicas específicas con modulación diferencial entre las placentas de Garbani y los aislados de TV.....   | 63 |
| Figura 26. Genes diferencialmente expresados relacionados al termino de ontología “Cytoplasmic Ribosomal Proteins”.....       | 91 |
| Figura 27. Genes diferencialmente expresados relacionados al termino de ontología “T-cell activation” .....                   | 92 |
| Figura 28. Genes diferencialmente expresados relacionados al termino de ontología “Inflammatory Response”.....                | 93 |

|                                                                                                                                                                                                                                                 |     |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| Figura 29. Genes diferencialmente expresados relacionados a los términos de ontología “Mitotic cell cycle process”, “Meiotic nuclear division”, “Sister chromatid cohesion”, “Meiotic spindle organization” and “Kinetocore organization” ..... | 94  |
| Figura 30. Genes diferencialmente expresados relacionados a los términos de ontología “Cell cycle”, “DNA Replication”, “DNA biosynthetic process”, “Cellular response to DNA damage stimulus” and “DNA synthesis involved in repair” .....      | 95  |
| Figura 31. Genes diferencialmente expresados relacionados al término de ontología “Cell projection and morphogenesis” .....                                                                                                                     | 96  |
| Figura 32. Genes diferencialmente expresados relacionados a los términos de ontología “Cell junction organization”, “Laminin interactions”, and “Gap junctions” ...                                                                             | 97  |
| Figura 33. Genes diferencialmente expresados relacionados a los términos de ontología “Cellular lipid catabolic process”, and “Organic Acid Transport” .....                                                                                    | 98  |
| Figura 34. Genes diferencialmente expresados relacionados al término de ontología “Positive regulation of secretion” .....                                                                                                                      | 99  |
| Figura 35. Genes diferencialmente expresados relacionados al término de ontología “Import to the cell” .....                                                                                                                                    | 100 |
| Figura 36. Comportamiento de todos los genes relacionados a Respuesta inmune .....                                                                                                                                                              | 101 |
| Figura 37. Comportamiento de todos los genes relacionados a Muerte celular...                                                                                                                                                                   | 102 |

### 3. AGRADECIMIENTOS

- Quiero agradecer a las personas que integran e integraron la Unidad de Biología Molecular/Laboratorio de Interacciones Hospedero Patógeno que me acompañaron y acompañan en todas las etapas de mi formación y de mi vida. A Malón por apoyar mi carrera desde el año 2009, apuntalar mi crecimiento científico y por estar disponible para hablar de ciencia o de la vida un agradecimiento muy especial. Y también a Gonzalo Greif, Gabriela Libisch y Andrés Cabrera por su apoyo y participación directa en el desarrollo y discusión de los experimentos de la tesis.
- Este trabajo fue desde un principio impulsado por la Dra. Yester Basmadján y el equipo del Departamento de Parasitología y Micología del Instituto de Higiene (Facultad de Medicina), especialmente Cristina Oviedo, Selva Romero y Telma González, ellas son las responsables de los aislamientos de transmisión vertical que protagonizan esta tesis. Les agradezco especialmente por compartir los aislados conmigo y por la colaboración fructífera que hemos sostenido durante muchos años. También agradecerles el trabajo exhaustivo de diagnóstico, seguimiento y tratamiento que realizan con las pacientes chagásicas y sus bebés.
- A Dinora Satragno y las demás personas que trabajan en el Centro Hospital Veterinario y el Área de Medicina Preventiva de Epidemiología de la Facultad de Veterinaria UdelaR, que protagonizan junto conmigo todo el trabajo en torno a *Leishmania infantum* que es parte de esta tesis.
- A las personas que integran la Unidad de Biotecnología en Animales de Laboratorio (ex UATE) por el mantenimiento y generación de las condiciones excepcionales en las cuales se trabaja en el bioterio. Especialmente a Paula Arévalo y Martina Crispo por enseñarnos el trabajo con animales de laboratorio e involucrarse directamente en la discusión y planificación de experimentos y resultados.
- Gracias a todas las personas que integran el Instituto Pasteur de Montevideo, al personal de apoyo, de servicios, administrativo y científico por contribuir al ambiente laboral en el día a día.

- A todas las personas que integran e integraron la Comisión de Género por los espacios de discusión y catarsis productiva durante todos estos años en cual crecí como científica pero también como persona. En este sentido, quiero agradecer muy especialmente a Victoria Prieto y Luisa Berná por la cercanía, ambas son científicas referentes para mí y amigas con las cuales he compartido muchos espacios de discusión y cariño que han sido fundamentales para poder llegar hasta acá.
- A las agencias financiadoras: Agencia Nacional de Investigación e Innovación por la Beca de Doctorado y el ingreso al Sistema Nacional de Investigadores. Comisión Académica de Posgrado de la UdelaR por la Beca de Finalización de posgrado. A las personas donantes y al Institut Pasteur de Montevideo por la creación de la Beca Dra. Paulina Luisi y a la red ERANET-LAC por financiar parte de este proyecto.
- Quiero agradecer a mi familia por ser y estar, desde el principio hasta el fin, este trabajo está dedicado a ellas y ellos. A mis amigas que también son mi familia por todos los espacios compartidos.

#### 4. PRÓLOGO

La representación a nivel global de mujeres en las áreas de conocimiento denominadas STEM (*Science, Technology, Engineering y Mathematics*) no supera el 29,3%<sup>1</sup>. En Latinoamérica y particularmente en las áreas de Ciencias Naturales, Médicas y de la Salud, y Agrícolas la representación es paritaria<sup>2</sup> pero no más alentadora. Las mujeres en ciencia enfrentamos desafíos diversos a lo largo de nuestra carrera, que la enlentece y en muchos casos nos empuja a la renuncia, como una especie de efecto Mateo<sup>3</sup> invertido donde causas y consecuencias se acumulan para impedir que alcancemos nuestro potencial. Esto es particularmente evidente en el acceso de mujeres a cargos de toma de decisiones y prestigio. Las gráficas en tijera de mayoría de mujeres en los primeros niveles y mayoría de hombres en los últimos, se observa y se repite en los diferentes sistemas científicos de categorización del mundo y de nuestro país: en el PEDECIBA, en la carrera docente de Udelar<sup>4</sup>, en el SNI<sup>5</sup> y, en el CSIC<sup>6</sup>. El censo de personas con nivel académico de doctorado reveló que el 80% de los hombres está de acuerdo con la afirmación “*las mujeres se enfrentan a barreras invisibles que les impide ascender profesionalmente*”, esta cifra asciende al 90% entre las mujeres consultadas<sup>7</sup>. Dentro de los motivos se identificaron: i) estereotipos de género que afectan la autovaloración y la valoración entre pares, ii) la coincidencia entre el ciclo de vida familiar y el ritmo de ascenso en la carrera profesional y, iii) la existencia de diferencias en los procesos de promoción en la carrera para hombres y mujeres<sup>6</sup>. En mi opinión, parte de las diferencias en los procesos de promoción y construcción de carrera contiene el hecho de que muchas veces ocurre en ámbitos de confraternización social de los cuales las mujeres han estado históricamente excluidas, ya sea por esencia o por consecuencia de la distribución desigual del trabajo no remunerado extra horario.

---

<sup>1</sup> Datos del Instituto de Estadística de la UNESCO, 2019.

<sup>2</sup> Informe: “Las mujeres en ciencias, tecnología, ingeniería y matemáticas en América Latina y el Caribe”. Publicación: ONU Mujeres, 2020. Autor: Alessandro Bello.

<sup>3</sup> Efecto Mateo (Robert K. Merton respecto a producción científica): refiere a que un autor con más experiencia acreditada ve más favorecidas sus publicaciones que un recién llegado. Mario Bunge dice que esto es atribuible a un efecto “memorístico” en donde se retiene más fácilmente en la memoria al autor más conocido que al menos conocido y también se deposita mayor confianza en el primero.

<sup>4</sup> <https://www.gub.uy/ministerio-industria-energia-mineria/comunicacion/publicaciones/mujeres-ciencia-tecnologia-innovacion-uruguay>

<sup>5</sup> Informe 2018 de Claves para el desarrollo: Más mujeres en Ciencia, tecnología, ingeniería y matemática. <https://www.anii.org.uy/institucional/documentos-de-interes/26/informe-mesa-interinstitucional-de-mujeres-en-ciencia-tecnologia-e-innovacion/>

<sup>6</sup> [http://mujeresconciencia.com/app/uploads/2020/07/informe\\_mujeres\\_investigadoras-2020.pdf](http://mujeresconciencia.com/app/uploads/2020/07/informe_mujeres_investigadoras-2020.pdf)

<sup>7</sup> Censo de doctores <https://www.colibri.udelar.edu.uy/jspui/bitstream/20.500.12008/22319/1/DT%20UM-PP%2003.pdf>

En el Institut Pasteur de Montevideo, el 55% de la población general son mujeres, sin embargo el 80% de investigadores principales son hombres. El diagnóstico realizado por el Comité de Calidad con Equidad de Género del Instituto, en el marco del Modelo de Calidad con Equidad de INMujeres, constató que las mujeres experimentan un estancamiento en el nivel de maestría (equivalente con mayores dificultades con alcanzar el nivel de doctorado), una brecha de género en la media de salarios del 26% (a igual cargo, las mujeres ganan 26% menos) e inequidades en los montos otorgados por complemento salarial (los hombres perciben complementos de mayor monto que las mujeres)<sup>8</sup>. Considero fundamental que como individuos, parte de una pequeña comunidad científica, cuestionemos nuestra contribución individual a los fenómenos descritos. Como sociedad (padres, abuelos, jefes, colegas, etc.) debemos asumir el costo que tienen la maternidad y los cuidados (los cuidados son comunales o no son), y entender que representan uno solo de los muchos motivos detrás de las inequidades. Estos motivos se suman otras fuerzas desproporcionadas (muchas de ellas desigualdades sistémicas) que impactan nuestras carreras de manera significativa, entre ellos, los estereotipos de género, los sesgos inconscientes, las situaciones de acoso, el tiempo invertido en construcción de conciencia y justicia sin valoración académica, entre otras.

El panorama descrito se complejiza y profundiza para personas pertenecientes a minorías raciales y miembros de la comunidad LGTBI+, y es de particular importancia pensar estos fenómenos a la luz de la interseccionalidad<sup>9</sup>. Estas reflexiones y la necesidad de visibilizarlas han sido parte de mi desarrollo personal de esta etapa doctoral. En 2017, cuando volví de la licencia maternal, comencé a integrar formalmente la Comisión de Género del Institut Pasteur. Los cometidos de la Comisión y el grupo humano formado, me han estimulado a reconocer mis propios privilegios como mujer blanca, heterosexual, universitaria, con salario fijo y en función de su vocación; y también a ver desigualdades diarias que erosionan nuestro potencial académico. Durante el transcurso de mi formación de posgrado me he desempeñado como Asistente Técnica en el Laboratorio de Interacciones Hospedero Patógeno - Unidad de Biología Molecular del Institut Pasteur de Montevideo. He desarrollado una carrera profesional que me ha llevado a jugar un rol clave en el laboratorio, colaborando constantemente en todas las líneas de investigación que se desarrollan y en el funcionamiento general. He intentado no abandonar las líneas de investigación propias, aunque en algunos momentos éstas

---

<sup>8</sup> Diagnóstico CCEG, Institut Pasteur de Montevideo.

<sup>9</sup> Concepto utilizado en sociología que hace referencia a la superposición de factores sociales como pueden ser raza, género, identidad sexual. Por ejemplo, mujer trans afrodescendiente)

han perdido el protagonismo deseado sumando al rezago de mi carrera. Desde la defensa del proyecto de doctorado en 2015 transité por varios temas antes de encontrar el que se desarrolla en esta tesis, y el embarazo y nacimiento de mi hija significó la postergación de experimentos al menos durante año y medio (por la contraindicación de manipulación de patógenos de bioseguridad tipo 2 y de la medicación profiláctica durante embarazo y lactancia).

El impacto de la pandemia de COVID-19 también debe ser considerado. Más del 70% de la fuerza global de cuidados de la salud son mujeres, y es justo mencionar que colectivos (con mayoría abrumadora de mujeres) como el personal de enfermería, cuidados en primera infancia y maestras han sostenido un papel protagónico (heroico) en el combate a la pandemia. Como ejemplo de lo expuesto, mediciones recientes muestran que la pandemia está impactando desproporcionadamente en la producción de mujeres científicas reduciéndolas al menos a la mitad<sup>10</sup>. Los países liderados por mujeres están teniendo el mejor resultado en combate a la pandemia<sup>11</sup>, sin embargo, de las personas expertas en COVID-19 que son citadas en los medios de prensa, solo el 24% son mujeres<sup>12</sup>. Adicionalmente, el cierre de escuelas y la interrupción de servicios de cuidados y otros, aumenta el peso de trabajo no remunerado que desproporcional e históricamente recae sobre las mujeres. Ni que hablar que las situaciones de violencia intrafamiliar (que afectan mayoritariamente a mujeres, niñas y niños) han aumentado significativamente con el confinamiento<sup>13</sup>. En el Instituto reconvertimos actividades y durante tres meses, en nuestro laboratorio nos dedicamos exclusivamente a la detección de SarsCoV-2, con medidas de restricción respecto a la presencialidad y ejecución de proyectos no COVID durante al menos un año.

Llegado el final de esta etapa doctoral, mi tesis abarca dos parásitos circulantes en Uruguay y de importancia en la salud pública. Por un lado el aislamiento y caracterización de las cepas de *Leishmania infantum* responsables del primer brote autóctono de Leishmaniasis Visceral Canina ocurrido en febrero de 2015 en Uruguay (que llevó a casos de Leishmaniasis Visceral Humana), cuyos resultados

---

<sup>10</sup> Andersen JP, Nielsen MW, Simone NL, Lewis RE, Jaggi R. Meta-research: is Covid-19 amplifying the authorship gender gap in the medical literature? asXiv 2020 published online May13 DOI:abs/2005.06303 (preprint).

<sup>11</sup> Hassan J, O'Grady S. Female world leaders hailed as voices of reason amid the coronavirus chaos. April 20,2020. <https://www.washingtonpost.com/world/2020/04/20/female-world-leaders-hailed-voices-reason-amid-coronavirus-chaos/>.

<sup>12</sup> Rajan D, Koch K, Roher K, et al. Governance of the covid-19 response: a call for more inclusive and transparent decision-making. BMJ Global Health 2020 5:e002655.

<sup>13</sup> <https://www.nytimes.com/2020/04/06/world/coronavirus-domestic-violence.html>



fueron publicados en 2017 en *Emerging Infectious Disease* y en 2020 en *RSC Medicinal Chemistry*. Ambas publicaciones forman parte de este trabajo tesis. Por otro lado, la caracterización de cepas de *Trypanosoma cruzi* de casos de Chagas Congénito que se han transmitido verticalmente por al menos tres generaciones. Un manuscrito con los resultados de esta parte de la tesis está en este momento en preparación. Es por esto que hemos decidido con mi tutor Dr. Carlos Robello y, alineados a la sugerencia de la Comisión de Admisión y Seguimiento (Dra. Lucía Piacenza y Dr. Juan Arbiza), desarrollar en el cuerpo del presente documento el trabajo aún no publicado de *T. cruzi* y presentar en formato de breve resumen el trabajo de *L. infantum* junto con las publicaciones correspondientes.

## PRIMERA PARTE:

### Caracterización de aislados de *Leishmania infantum* circulantes en Uruguay

#### 5. RESUMEN Y PRINCIPALES RESULTADOS Y CONCLUSIONES

Las leishmaniasis son un conjunto de enfermedades desatendidas causadas por parásitos protozoarios del género *Leishmania* que se encuentran presentes en 98 países en los 5 continentes. La leishmaniasis visceral, la manifestación clínica más grave de la enfermedad, es mortal en el 95% de los casos si no es tratada y es principalmente causada por la especie *Leishmania infantum*. En Uruguay en 2010, se registró por primera vez la presencia del principal vector de *L. infantum*, el flebótomo *Lutzomyia longipalpis*, en 2015 se reportaron los primeros casos de leishmaniasis visceral canina, en 2017 el primer caso de leishmaniasis visceral humana y en 2018 se registró el primer fallecimiento por *L. infantum* en el país. Nuestro laboratorio realizó, en el marco de una colaboración con el Departamento de Parasitología del Instituto de Higiene y Facultad de Veterinaria, la identificación molecular de la especie y el aislamiento de varias cepas circulantes durante el brote canino en 2015. También realizamos una caracterización primaria encontrando susceptibilidad diferencial a los fármacos de uso clínico entre cepas de referencia y los aislados del brote uruguayo. Los resultados obtenidos indican que el crecimiento de la forma promastigota de las diferentes cepas es similar, pero las cepas aisladas por nosotros tienen una infectividad en macrófagos humanos aumentada con respecto a la cepa brasileña y también en términos de la velocidad de replicación. Las cepas presentan susceptibilidad equivalente a los fármacos miltefosina y nifurtimox pero una diferencia significativa en los valores de IC<sub>50</sub> de anfotericina B, 6,5µg/ml para la cepa de referencia y del orden de 24µg/ml para nuestros aislados. Los resultados obtenidos se detallan en dos publicaciones de las cuales son primer autora (en una comparto la primera autoría con la Dra. Satragno) y se encuentran adjuntas a continuación como parte esta tesis doctoral.

#### 6. ARTICULOS PUBLICADOS EN EL MARCO DE ESTA TESIS

Artículo 1: “Autochthonous outbreak and expansion of Canine Visceral Leishmaniasis, Uruguay” publicado en *Emerging infectious disease* en 2017.

Artículo 2: “*Leishmania infantum* isolates exhibit high infectivity and reduced susceptibility to amphotericin B” publicado en *RSC Medicinal Chemistry* en 2020.

## SEGUNDA PARTE:

### Los aislados de *Trypanosoma cruzi* adaptados a la infección congénita muestran una estrategia única de transmisión vertical

## 7. RESUMEN

### 7.1. Resumen en español

*Trypanosoma cruzi* es el agente causal de la enfermedad de Chagas, una enfermedad desatendida que afecta aproximadamente a unos 8 millones de personas en el mundo. La cronicidad de la patogénesis le confiere el carácter de enfermedad “silenciosa”. En zonas no endémicas (incluyendo zonas endémicas con control vectorial exitoso), la forma más importante de transmisión es la vertical de madre infectada al feto. El Chagas Congénito se considera que es responsable de al menos un cuarto de los nuevos casos, y en nuestro país es la única forma de transmisión activa. Las altas tasas de transmisión vertical (TV) en regiones no endémicas han llevado a postular un efecto de adaptación y perfeccionamiento de algunas cepas a esta forma de transmisión. Para este trabajo se aislaron y estudiaron tres cepas de bebés con Chagas Congénito que se han transmitido verticalmente al menos por tres generaciones con presentación asintomática. Durante la caracterización, se determinó que las mismas se comportan similar en modelo ratón, tienen baja virulencia y capacidad disminuida de realizar el ciclo completo *in vitro*. En infecciones en ratones se observó que son capaces de inducir una respuesta inmune protectora y de transmitirse verticalmente con mayores frecuencias que otras cepas diferentes respecto al origen y a la virulencia, los aislados también presentaron mayor tropismo por trofoblasto humano en experimentos *in vitro*. Al estudiar la respuesta de las placentas de ratonas infectadas con los aislados de transmisión vertical, observamos que se encuentran diferencialmente expresados solamente 10% de los genes cuando se compara con la infección con una cepa virulenta. Esta modulación involucra como cambio principal la supresión de genes de división y replicación celular, generando un estado placentario de arresto celular y silencioso en términos de respuesta inmune. Esta respuesta placentaria difiere totalmente con la respuesta inducida por cepas virulentas generando imágenes especulares en torno a la inducción/supresión de genes, y para las cuales los cambios principales se acumulan en la inducción de genes de respuesta inmune. Las características descritas para los aislados de transmisión vertical (TV), evidencian un cambio respecto a sus antecesores y una

adaptación a la transmisión vertical que posiblemente involucre el estado silencioso, en este trabajo se describe una estrategia novedosa de adaptación a la transmisión vertical y posiciona a los aislados de TV como modelos naturales ideales de gran interés para el trabajo en torno a esta enfermedad.

## 7.2. Resumen en inglés

*Trypanosoma cruzi* is the etiological agent of Chagas disease, a neglected disease that affects approximately 8 million people around the world. The chronicity of the pathogenesis gives the quote of “silent disease”. In non-endemic areas (including those with successful vector control programs), the most important form of transmission is the vertical route from infected mother to the fetus. Congenital Chagas accounts for at least one quarter of new cases, and in our country is the only active route of transmission. The high rates of vertical transmission in non-endemic areas has led to postulate strain adaptation to this form of transmission. In this work we have isolated and studied three *T. cruzi* strains whose origin are babies that acquired the infection at least from their grandmothers through their mothers that have in all cases asymptomatic presentations of the disease. During the characterization, it was determined that they have a similar behavior in mice showing low virulent profile, and an impaired epimastigogenesis *in vitro*. In mice infections we observed that the strains are able to induce a protective immune response and to be vertically transmitted with more frequencies than other strains that are different in terms of their origin and virulence, this is accompanied by a higher tropism to human trophoblast derived cells. When we studied the placental response to infection, we observed that whereas Garbani-derived placentas modulate the expression of approximately 3000 genes, VT strains modulate only 300. The latter involves as main changes suppression of genes belonging to cell division and replication, generating an arrest and silent state in terms of immune response. This response differs completely to those found for virulent strains, which are mainly characterized by the upregulation of genes associated with inflammation and immune response. The described characteristics of the VT isolates display substantial differences from their ancestors and adaptation to vertical transmission that possibly involves the silent state they induce. In the present work we describe a novel strategy of vertical transmission and postulates the VT isolates as natural models of great interest to address Congenital Chagas biology.

## 8. INTRODUCCIÓN

### 8.1. Enfermedad de Chagas

La enfermedad de Chagas es una enfermedad desatendida que afecta principalmente a personas que viven por debajo de la línea de pobreza en condiciones inadecuadas de vivienda, agua y saneamiento en 21 países de Latinoamérica y en el sur de Estados Unidos, en donde esta enfermedad es endémica. Con 28000 nuevos casos al año aproximadamente y 8000 recién nacidos infectados durante la gestación, la enfermedad de Chagas afecta entre 6 y 8 millones de personas, aparte de los 70 millones que viven en situación de riesgo de contraer la enfermedad [1, 2]. El tratamiento es insatisfactorio y está asociado a severos efectos secundarios que aparecen en el 40% de los pacientes tratados con benznidazol o nifurtimox. *Trypanosoma cruzi*, el parásito causante de la enfermedad, se desarrolla de manera lenta en los humanos con una etapa aguda breve seguida por una etapa crónica que durará el resto de la vida del individuo [3]. De los pacientes que cursan la forma crónica, hasta un 30% presentará alteraciones cardíacas y hasta un 10% alteraciones digestivas, neurológicas o combinadas de diverso grado que necesitaran tratamiento específico [1, 4]. En Latinoamérica, la enfermedad de Chagas es la principal causa de cardiopatía y muerte debido a enfermedades cardiovasculares [5]. La cronicidad de la patogénesis le confiere el carácter de enfermedad “silenciosa” lo cual en su momento fue la causa del retraso en las iniciativas de control por parte de la salud pública. Como resultado, la enfermedad está asociada a un altísimo costo social en todo el mundo, y contribuye significativamente al gasto mundial en salud con montos comparables a los que tienen enfermedades como el cáncer de útero o cáncer oral [6]. La prevalencia global de esta enfermedad se muestra en la Figura 1.

El perfil epidemiológico global de la enfermedad de Chagas es el resultado de varias fuerzas. En zona endémica es la exposición sostenida al vector domiciliado y la migración en masa desde zonas rurales a zonas urbanas; en zonas no endémicas (Estados Unidos, Canadá, Europa, Australia and Japón) es la combinación de la migración de personas infectadas junto a la ausencia de control en bancos de sangre, donantes de órganos y embarazadas [7, 8]. En Europa se estima viven entre 68000 y 120000 personas infectadas con *T. cruzi* y que el 90% se mantienen sin diagnóstico debido a la ausencia de síntomas y al

desconocimiento de la enfermedad por parte de los sistemas de salud [9, 10]. La enfermedad de Chagas es en sus orígenes una enfermedad transmitida por vectores, pero los eventos descritos anteriormente han cambiado radicalmente el perfil epidemiológico, y la han convertido en una enfermedad urbana y una preocupación de salud global [11, 12].

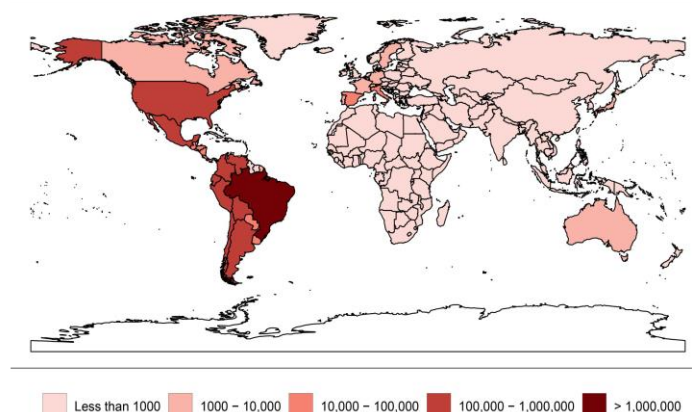


Figura 1. Prevalencia global de la enfermedad de Chagas.

Respecto a la situación en nuestro país, Uruguay alcanzó sus valores endémicos más altos en las décadas de los 40 y 50, y en 1997 fue el primer país en interrumpir la transmisión vectorial por control programático de *Triatoma infestans*, declarándose en 2013 país libre de su principal vector [13]. La transmisión transfusional ha sido controlada desde 1985 mediante tamizajes universales en los bancos de sangre y se ha reportado un solo caso por trasplante de órganos [14]. Aun así, existen entre 8000 y 10000 personas infectadas por *T. cruzi* en Uruguay [13]. La única forma de transmisión activa en nuestro país es la transmisión vertical de madre infectada al feto por vía transplacentaria, la cual ocurre entre el 1% y 12% de los embarazos de madres que cursan la enfermedad [15]. El *screening* serológico a embarazadas de todo el país es de carácter obligatorio (Ordenanza N° 1119/2018) aunque todavía está en fase de implementación. Estimativos de la OPS indican que se registrarían en Uruguay entre 20 y 40 casos anuales [16].

## 8.2. Quimioterapia y vacunas

El tratamiento actual de la enfermedad se basa en dos fármacos nitroheterocíclicos, el derivado nitrofurano nifurtimox (Nfx, comercialmente Lampit®

de Bayer, recientemente discontinuado) y el nitroimidazol benznidazol (Bzn, comercialmente Rochagan® de Roche, actualmente producido por LAFEPE, Brasil). Estos fármacos fueron descubiertos empíricamente hace más de 4 décadas. El tratamiento presenta hasta un 80% de curas parasitológicas cuando es administrado durante la fase aguda. Sin embargo, el 80% de los pacientes en fase crónica no se cura con el mismo tratamiento [17]. En el aspecto clínico, algunos estudios observacionales han señalado que en pacientes con Chagas crónico sometidos al tratamiento con Bzn no se obtiene una cura parasitológica, pero sí presentan una disminución significativa en la progresión a la miocardiopatía y menor frecuencia en el deterioro de su condición clínica chagásica [18]. Ambos fármacos han sido asociados a severos efectos secundarios que aparecen en el 40% de los pacientes tratados [19]; por otra parte el tratamiento está contraindicado para pacientes con algún grado de falla renal, individuos con historia clínica de enfermedades neurológicas o siquiátricas y mujeres embarazadas.

Actualmente las medidas de control de la enfermedad de Chagas recaen sobre la quimioterapia y la prevención. La eficacia de una vacuna profiláctica está incluso en discusión conceptual, puesto que las re infecciones son posibles y *T. cruzi* es capaz de demorar y modular la respuesta inmune y de convivir y sobrevivir a ella [20]. Varios prototipos de vacuna están actualmente en fase de desarrollo, entre ellas vacunas con antígenos recombinantes, vacunas de ADN, péptidos, vectores adenovirales y varias a parásitos vivos atenuados ya sea por pasajes en cultivo o utilizando ingeniería genética [21], estas últimas han mostrado ser muy eficaces en lograr el control de la infección [22, 23].

### 8.3. *Trypanosoma cruzi* y ciclo de vida

*Trypanosoma cruzi*, el agente etiológico de la Enfermedad de Chagas, es un protozooario perteneciente al orden *Kinetoplastidae*, familia *Trypanosomatidae*, género *Trypanosoma*, subgénero *Schizotrypanum*. El Orden *Kinetoplastidae* está definido por la presencia de una mitocondria única en la cual se encuentra una estructura de ADN compactado que se denomina kinetoplasto. A este orden pertenecen organismos de vida libre y organismos parásitos, los tripanosomátidos (familia *Trypanosomatidae*) son exclusivamente parásitos. *T. cruzi* tiene la capacidad de infectar una amplia variedad de tipos celulares y es capaz de infectar una gran variedad de mamíferos. Tiene un ciclo de vida complejo que transcurre entre un insecto vector y un hospedero vertebrado y alterna entre cuatro formas

biológica y morfológicamente diferentes: tripomastigotas metacíclicos, amastigotas, tripomastigotas celulares y epimastigotas. Durante el ciclo de vida del parásito que se muestra en la

Figura 2, un insecto infectado deposita heces conteniendo la forma **tripomastigota metacíclico** (forma infectiva, no replicativa, flagelada) en el hospedero mamífero. La infección se produce cuando las heces son arrastradas hacia la picadura u otra lesión cutánea abierta. De esta forma los tripomastigotas penetran las células locales y se transforman en **amastigotas** (forma intracelular, replicativa, redondeada y sin flagelo). Luego de varios ciclos replicativos los amastigotas se transforman a **tripomastigotas celulares** que lisan la célula y son liberados al torrente sanguíneo e infectan nuevas células, quedan en el torrente sanguíneo o colonizan el tejido muscular o nervioso y forman nidos de amastigotas. Nuevos insectos ingieren los parásitos al alimentarse de sangre infectada, y en el tracto digestivo medio de estos insectos los parásitos viran a **epimastigotas** (forma replicativa no infectiva) a través de un proceso denominado epimastigogénesis en el cual los parásitos pasan por estadios intermedios entre ellos **esferomastigotas** (círculo amarillo de la

Figura 2). En el tracto digestivo medio, los epimastigotas aumentan en número para luego, al alcanzar el recto, virar a tripomastigotas metacíclicos infectivos y de esa manera comenzar el ciclo otra vez.

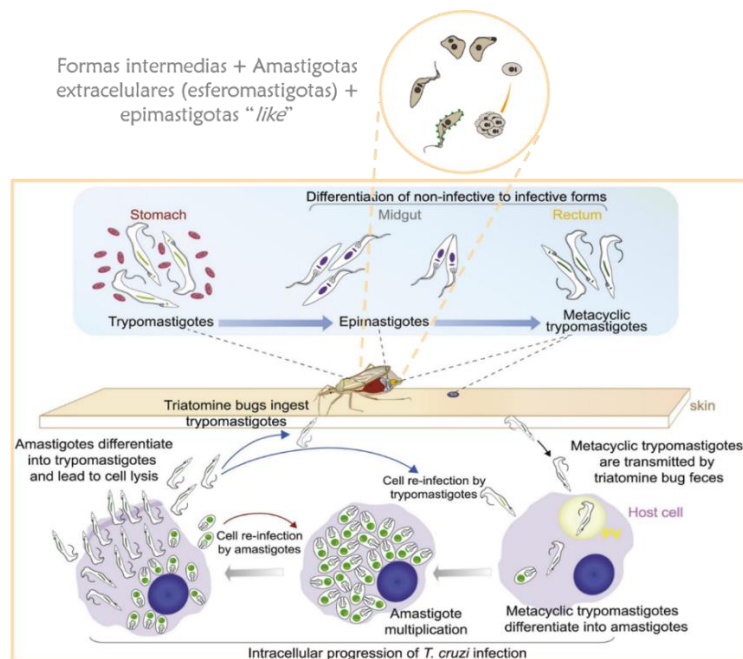


Figura 2. Ciclo de vida de *Trypanosoma cruzi*



---

Tomado de Nilmar Silvio Moretti, Renato Arruda Mortara, y Sergio Schenkman (2019). *Trypanosoma cruzi*. *Trends in Parasitology, Parasite of the month*.

---

Este parásito también presenta una inusual arquitectura genómica y una diversidad genética que ha dificultado el consenso científico respecto a la clasificación dentro de la especie. Los genes en múltiples copias (aislados o en tandems e intra o inter cromosoma), la organización en unidades policistrónicas de transcripción de los mismos, la enorme cantidad y diversidad de elementos repetidos dispersos, el alto contenido de ADN satélite y la existencia de distinta cantidad de cromosomas entre las distintas cepas, son algunos ejemplos de la complejidad del genoma altamente plástico de éste parásito [24-26]. Se han propuesto un total de seis grupos filogenéticamente distintos, cuatro no híbridos y dos híbridos denominados DTUs del TcI al TcVI por su sigla en inglés (*Discrete Typing Units*) [27, 28]. El origen y las relaciones entre los distintos DTUs se han intentado explicar utilizando distintas metodologías y modelos evolutivos pero no con mucho éxito [29, 30]. Sin embargo, los diferentes DTUs muestran diferentes distribuciones en América y están asociadas a diferentes formas de transmisión: selvática (TcII, TcV y TcVI) y doméstica (TcIII y TcIV); TcI es la que tiene mayor distribución en América tanto en humanos como en mamíferos y se asocia a ambos tipos de transmisión. En la literatura se sugiere que hay un vínculo entre la diversidad genética (polimorfismos y diferencias morfológicas durante el ciclo de vida) y la capacidad del parásito para evolucionar y adaptarse a nuevos hospederos en la naturaleza [31, 32]. Recientemente nuestro grupo ha propuesto, en base a análisis filogenéticos de los maxicírculos completos y más 1108 secuencias de genes nucleares únicos de 29 cepas distintas, que *T. cruzi* es un complejo de especies con dos grupos parentales: el grupo 1 contiene los clados A (TcI), B (TcIII) y D (TcIV) y grupo 2 que contiene el clado C (TcII), siendo las especies híbridas del tipo BC (TcV y TcVI). También se describen 3 tipos de maxicírculos a, b y c que se corresponden a los clados A, B y C respectivamente, y el clado D contiene maxicírculos del tipo b [33]. En este trabajo se propone el uso de una nueva nomenclatura que efectivamente refleje las relaciones evolutivas existentes dentro del complejo *T. cruzi* y un esquema de la misma se muestran en la Figura 3.

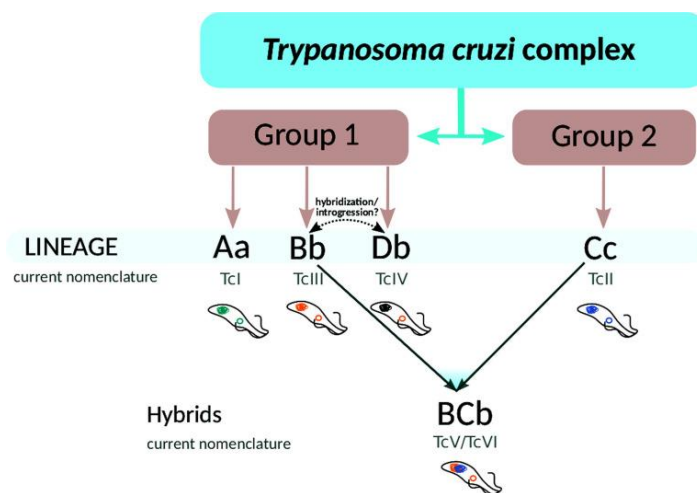


Figura 3. Relaciones evolutivas del complejo *Trypanosoma cruzi*

El complejo está compuesto de dos grupos principales que se dividen a su vez en los linajes A, B y D (Grupo 1) y C (Grupo 2). Las letras minúsculas representan la variante de maxicirculo presente en cada linaje. Tomado de Berna L, et al. *Plos Neg Dis* 2021 [33].

#### 8.4. Transmisión vertical de *Trypanosoma cruzi*

Las formas de transmisión de *T. cruzi* consideradas ancestrales y que ocurren tanto en animales como humanos son dos: la transmisión vectorial y la transmisión vertical de madre a feto (Figura 4). Dentro de la vectorial se encuentran la forma fecal, que es a través de las heces del vector y la forma oral que se da por ingesta de los parásitos, ya sea del insecto infectado (animales insectívoros) o alimentos contaminados (humanos). Las otras formas de transmisión son minoritarias y dependientes de actividades humanas: transmisión transfusional, por trasplante de órganos y accidentes de laboratorio. En zonas no endémicas y en zonas endémicas con control vectorial exitoso, la transmisión vertical es la más relevante. Se estima que 1,8 millones de mujeres en edad reproductiva están infectadas con *T. cruzi* en Latinoamérica, la prevalencia de la infección en mujeres embarazadas va desde el 1% al 40%, y las tasas de TV van desde el 1 y 12% según el área [15], con una frecuencia media del 5% [34]. En estimaciones recientes se indica que por año, aproximadamente 8000 bebés nacen congénitamente infectados en Latinoamérica y 2000 en Estados Unidos [35]. La transmisión puede repetirse en cada embarazo de una mujer infectada durante todo su período fértil e independiente si se encuentra en la fase aguda o crónica de la enfermedad. Debido a que este tipo de transmisión no puede ser prevenida, el control debe estar enfocado en el diagnóstico y tratamiento temprano [36, 37]. El diagnóstico es complejo, involucra protocolos multipunto con técnicas directas (microhematocrito y xenodiagnóstico), la serología está descartada debido al pasaje de anticuerpos

maternos y la PCR no se ha universalizado, aunque se está comenzando a discutir su implementación [38]. La mayoría de mujeres embarazadas con enfermedad de Chagas son asintomáticas, al igual que su descendencia [34], si bien entre un 10 y 20% presentan síntomas no específicos como bajo peso al nacer, prematuridad, alteraciones hematológicas y manifestaciones clínicas típicas de la enfermedad [39]. El tratamiento con Bzn mostró la eliminación del parásito entre el 60 y 85% de los niños tratados y de 90% en el caso de bebés infectados congénitamente [40, 41], aunque la eficacia del tratamiento disminuye a medida que la edad de los pacientes pediátricos aumenta. La falta de tamizaje en mujeres en edad reproductiva y las contraindicaciones de los fármacos utilizados imposibilitan el tratamiento durante el embarazo y por tanto la interrupción de la TV.

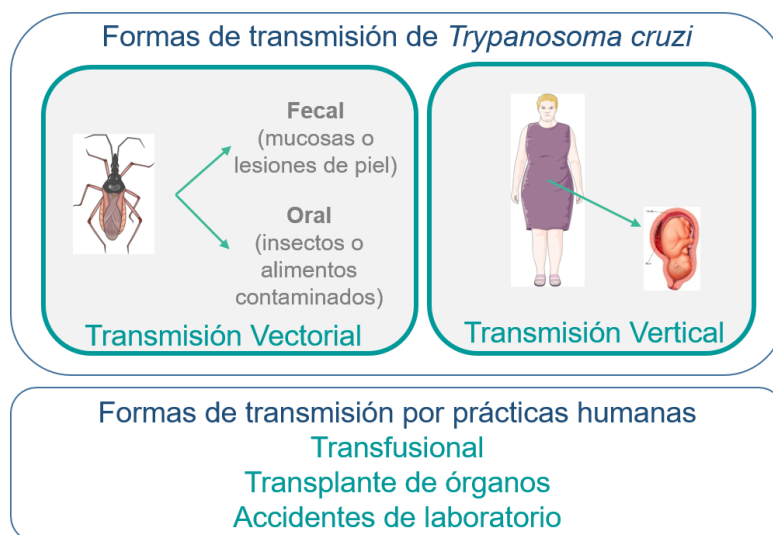


Figura 4. Formas de transmisión de la Enfermedad de Chagas

Las formas de transmisión ancestrales son dos: vectorial y vertical, ambas ocurren en animales y humanos mientras que las formas minoritarias: transfusional, transplantes y accidentes de laboratorio, ocurren debido a actividades humanas.

La fisiopatología de la infección congénita es desconocida y la información sobre los mecanismos celulares y moleculares detrás de la infección transplacentaria aún no están dilucidados [42], pero son las distintas características de la tríada parásito-madre-feto las que impactan directamente en los distintos resultados. Se ha sugerido que la carga parasitaria materna es un factor clave: estudios poblacionales describen que hay mayor parasitemia en madres chagásicas en las que ocurre la transmisión que en las que no [43, 44]; la tasa de transmisión aumenta

drásticamente en bebés nacidos de madres con infección aguda, reinfecciones o reactivaciones (mayor carga parasitaria) [45], y también se ha observado que el tratamiento con benznidazol en mujeres en edad reproductiva disminuye la probabilidad de transmisión congénita [46]. Por otro lado, estudios poblacionales muestran que la tasa de transmisión congénita aumenta en bebés con hermanos/as positivas y en bebés cuyas abuelas son positivas [47], estos datos refuerzan la teoría del “*cluster effect*” en donde se postula especialización y adaptación de cepas a la transmisión vertical (lo cual ocurre en zonas no endémicas que presentan altas tasas de transmisión congénita) [48]. La acumulación familiar de casos de Chagas congénito [48, 49], también ha llevado a estudiar polimorfismos del genoma humano que favorecen el pasaje transplacentario como por ejemplo polimorfismos de los genes de metaloproteasas *mmp2* y *adam12* [50]. La respuesta inmune también es un factor importante, se sabe que hay una respuesta inmune inflamatoria intensa en mujeres embarazadas que cursan una infección aguda y crónica, y también se sabe que el contexto inflamatorio está reducido en los casos en donde ocurre la transmisión congénita (revisado en [51]). En madres con una producción defectuosa de interferón gamma, los parásitos alcanzan con mayor probabilidad a los fetos [44] y recientemente se ha publicado un trabajo exhaustivo en donde se postulan distintos mediadores inmunológicos de la transmisión congénita, puesto que se han visto modulados de manera diferencial entre madres que no transmiten y las que sí, postulando que en estas últimas hay prevalencia de respuesta del tipo *th2* que inhibe la respuesta *th1* necesaria para impedir el pasaje transplacentario de los parásitos [52]. En aquellos casos de madres chagásicas con inmunosupresión severa por HIV la tasa de transmisión congénita es del 100 % [45].

En áreas endémicas las tasas de transmisión congénita son más altas que en zonas no endémicas, y en principio esto puede deberse a que las altas exposiciones al vector aumentan la carga parasitaria en sangre de las mujeres embarazadas, si bien se ha observado que mujeres con alta exposición a vectores infectados tienden a tener menos carga parasitaria que mujeres que viven en casas con programas activos de control vectorial (Revisado en [15]). Estas observaciones pueden deberse por un lado a que mujeres con alta exposición a vectores infectados tienen una inmunidad más eficiente, y por otro lado con que en zonas no endémicas o con control vectorial activo, esté ocurriendo un proceso de selección de cepas que se han vuelto más eficientes en el pasaje transplacentario (el ya mencionado “*cluster effect*”). En el contexto en que “*la virulencia del parásito puede reflejar su*

*forma de transmisión*” (traducción de [53]), si las manifestaciones severas de una enfermedad interfieren con su transmisión, formas más benignas se seleccionarán, y en el caso de la transmisión vertical las presentaciones asintomáticas asegurarían el bienestar reproductivo de las hospederas [54]. Esto se ha postulado para *T. cruzi* en donde cepas menos virulentas alcanzan con mayor frecuencia la placenta [55], y se puede pensar que la evolución desde la transmisión vectorial a la transmisión vertical también estaría acompañada de protección contra parásitos más virulentos y así prevenir que se afecte el bienestar general y reproductivo de la hospedera [56].

### 8.5. Placenta, pasaje transplacentario y estudios transcriptómicos

La placenta es un órgano materno-fetal temporario y extra embrionario responsable del intercambio de gases y nutrientes entre la madre y el feto, y también es responsable de la protección del feto dentro del útero [57]. Como uno de los órganos más divergentes a nivel evolutivo, la placenta humana ha sido históricamente muy difícil de estudiar debido a la ausencia de modelos experimentales funcionales, reproducibles y extrapolables [58]. La clasificación de la placenta según la estructura histológica y nivel de invasión es la más útil para entender la relación entre el corion, que es la porción fetal de la placenta y el endometrio que es la parte materna y que en la placenta madura será la decidua (Figura 5). Las diferentes formas son: a) **epitelicorial**, el corion toca ligeramente el endometrio pero no lo penetra (caballos, cerdos y rumiantes), b) **endoteliocorial**, el corion entra en el endometrio sin llegar a tocar los vasos sanguíneos de la madre (placenta típica de carnívoros) y c) **hemocorial**, todas las capas de tejido materno desaparecen y se establece una conexión directa entre el endometrio y el corion con estrecho contacto con los vasos sanguíneos maternos, y se dividen en hemomonocorial (primates), hemodicorial (conejos) y hemotricorial (ratas y ratones) según si tienen una, dos o tres capas de trofoblasto entre el corion y el endometrio respectivamente [59].

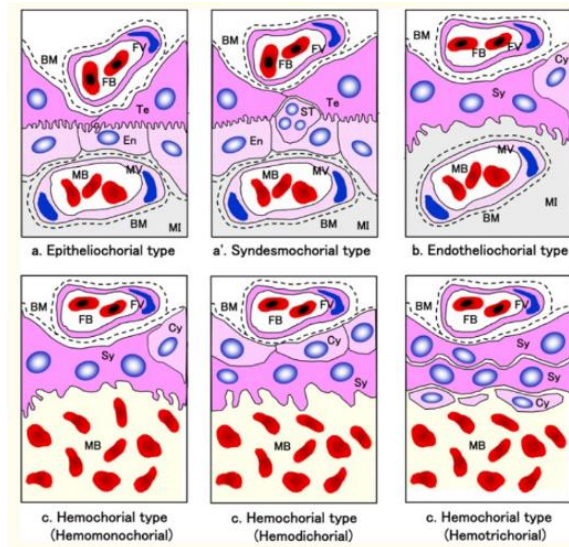


Figura 5. Tipos de placenta

Clasificación de las placentas según su relación con el corion (porción fetal) y el endometrio (porción materna). Tomada de Furukawa S, et al. *J. Toxicol Pathol* 2014.

La unidad funcional placentaria es la vellosidad coriónica, en ella ocurre el contacto estrecho entre la sangre materna y la sangre fetal y en la Figura 6 se muestra un corte transversal. La sangre materna baña el espacio intervelloso (IVS) y contacta con una sola capa continua de sinciotrofoblasto (ST) y una sola de citotrofoblasto (CT) que es discontinua luego la lámina basal (BL) y los capilares fetales (FC), estas son las capas celulares que *T. cruzi* debe atravesar para alcanzar al feto (Figura 6). Experimentos *in vitro* en explantes de placenta humana han revelado que altas cargas parasitarias destruyen el tejido trofoblástico [60] y por el contrario, bajas cargas parasitarias inducen proliferación celular y diferenciación [61, 62]. Este parásito está equipado con moléculas que pueden adherirse a componentes de la matriz extracelular [63, 64] y con proteasas potentes capaces de desorganizarla [62, 64, 65]. Estos cambios inducen la expresión de citoquinas y con ellas la respuesta inflamatoria que al contrario de eliminar el parásito, contribuyen al escape del sistema inmune y su avance a través de la interfase materno-fetal [66]. Es importante mencionar que la mayoría de estudios de infección en tejido derivado de placenta humana han utilizado cepas de *T. cruzi* adaptadas por largos períodos de tiempo al crecimiento de laboratorio o aislados recientes que presentan alta virulencia [67-69]. Observaciones realizadas por diferentes grupos de investigación sugieren que la transmisión vertical está asociada al tropismo del parásito por la placenta y, como fue mencionado, al contexto genético materno y fetal que faciliten el pasaje.

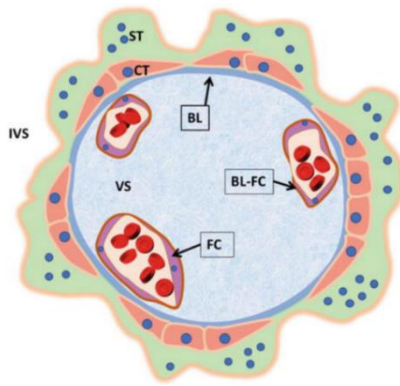


Figura 6. Representación esquemática de una vellosidad coriónica.

La unidad funcional placentaria que contacta la sangre materna con la sangre fetal.

Tomado de Castillo C, et al 2017.

Dentro de los modelos placentarios tradicionalmente utilizados podemos mencionar células trofoblásticas inmortalizadas, ya sea derivadas de coriocarcinoma como BeWO [70], JAR [71] y JEG-3 [72], o inmortalizadas *in vitro* como HTR8/SVneo [73], SGHPL-5 [74] y más recientemente SWAN-71 [75]. Estas líneas celulares representan una herramienta valiosa dado que son fáciles de obtener y de cultivar, pero poseen cariotipos anormales con correlato fenotípico y por lo tanto pueden no modelar correctamente algunos procesos. El cultivo primario de trofoblasto es la elección ideal para estudios fenotípicos y de respuesta, y con la adecuada suplementación de nutrientes, presenta una oportunidad para el aislamiento de los distintos tipos celulares, completamente funcionales. Los mismos son ampliamente utilizados para interrogar la transmisión transplacentaria de microorganismos que representan riesgo grave para el feto y son foco de los sistemas de salud (denominados TORCH) [76] por ejemplo *Toxoplasma gondii*, Rubeola, Cytomegalovirus, Herpes y se han agregado *Treponema pallidum*, Varicella zoster, HIV, Hepatitis, Parvovirus, Enterovirus, *Trypanosoma cruzi*, *Plasmodium falciparum* y recientemente ZIKA virus [77, 78]. La madre y el feto en desarrollo están protegidos a través de su sistema inmunológico, la placenta modula las respuestas inmunológicas de ambos y presenta también sus propios mecanismos antiparasitarios. Dichos mecanismos son los menos estudiados de la tríada inmunológica [62]. Dentro de los mecanismos placentarios de defensa local se pueden mencionar el recambio trofoblástico (*trophoblast turnover*) [61], la producción de citoquinas proinflamatorias [79], y la activación de células NK placentarias [80].

En torno a *T. cruzi*, mucho trabajo se ha realizado con aislados de infecciones vectoriales, pero los aislados de transmisión vertical son escasos. [67]. Algunos trabajos sugieren que la capacidad de sobrevivir a la producción de especies



reactivas de oxígeno (ROS) determina la transmisibilidad placentaria [81] y que cepas menos virulentas logran el pasaje a través de la placenta con más frecuencia que cepas virulentas [55]. Una caracterización exhaustiva de la cepa VD (linaje BCb, y DTU TcVI) aislada de un paciente pediátrico de Chagas congénito, demostró su alta virulencia y susceptibilidad parcial al tratamiento con Bzn y Nfx [67]. También se observó que es más infectiva que la cepa Y (TcII) en un modelo inmortalizado de trofoblasto humano (células Bewo) y en explantes de placenta humana [69]. Se han utilizado estudios transcriptómicos de respuesta para interrogar la interacción hospedero-patógeno durante la infección utilizando diferentes modelos como líneas celulares inmortalizadas, cultivos primarios, explantes, tejidos obtenidos de infecciones en modelos murinos y humanos de pacientes chagásicos. Los resultados indican que las respuestas son principalmente, pero no exclusivamente, la regulación diferencial de vías de inflamación y sistema inmune, metabolismo lipídico, bioenergética mitocondrial, ciclo celular, muerte celular, organización del citoesqueleto las cuales fueron exhaustivamente revisadas por Olivera y equipo [82] (Figura 7). Para abordar la infección congénita se han realizado estudios transcriptómicos en placentas murinas, explantes de placenta humana y de placentas de madres seropositivas. Bajas cargas parasitarias inducen mecanismos de defensa como proliferación y diferenciación celular, modificaciones de la matriz extracelular y recambio trofoblástico [61, 62]. Con la infección también se disparan la expresión de citoquinas y una respuesta inflamatoria dirigida a la eliminación de los parásitos, pero termina teniendo un efecto contrario, los parásitos pasan debido al daño tisular y la ruptura de la barrera [66].



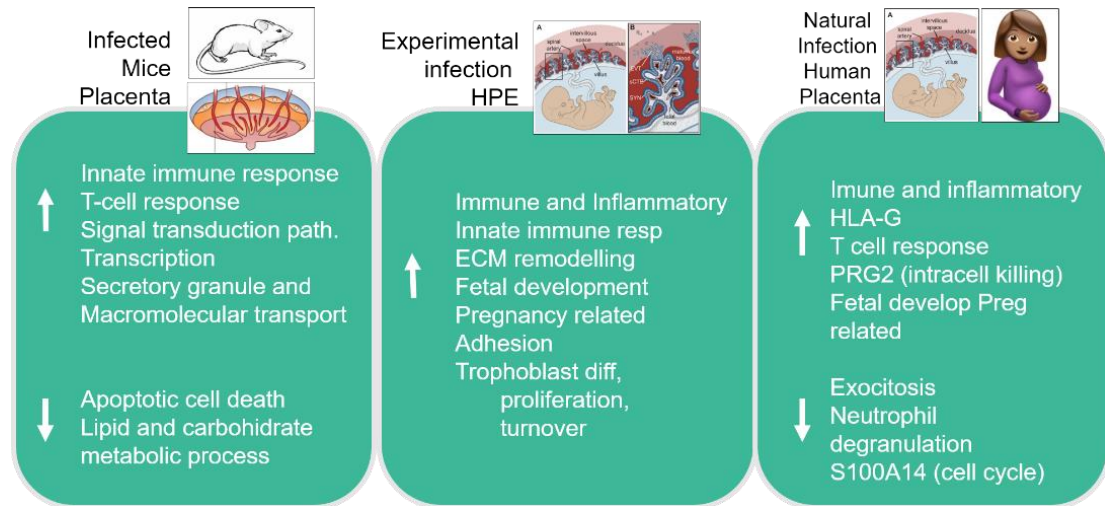


Figura 7. Resumen de vías alteradas con la infección de *T. cruzi* en diferentes modelos de interfase materno fetal.

En la figura se muestra un resumen de los resultados obtenidos de experimentos de respuesta sobre diferentes modelos de interfase materno fetal revisados en Olivera, *et al. Genomics* 2019.

## 9. ANTECEDENTES Y JUSTIFICACIÓN

Desde el año 2013 iniciamos una colaboración con el Departamento de Parasitología del Insitituto de Higiene a cargo de la Dra. Yester Basmadjian, en el marco de aislamiento y preservación de cepas de *Trypanosoma cruzi* aisladas de pacientes uruguayos. Desde la fecha, tenemos en nuestro laboratorio cinco aislados de transmisión vertical, nombradas TcGI, TcKR, TcLU, TcNA, TcLO, algunas de tercera y otras de cuarta generación en donde la bisabuela de los pacientes fue quien posiblemente adquirió la enfermedad por transmisión vectorial y luego la cepa ha sido transmitida de generación en generación hasta la/el bisnieta/o debido a la ausencia de controles durante los embarazos. El equipo del Departamento de Parasitología obtuvo éstas cepas mediante el xenodiagnóstico de pacientes y posterior inoculación de ratones donde fueron amplificadas y aisladas. Tres aislados de transmisión (TcLU, TcGI y TcKR) fueron utilizadas en el marco de esta tesis, que de ahora en adelante los llamaremos aislados de TV o TV.

En el proceso de aislamiento y caracterización inicial de éstos aislados observamos comportamientos particulares respecto a otras cepas comúnmente utilizadas en el laboratorio:

- No hacen pico de parasitemia en ratones inmunocompetentes
- Tienen muy baja tasa de replicación en cultivos celulares susceptibles,
- No completan el ciclo de vida *in vitro*, ya que la transformación de tripomastigotas (forma sanguínea en el hospedero) a la forma epimastigota (forma replicativa en el vector) parece estar retardada y en algunos casos impedida.

Es por esto que nos propusimos abordar el estudio de caracterización biológica y molecular detallada de estas cepas altamente especializadas en la transmisión vertical con el fin de aportar información sobre este modo de transmisión vertical de importancia en la epidemiología actual de la enfermedad. En el estudio se han incluido dos cepas de referencia de virulencia moderada (Dm28c) y alta (Garbani), esta última aislada de un paciente uruguayo que adquirió la enfermedad en nuestro país por transmisión vectorial hace aproximadamente 60 años.

## 10. HIPÓTESIS

Los aislados de *Trypanosoma cruzi* de casos de Chagas Congénito de tercera generación, han desarrollado estrategias específicas de transmisión vertical, que implican la capacidad de establecer una infección “silenciosa” y de alto tropismo y pasaje transplacentario. Esta estrategia es característica de la adaptación a la transmisión vertical, y sus mecanismos moleculares difieren de aquellos descritos para cepas virulentas.

## 11. OBJETIVOS

### 11.1. Objetivo General

Caracterizar biológicamente aislados de *Trypanosoma cruzi* de transmisión vertical con énfasis en su capacidad de transmitirse verticalmente y el impacto que tiene la transmisión en el ambiente placentario y en el contexto de la interfase materno-fetal, y así acercarnos a los mecanismos adaptativos detrás del establecimiento de la infección congénita.

### 11.2. Objetivos específicos

- Caracterizar los aislados de transmisión vertical a nivel molecular, su capacidad de realizar epimastigogénesis, susceptibilidad a fármacos y virulencia en un modelo murino de infección aguda.
- Determinar el tropismo de las cepas de *T. cruzi* en los diferentes órganos y el tipo de respuesta inmune que inducen.
- Determinar de la capacidad de los aislados de inducir una respuesta inmune que proteja de la re infección de cepas virulentas.
- Evaluar el impacto de la infección sobre parámetros reproductivos y la tasa de transmisión vertical de cada una de las diferentes cepas utilizando un modelo murino de preñez durante la infección crónica.
- Interrogar los cambios inducidos por las diferentes cepas de *T. cruzi* sobre la expresión génica de las placentas de ratonas infectadas.

## 12. MATERIALES Y MÉTODOS

### 12.1. Casos clínicos y diagnóstico

Caso 1 (2013): bebé asintomático de 12 meses de edad, nacido y residente en Montevideo. Madre seropositiva para Chagas de 24 años de edad que también vive en Montevideo. Abuela y bisabuela del bebé tienen serología positiva que nacieron en Montevideo y Salto respectivamente. Datos del bebé: 3,400 kg de peso, nacido de 38 semanas de gestación.

Caso 2 (2015): bebé asintomático de 1 mes de edad que nace y reside en Montevideo, con madre seropositiva nacida en Montevideo y con dos hijos más seropositivos. Peso y semanas de gestación: 3,910 kg y 39 semanas.

Caso 3 (2017): bebé con bloqueo auriculoventricular (BAV) de 3 meses de edad, madre seropositiva. Nacimiento y residencia de ambos en Montevideo. Peso y edad gestacional 3,320 kg y 41 semanas.

Los bebés fueron diagnosticados por xenodiagnóstico, técnica que consiste en la exposición de la piel a cajas que contienen ninfas de cuarto estadio de *Triatoma infestans* criadas en el laboratorio. Luego de la exposición, las heces de las ninfas son monitoreadas al día 20, 40 y 60 y el diagnóstico considerado positivo cuando se observan formas compatibles con *T. cruzi* presentes en las heces de los insectos. El xenodiagnóstico se repite cada 6 meses en tres oportunidades o hasta que el bebé es positivo.

### 12.2. Aislamiento y mantenimiento de cepas

Las heces de las ninfas positivas del xenodiagnóstico se resuspendieron en suero fisiológico y fueron inoculadas por vía intraperitoneal en ratones Balb/c. La parasitemia se siguió por observación microscópica de sangre obtenida por punción submandibular. Cuando se observaron parásitos, la sangre infectada se inoculó en ratones inmunodeprimidos Nude (Nu/J) para amplificar la carga parasitaria. El primer pico de parasitemia en ratones Nude fue considerado el pasaje 1. Los experimentos de esta tesis fueron realizados con parásitos entre los primeros 5 pasajes para conservar las características biológicas de las cepas. Los parásitos utilizados para todos los experimentos de los aislados de transmisión

vertical del caso 1 (TcLU), del caso 2 (TcGI), del caso 3 (TcKR), Dm28c y Garbani, fueron purificados cada vez de sangre de ratones Nude.

### 12.3. Tipificación molecular

Se extrajo ADN de las diferentes cepas para identificar las diferentes DTU basado en tamaños de productos específicos de PCR: región intergénica del *Splice Leader* (SL-IR), la subunidad ribosomal 24S $\alpha$  (rDNA 24S $\alpha$ ) y el fragmento A10 previamente descritos. Los productos de PCR obtenidos se sembraron en geles de 5% agarosa MetaPhor® y el tamaño determinado y comparado con cepas de referencia. Los resultados obtenidos de DTU fueron luego confirmados por multiplex real time PCR [83] por el Laboratorio de Biología Molecular de la Enfermedad de Chagas, Instituto de Investigaciones en Ingeniería Genética y Biología Molecular “Dr. Héctor N. Torres” INGEBI-CONICET, Buenos Aires, Argentina cuyo responsable es el Dr. Alejandro Schijman.

### 12.4. Experimentos *in vitro*

#### 12.4.1. Cultivos celulares

Las células HFF-1 (*Human Foreskin Fibroblasts*, SCRC-1041™) se adquirieron en ATCC® y las células de trofoblasto SWAN-71 [75] fueron generosamente donadas por el Dr. Gil Mor (*Department of Obstetrics and Gynecology, Wayne State University, School of Medicine*). Ambas líneas fueron cultivadas en Dulbecco's Modified Eagle medium (DMEM) (Life Technologies, Grand Island, NY) suplementado con 10% suero fetal bovino e incubadas a 37 °C en atmosfera húmeda con 5% CO<sub>2</sub>. Las formas epimastigotas fueron cultivadas en LIT (*Liver Infusion Tryptose*) suplementado con 10% suero fetal bovino e incubados a 28 °C.

#### 12.4.2. Epimastigogénesis

Los tripomastigotas purificados de sangre de ratón se incubaron en PBS pH=6 a 37°C durante cuatro horas antes de ser colocados en LIT, para inducir su conversión a epimastigotas como fue descrito previamente [84]. Los cultivos fueron colectados a diferentes tiempos y contados luego de ser inmunomarcados como se detalla en la sección 12.4.4. El porcentaje de epimastigotas se calculó como el número de epimastigotas sobre el total de parásitos por 100, el porcentaje

de formas intermedias refiere a esferomastigotas y formas epimastigotas intracelulares (más alargadas que esferomastigotas pero más cortas en largo y flagelo que los epimastigotas) y se calcula como el número de estas formas sobre el total de parásitos por 100.

#### 12.4.3. Susceptibilidad a Nifurtimox y Benznidazol

Los fármacos Benznidazol (Bzn, N-Benzyl-2-nitroimidazole acetamide) y Nifurtimox (Nfx, 3-methyl-4-(5'-nitrofurfurylideneamina) tetrahydro-4H-thiazine-1,1-dioxide) en polvo fueron generosamente cedidos por el Dr. Guzmán Álvarez Tournon del Laboratorio de Moléculas Bioactivas, CENUR, Universidad de la República. Ambos compuestos se prepararon a una concentración de 100mM en DMSO y las diluciones de trabajo se prepararon en medio de cultivo. Para los experimentos de susceptibilidad, los tripomastigotas purificados de infecciones en ratones Nude fueron expuestos a seis diluciones seriadas e incubados a 37°C durante 24 horas. Los parásitos móviles fueron contados en cámara de Neubauer. Cada dosis fue evaluada con 5 réplicas técnicas y 3 biológicas y comparada contra un control sin tratamiento. Se definió la concentración inhibitoria del 50% del crecimiento ( $IC_{50}$ ) considerando el control sin tratamiento como el 100% de crecimiento.

#### 12.4.4. Inmunofluorescencia indirecta

Se sembraron en cubreobjetos células que luego de infectadas se lavaron con PBS y se fijaron con 4% de paraformaldehído, se permeabilizaron durante 5 minutos con 0,1% de Tritón X-100 y bloquearon por 30 minutos con BSA 5% (todos los reactivos adquiridos en Sigma). La marcación para *T. cruzi* se realizó utilizando un anticuerpo primario que reconoce la triparedoxina peroxidasa citosólica (cTXNPx) [85] y un anticuerpo secundario conjugado a Alexa 488 (Invitrogen, Eugene OR). Los parásitos del experimento de epimastigogénesis se colocaron en portaobjetos tratados con poly-L-lisina y marcados con un anticuerpo monoclonal que reconoce la proteína flagelar de unión a calcio (Mab25, generosamente donado por el Dr. Sergio Schenkman, UNIFESP, Brasil) [86].

#### 12.4.5. Índice de infectividad en células de mamífero

Los tripomastigotas purificados de sangre de ratones Nude fueron contados e incubados con las diferentes líneas celulares HFF y SWAN-71 (sembradas en cubreobjetos) durante dos horas y a una multiplicidad de infección de 5 parásitos por célula. Luego se realizaron 5 lavados para remover los parásitos no internalizados y las células se incubaron por 48 horas más. Al punto final se lavan y fijan las infecciones con etanol 95% v/v y se montan los cubreobjetos con líquido de montaje con DAPI (Fluoroshield™ con DAPI, Sigma). La infectividad se determinó considerando la capacidad de invasión y replicación celular en cada condición contando números de células infectadas, parásitos por célula infectada y células totales. Para cada réplica, al menos 500 células totales fueron contadas y los resultados se expresan como el Índice de infectividad promedio y el desvío estándar entre réplicas.

$$\text{Índice de infección} = \frac{\text{número de amastigotas} * \text{número de células infectadas}}{\text{número total de células}}$$

### 12.5. Experimentos *in vivo* y procesamiento de muestras

#### 12.5.1. Condiciones de cría de animales

Los ratones Balb/cJ y Nu/J fueron mantenidos en Unidad de Biotecnología de Animales de Laboratorio (UBAL) del Institut Pasteur de Montevideo en condiciones libres de patógenos y en cajas individualmente ventiladas (IVC, Tecniplast, Milan, Italy). Para las infecciones, grupos de animales de hasta 6 individuos se llevaron al rack ventilado con filtros HEPA para poder mantener los animales en condiciones de bioseguridad de tipo 2. Los animales recibieron agua fresca y alimento (Labdiet 5K67, PMI Nutrition, IN, USA) autoclavados *ad libitum*. Fueron realizados controles de estrés, comportamiento y microbiológicos según las guías nacionales e internacionales de cuidado y uso de animales de experimentación. La Comisión de Ética en el Uso de Animales del Institut Pasteur de Montevideo (CEUA) en acuerdo con la ley nacional 18.611 y de las guías internacionales de cuidado animal (*Guide for the Care and Use of Laboratory Animals*) aprobaron los protocolos experimentales utilizados para esta tesis.

### 12.5.2. Infecciones en ratones, monitoreo, curvas de parasitemia y supervivencia

Tanto hembras como machos fueron utilizados de manera indistinta para la amplificación de parásitos solo teniendo en cuenta que fueran mayores a 8 semanas de edad. Los ratones se inocularon por la vía intraperitoneal con  $10^5$  parásitos de las diferentes cepas y la parasitemia se monitoreó contando parásitos en sangre obtenida por punción submandibular 2 a 3 veces por semana hasta que se obtuvo un pico de parasitemia de aproximadamente  $5 \times 10^6$  por ml de sangre. Para el punto final, los ratones fueron anestesiados con una mezcla de ketamina 100mg/kg (Vetanarcol®, König, Buenos Aires Argentina) y Xylazine 10mg/kg (Seton®, Calier, Barcelona, Spain) administrada por vía intraperitoneal, y la volemia colectada por punción intracardiaca. Finalmente, los ratones fueron sacrificados por dislocación cervical. Luego de la colecta de sangre por punción intracardiaca, los parásitos fueron purificados por centrifugación en gradiente de Percoll [87]. Brevemente, se mezclan volúmenes equivalentes de sangre y Percoll (con glucosa y sacarosa) y luego de centrifugar a  $13000 \times g$  45 minutos, se colecta la interfase que contiene los parásitos. Para la construcción de las curvas de parasitemia, los grupos experimentales (1 grupo por cepa de *T. cruzi*) se construyeron con 6 hembras Balb/cJ de entre 6 y 8 semanas que fueron inoculadas con diferentes dosis de los parásitos. La dosis inicial de la cepa Garbani fue siempre menor debido a su virulencia. Al día 35 post infección, cuando no se detectaron más parásitos en sangre, las ratonas de las curvas de parasitemia se anestesiaron. Se colectó la sangre por punción intracardiaca y la misma fue separada para la obtención de suero y heparinizada para las pruebas moleculares. Los órganos fueron disecados y lavados en PBS frío y conservados para su futuro procesamiento (extracción de ADN o ARN).

### 12.5.3. Evaluación de cópula, preñez, potencial abortogénico y transmisión vertical de las diferentes cepas de *T. cruzi*

Se trabajó con hembras de la cepa Balb/cJ de entre 6 y 8 semanas de edad separadas en 6 grupos de 6 individuos cada uno e infectadas por la vía intraperitoneal con las diferentes cepas de *T. cruzi*: Dm28c, Garbani, TcLU, TcKR, TcLU y Control sin infectar. Para evaluar los diferentes parámetros reproductivos de las hembras infectadas y la capacidad de cada cepa de *T. cruzi* de transmitirse verticalmente, se realizó la sincronización del ciclo estral de las hembras a través



del agregado de viruta previamente utilizadas por machos. Posteriormente se realizó la cruce de manera de colocar un macho cada 3 hembras en una caja durante 5 días. Durante todos los días de la cruce se realizó una inspección diaria a primera hora de la mañana de la presencia de tapón mucoso para calcular la tasa de cópula para cada grupo. Luego del retiro de los machos se permitió a las hembras gestar sin intervenciones hasta el día 57 de gestación, realizando el punto final del experimento. Una representación esquemática, mostrando la línea temporal del experimento se muestra en la Figura 8. Las hembras fueron sacrificadas por dislocación cervical y los fetos por decapitación, y los fetos, placentas y reabsorciones fueron contados para la determinación de las tasas de preñez y reabsorciones, y colectados junto con los órganos para su posterior procesamiento.

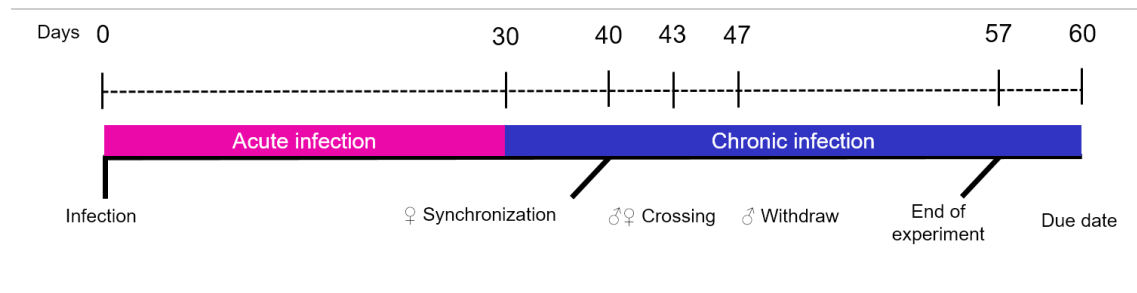


Figura 8. Representación esquemática del experimento de transmisión vertical.

Ecuaciones utilizadas para las diferentes determinaciones realizadas:

$$\% \text{ Cópula} = \frac{\text{número of hembras con tapón mucoso}}{\text{número total de hembras}} * 100$$

$$\% \text{ Preñez} = \frac{\text{hembras preñadas}}{\text{hembras totales}} * 100$$

$$\% \text{ reabsorciones} = \frac{\text{reabsorciones (abortos)}}{\text{número total de fetos viables}} * 100$$

$$\% \text{ de transmisión vertical} = \frac{\text{Fetos viables positivos}}{\text{Total de hembras preñadas}} * 100$$

#### 12.5.4. Determinación de la capacidad protectora

Hembras Balb/cJ entre 6 y 8 semanas de edad fueron inmunizadas con  $10^5$  parásitos de la cepa de transmisión vertical en el día 0 y un *boost* idéntico al día 30. Un grupo fue inoculado con PBS estéril como control. En el día 60 se realizó una infección con la dosis letal de  $2 \times 10^3$  parásitos de la cepa Garbani (Figura 9). Desde el día 0 del experimento se monitorearon tanto la parasitemia en sangre y el peso de los animales con el objetivo de construir la curva de parasitemia y la curva de porcentaje de peso respecto al peso inicial a partir del día 60, el día de la infección. Se utilizó como criterio de punto final una pérdida de masa mayor al 20%. En el día del punto final se realizó la eutanasia de los animales mediante anestesia y dislocación cervical y se realizó la disección del bazo y se pesó el mismo para la determinación del índice esplénico, como una medida indirecta de la severidad de la infección. Las determinaciones de parasitemia y peso se realizaron hasta el día 120 para el grupo control.

$$\text{Índice esplénico} = \frac{\text{masa del bazo} \times 100}{\text{masa total del ratón}}$$

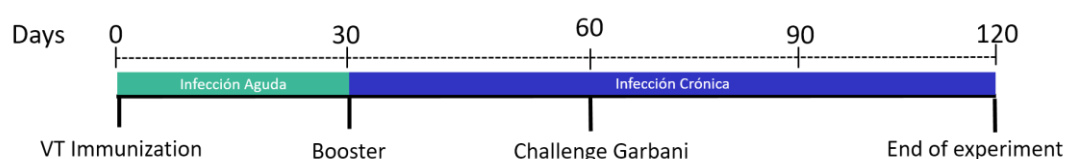


Figura 9. Experimento de determinación de la capacidad protectora. Esquema del experimento de inmunización y *boost* con  $10^5$  parásitos de la cepa de TV e infección con  $2 \times 10^3$  parásitos de la cepa Garbani en el día 60.

#### 12.5.5. Detección de ADN de *T. cruzi* por qPCR

Para la extracción de ADN de sangre se utilizó el kit *Quick-DNA*™ Miniprep Plus Kit (D4069, Zymo Research, California, USA) y para la extracción de ADN de órganos se utilizó el kit *Quick-DNA*™ Tissue/Insect Plus Kit (D6016, Zymo Research, California, USA), siguiendo para ambos los protocolos del fabricante. Para la mejor disruptión mecánica del tejido se utilizó el homogenizador Bullet Blender® Tissue homogenizer (Next Advanced). El ADN total fue cuantificado, diluido a una concentración final de 100 ng/μl y un 1 μl de muestra fue utilizado para la reacción

de amplificación con sonda TaqMan para kDNA de *T. cruzi* y con la mezcla de reacción de IDT [88]. Las reacciones se realizaron en placas de 96 pocillos en un volumen final de 10 µl y la expresión relativa fue determinada con el método de delta Ct normalizado con el gen de GAPDH de ratón. Las muestras de todos los ratones fueron analizadas por duplicado en un termociclador QuantStudio 3 System™ thermocycler de Applied Biosystems (Thermo Fisher Scientific). Fueron incluidos en cada placa de reacción, controles negativos con agua como molde, controles positivos de ADN genómico de *T. cruzi* y ADN obtenido de los órganos, sangres, fetos y placentas de las ratonas del grupo control sin infectar que fueron utilizados para definir la marca de corte entre muestras negativas y positivas (= 1). Las secuencias de los cebadores y sondas utilizadas se detallan en la tabla 1.

#### 12.5.1. Expresión de citoquinas por qRT-PCR

Para determinar la expresión de citoquinas se realizó la extracción de ARN de los bazo de las ratonas de 30 y 60 días post infección homogenizando el tejido como se describió anteriormente, pero en TRI Reagent® (Invitrogen) y el kit *Direct-zol RNA Miniprep Plus* (R2072, Zymo Research, California, USA). A partir de 500ng de ARN total se sintetizó ADNc utilizando la retrotranscriptasa *SuperScript II* (Invitrogen) con Oligo (dT). Las reacciones fueron llevadas a cabo en un volumen total de 10 µL utilizando el kit de *SybrGreen* (KAPA SYBR FAST Universal 2x qRT-PCR Master Mix, KapaBiosystems), una concentración de cebadores final de 200 nM, y 1µl de una dilución 1/5 del cDNA. Cada reacción se realizó por duplicado en el termociclador QuantStudio 3 System™ thermocycler de Applied Biosystems (Thermo Fisher Scientific). Se realizaron curvas de disociación para comprobar la amplificación de un solo producto y los valores de Ct para cada gen fueron normalizados en base al gen GAPDH murino calculando el delta-Ct para cada gen en todas las muestras. Para determinar la expresión relativa se utilizó el método de delta-delta Ct. Las secuencias de los cebadores utilizados se muestran en la Tabla 1.

**Tabla 1. Cebadores y sondas usados para qPCR y qRT-PCR de genes de *Trypanosoma cruzi* y *Mus musculus***

| Gen                            | Nombre         | Secuencia 5´-3´                      | Tm       |
|--------------------------------|----------------|--------------------------------------|----------|
| KDNA<br>MINICIRCLE<br>[89]     | 32F            | TTT GGG AGG GGC GTT CA               |          |
|                                | 148R           | TAT TAC ACC AAC CCC AAT<br>CGAA      |          |
|                                | kDNA71P        | FAM (5´CAT CTCACC CGT ACA<br>TT BHQ1 |          |
| GAPDH<br>qPCR*                 | MmGAPDH F      | GAC TTC AAC AGC AAC TCC CAC          |          |
|                                | MmGAPDH R      | TCC ACC CTG TTG CTG TA               |          |
| GAPDH<br>RT-qPCR               | MmGAPDH F      | ATGACATCAAGAAGGTGGTGAAG              | 55/57/62 |
|                                | MmGAPDH R      | TCCTTGAGAGGCCATGTAGTAGG              |          |
| Interleucina 4<br>(IL-4)       | Mm IL-4 F      | AGGTCACAGGAGAAGGGACACC               | 65       |
|                                | Mm IL-4 R      | TGCGAAGCACCTTGGAAGCCC                |          |
| Interleucina<br>(IL-10)        | Mm IL-10 F     | TTCCCACTCGGCCAGAGCCA                 | 65       |
|                                | Mm IL-10 R     | GGGGAGAAATCGATGACAGCGC<br>C          |          |
| Interferón<br>gamma (INFg)     | Mm INFg F      | GGAGGAACTGGCAAAAGGATGG<br>TGA        | 62       |
|                                | Mm INFg R      | GCGCTGGACCTGTGGGTTGT                 |          |
| TGF beta                       | Mm TGFb F      | AACAATTCCTGGCGTTACCTT                | 55       |
|                                | Mm TGFb R      | CTGCCGTACAACCTCCAGTGA                |          |
| Interleucina 6<br>(IL-6)       | Mm IL-6 F      | GTATGAACAACGATGATGCACTT<br>G         | 55       |
|                                | Mm IL-6 R      | ATGGTACTCCAGAAGACCAGAGG<br>A         |          |
| TNF alfa                       | Mm TNFa F      | GGGGACGTCTGTAGCAAACCAC               | 57       |
|                                | Mm TNFa R      | TCGGCTGACGGTGTGGGTGA                 |          |
| Interleucina 12<br>(IL-12 p35) | Mm IL-12 p35 F | ACCTGCTGAAGACCACAGAT                 | 55       |
|                                | Mm IL-12 p35 F | GATTCTGAAGTGCTGCGTTG                 |          |

### 12.5.2. Extracción de ARN, secuenciación y análisis bioinformático

Se realizó la extracción de ARN de tres placentas de cada condición (réplicas biológicas). Brevemente, el tejido placentario se disgregó mecánicamente durante 10 minutos utilizando el homogenizador Bullet Blender (*Next Advance*, USA) junto con perlas de acero inoxidable de 1,6mm de diámetro (*Next Advance*, USA) y en Tri-Reagent (Thermo, USA). Una vez el disgregado tejido, se agregó 200  $\mu$ L de cloroformo por cada ml de Tri-Reagent. Posteriormente, se centrifugó durante 15 minutos a 12000 g y se recuperó la fase acuosa para su procesamiento con el kit Direct-zol RNA (Zymo Research, USA) según las instrucciones del fabricante. La calidad del ARN obtenido fue determinado usando el kit Bioanalyzer RNA 6000 Nano (Agilent, USA) en el equipo Bioanalyzer 2100 (Agilent, USA). Un número de integridad del ARN (RIN) mayor a 8 fue considerado aceptable para continuar con la construcción de las bibliotecas y la secuenciación.

La construcción de las bibliotecas y la secuenciación se realizaron en MacroGen (Korea) utilizando TruSeq stranded total RNA con Ribo-Zero Gold rRNA Removal kit (Illumina, USA) y una plataforma de secuenciación Illumina NovaSeq6000. Se obtuvieron más de 60 millones de secuencias para cada muestra (Tabla 2 en la sección de resultados). Se realizó una depuración de secuencias según su calidad utilizando FastQC (<https://github.com/s-andrews/FastQC>) y se mapearon las secuencias en el genoma de ratón versión 39 (GRCm39.primary\_assembly genome bajado de Ensembl) con el paquete STAR [90] utilizando el archivo de anotación M26 del proyecto Gencode. Los conteos de secuencias se realizaron con *FeatureCounts* [91] y las estadísticas de mapeo, los parámetros de STAR y *FeatureCounts* se incluyeron en la tabla 2. El archivo de salida del *FeatureCounts* se procesó en RStudio utilizando el paquete DESeq2 [92] para obtener los genes diferencialmente expresados (DEG) utilizando  $\log_2FC > 1,5$  y el valor ajustado de p de Benjamini-Hochberg  $p_{adj} < 0,05$  (y 0,01 cuando se indica) que fueron utilizados para los análisis posteriores. El agrupamiento de los DEG se realizó utilizando el paquete pheatmap en el software RStudio o en GraphPrism v9.0. El análisis de ontología de genes se realizó en Metascape [93].

13. RESULTADOS

13.1. Parte A: Caracterización de los aislados de transmisión vertical

13.1.1. Los aislados de transmisión vertical pertenecen al linaje híbrido BCb (TcV)

Con el objetivo de generar los bancos de trabajo de los aislados de transmisión vertical y la obtención de ADN para la tipificación molecular, las heces de las vinchucas de los xenodiagnósticos positivos fueron inoculadas en ratones Balb/cJ. Entre el día 30 y 45 post inoculación se contaron uno o dos parásitos cada 100 campos, cantidad que no aumentó en el tiempo, indicando que los ratones inmunocompetentes son capaces de controlar la infección. Los ratones Nu/J fueron inoculados con 300 µl de sangre de los ratones Balb/cJ positivos, y a partir del día 21 comenzó una curva creciente de parasitemia que los ratones no fueron capaces de controlar. Al alcanzar  $1 \times 10^6$  parásitos/ml, se crio preservaron los stocks de parásitos en 10% DMSO 90% SFB, se hizo extracción de ADN y se inocularon hemocultivos (LIT 20% SFB + 10% sangre, incubados a 28°C). Los resultados obtenidos de las PCR secuenciales de tipificación molecular que se muestran en la Figura 10 indican que las tres cepas aisladas TcGI, TcKR and TcLU corresponden al linaje híbrido BCb (DTU TcV).

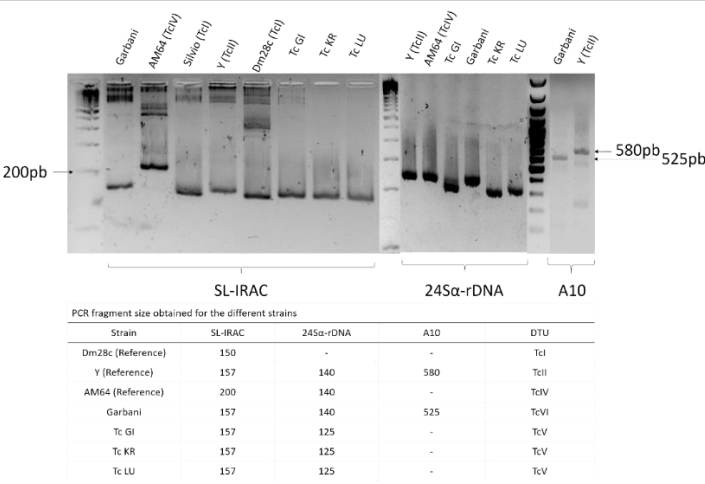


Figura 10. Tipificación molecular de las cepas de *T. cruzi*  
En la figura se muestra el patrón de bandas diferenciales obtenidas para los aislados de transmisión vertical y las cepas de referencia. La tabla indica los tamaños en pares de base de los productos de PCR obtenidos.

### 13.1.2. Los tripomastigotas sanguíneos de los aislados de transmisión vertical no realizan epimastigogénesis *in vitro*

Para evaluar la capacidad de epimastigogénesis de las diferentes cepas, los tripomastigotas sanguíneos fueron sometidos a un estrés nutricional. Los parásitos fueron luego fijados y teñidos a diferentes días para ser evaluados respecto a su relación núcleo/kinetoplasto, su forma y tamaño flagelar. Estos parámetros se utilizaron para construir las curvas de porcentaje de epimastigotas y formas intermedias (esferomastigotas + "*epimastigota-like*") en función del tiempo. Como se muestra en la Figura 11 parte A, al día 0 se observan únicamente tripomastigotas y por eso tanto las líneas (% epimastigotas) como las barras (% de formas intermedias) son 0 (Figura 11 parte A). Al día 2 todas las cepas presentan mayoría de formas intermedias (barras) aunque en las cepas Dm28c (línea negra) y Garbani (línea verde) comienzan a observarse epimastigotas. Es al día 6 en donde 60% de los parásitos corresponde a la forma epimastigota en Dm28c y Garbani y el 100% de las formas son intermedias y no replicativas para los aislados de TV (barras amarilla, azul y rosada), y esto se mantiene hasta el final del experimento. En el día 10, las cepas Dm28c y Garbani ya tienen aproximadamente un 100% de epimastigotas replicativos (Dm28c línea azul y Figura 11 parte B). Para el día 20, la población de formas intermedias de las cepas de TV muere y los epimastigotas de Dm28c y Garbani replican con los pasajes sucesivos. Un panel de fotos a modo de ejemplo para la cepa Dm28c y TcGI se muestra en la Figura 11 parte B.

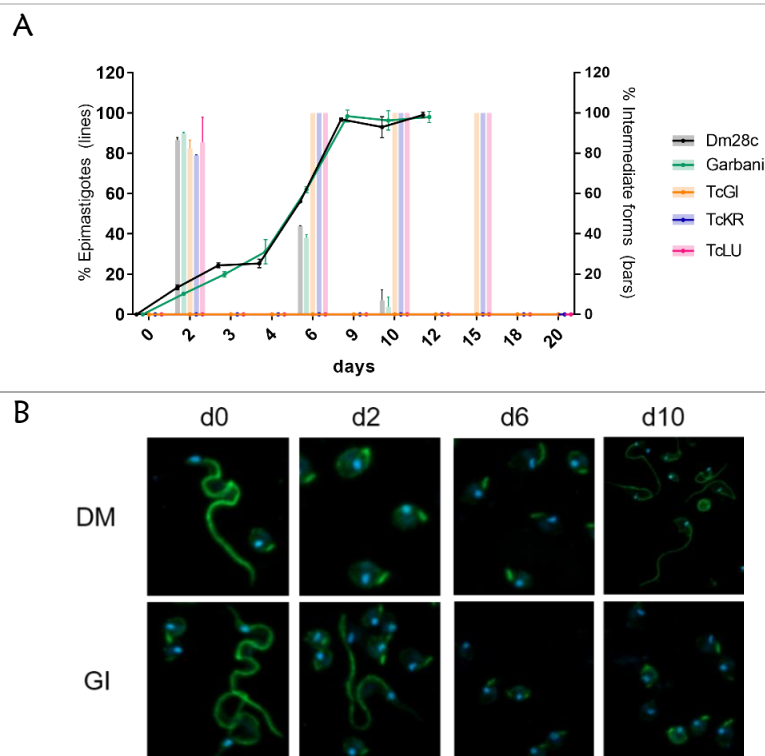


Figura 11.  
Epimastigogénesis *in vitro*.

En la parte A se muestra una curva de % de epimastigotas (líneas) y % de esferomastigotas (barras) contados en función del tiempo para cada cepa. En la parte B se muestra un ejemplo del marcado utilizado para el conteo de las diferentes formas: proteína flagelar de unión a calcio (verde) y ADN (azul).

### 13.1.3. Susceptibilidad de las cepas a Bzn y Nfx

Con el fin de caracterizar la susceptibilidad de las diferentes cepas a los fármacos de referencia Bzn y Nfx, se expusieron tripomastigotas a diferentes concentraciones y se obtuvieron curvas de viabilidad de parásitos evaluada por la movilidad de los mismos. En la **¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.** A y B se observan las curvas de porcentaje de viabilidad de parásitos en función de la concentración de fármaco y los valores de  $IC_{50}$  obtenidos se muestran en la parte C. Todas las cepas fueron susceptibles a las concentraciones ensayadas de ambos fármacos. Los aislados de TV tienen valores de  $IC_{50}$  similares entre  $\sim 3$  y  $\sim 6 \mu M$  para Bzn y Nfx respectivamente pero son más resistentes a Nfx que las cepas de referencia ( $\sim 6 \mu M$  vrs  $\sim 3 \mu M$ ) y más susceptibles a Bzn que Dm28c ( $\sim 3 \mu M$  vrs  $\sim 6 \mu M$ ).



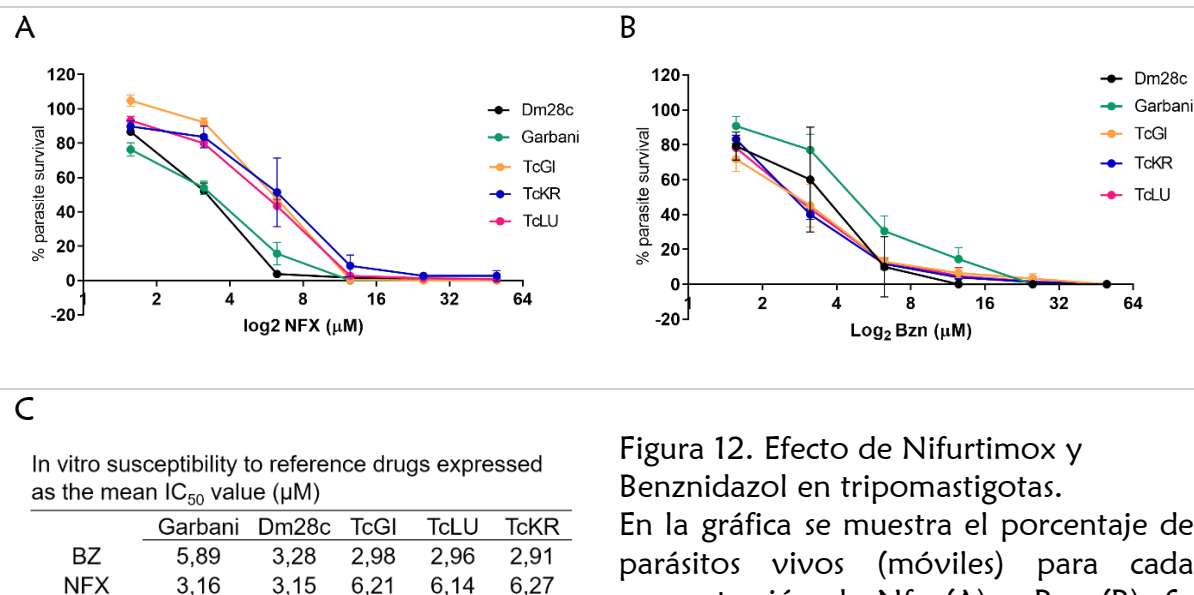


Figura 12. Efecto de Nifurtimox y Benznidazol en tripomastigotas. En la gráfica se muestra el porcentaje de parásitos vivos (móviles) para cada concentración de Nfx (A) y Bzn (B). Se determinó la concentración inhibitoria 50% (C) para cada cepa y cada fármaco.

#### 13.1.4. Los aislados de transmisión vertical presentan un fenotipo de baja virulencia

Con el fin de comparar el curso de la infección aguda y la virulencia de las diferentes cepas en un modelo *in vivo*, ratonas Balbc/J fueron inoculadas con diferentes dosis de las diferentes cepas. Como se muestra en la curva de supervivencia de Kaplan-Meier (Figura 13 parte A) cuando se inocula  $50 \times 10^3$  parásitos de la cepa Dm28c (línea negra) y la misma cantidad de los tres aislados de TV (línea punteada rosada), el 100% de las ratonas sobreviven a la infección. Cuando inoculamos  $1 \times 10^3$  parásitos de la cepa Garbani (línea verde punteada) sobrevive el 50% de población y una dosis de  $10 \times 10^3$  produce la muerte de todos los animales inoculados (línea verde continua). Cuando hacemos el seguimiento de la parasitemia tres veces por semana para los mismos grupos de ratonas (Figura 13 parte B) vemos que cuando inoculamos  $50 \times 10^3$  parásitos de la cepa Dm28c (línea negra) las ratonas hacen un pico de parasitemia al día 20pi de  $400 \times 10^3$  parásitos/ml y que al día 36pi no se observan parásitos en sangre. Un inóculo inicial de  $10 \times 10^3$  parásitos de la cepa Garbani (línea verde) produce un pico de parasitemia de  $700 \times 10^3$  parásitos/ml en el día 12 post infección (pi) llevando a la muerte de las ratonas. Cuando se reduce el inóculo a  $1 \times 10^3$ , las ratonas que sobreviven (50%) hacen un pico de parasitemia  $400 \times 10^3$  en el día 10 pi, y recién al día 30 post infección la parasitemia en sangre desaparece. Los parásitos de los aislados de TV aparecen en sangre entre el día 7 y el día 22 en pequeñas cargas:

para TcLU se observaron 2000 parásitos/ml en el día 7, para TcKR 3000 parásitos/ml el día 22 y en el caso de TcGI, los parásitos aparecen en el día 7 y en el día 22 con conteos de 1000 parásitos/ml. Según estos datos, la cepas se pueden agrupar en baja virulencia (TcGI, TcKR y TcLU), virulencia moderada (Dm28c) y alta virulencia (Garbani).

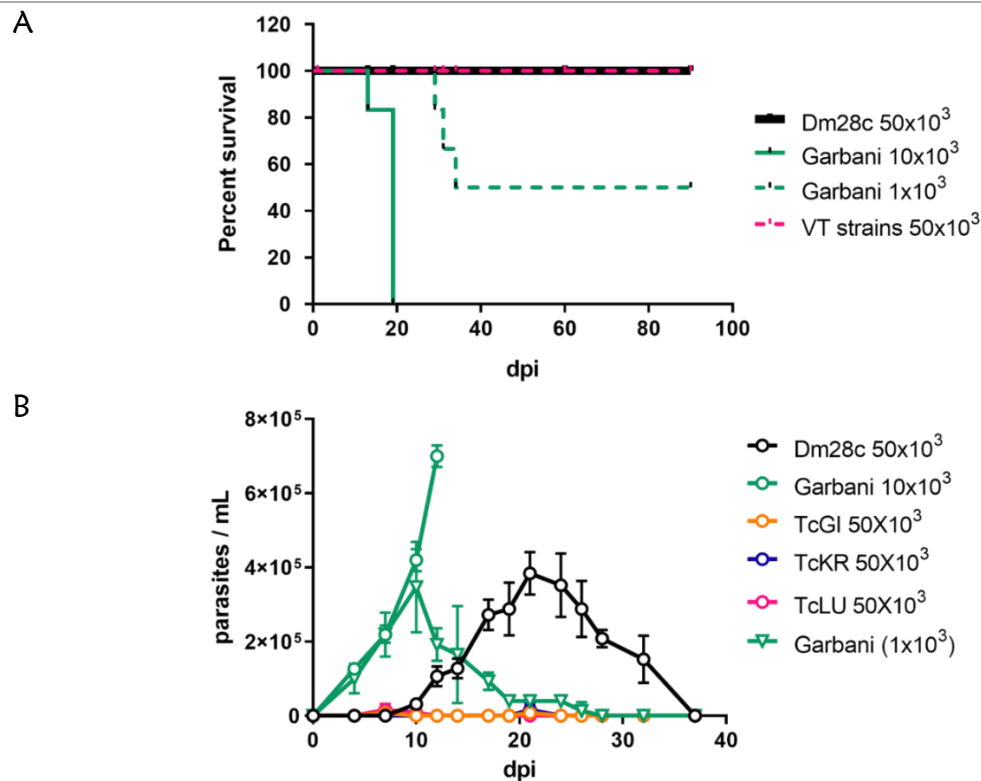


Figura 13. Virulencia y curvas de parasitemia *in vivo*

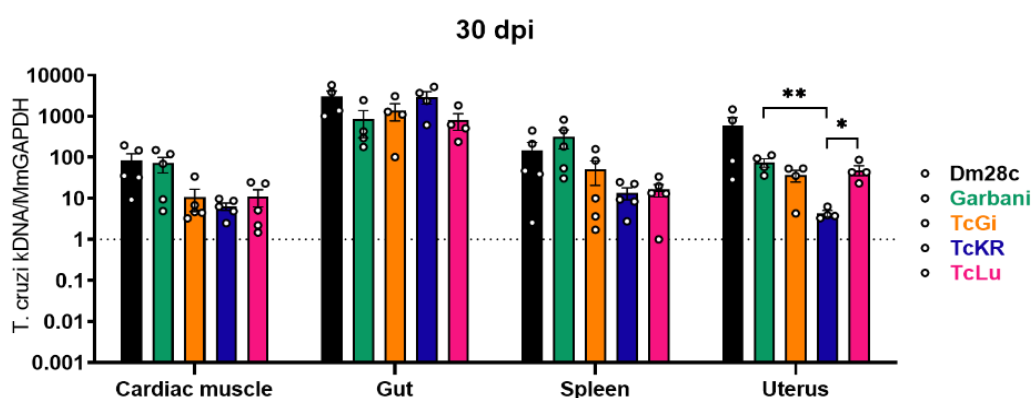
En la parte A de la figura se muestra una curva de porcentaje supervivencia de las ratonas inoculadas con diferentes cepas y dosis y en la parte B las curvas de parasitemia en sangre para cada condición.

#### 13.1.5. Los aislados de TV colonizan los diferentes órganos de manera similar a cepas de mayor virulencia

Las ratonas inoculadas con las diferentes cepas fueron sacrificadas al día 30 y al día 60 post infección con el fin de evaluar la carga parasitaria en los diferentes órganos. Para cada tejido se realizó PCR cuantitativa de kDNA de *T. cruzi* acompañado de un control de tejido sin infectar para definir la marca de negatividad que en las gráficas se muestra con la línea punteada en 1. Los resultados obtenidos muestran que al día 30 pi, se detecta ADN de los parásitos por arriba de la marca control

en músculo cardíaco, intestino, bazo y útero de todos los grupos infectados (Figura 14A). Para todas las cepas ocurre que la carga de ADN parasitario relativa es mayor en el intestino que en el resto de los órganos. A los 60 días post infección (Figura 14B) las cargas parasitarias se vuelven negativas excepto para Dm28c en corazón, intestino y útero (aunque las diferencias con el resto no son estadísticamente significativas). TcKR tiene un comportamiento algo diferente al resto de las cepas (barras azules): a los 30 días hay menor carga en útero comparada con el resto de las cepas (asteriscos en la Figura 14 parte A), que a los 60 días queda positiva, mientras que la detección de ADN de parásitos en los úteros del resto de las cepas se vuelve negativa. Por otra parte, en el intestino y a los 60 días se observan valores de carga parasitaria mayores que para el resto de las cepas.

A



B

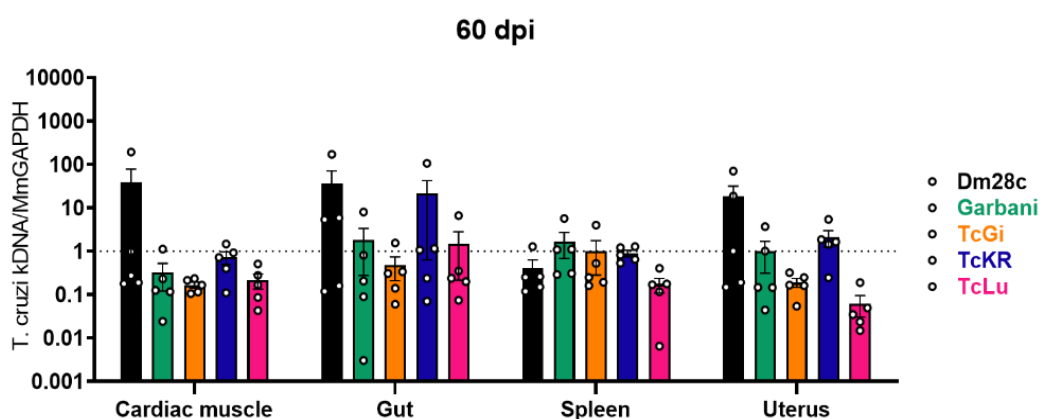


Figura 14. Carga parasitaria en diferentes órganos para las cepas estudiadas. En la figura se muestra la cuantificación relativa de parásitos en distintos órganos para las diferentes cepas 30 días post infección (parte A) y 60 días (parte B).

### 13.1.6. Los aislados de TV inducen una respuesta inmune similar a la inducida por cepas más virulentas

Con el objetivo de interrogar la respuesta inmune inducida por las diferentes cepas de *T. cruzi*, se extrajo ARN de los bazo de las ratonas infectadas y se cuantificó la expresión relativa de diferentes citoquinas. Los resultados obtenidos, graficados en la Figura 15, indican que a los 30 días (parte A) hay una fuerte estimulación de la expresión de todas las citoquinas evaluadas (INFg, IL12, TNFa, IL6, IL10, IL4 y TGFb) en todos los grupos infectados cuando se comparan con el nivel de expresión del grupo control sin infectar (barras grises). Los niveles de expresión son comparables para todas cepas aunque algunas citoquinas muestran una tendencia a estar más elevadas en el grupo infectado con Garbani, excepto por la citoquina anti-inflamatoria IL4. A los 60 días (Figura 15 parte B) el nivel de expresión de citoquinas baja para todos los grupos infectados, excepto el de IL12 en los grupos infectados con los aislados de TV que se mantienen en el mismo nivel que el observado a los 30 días. A los 60 días, para TcKR (barra azul con asterisco en parte B), el nivel de IL12 se mantiene aumentado de manera significativa comparada con el nivel del control. En conjunto estos resultados indican que todas las cepas son capaces de inducir un aumento significativo de la expresión de las diferentes citoquinas evaluadas independientemente del nivel diferencial que tienen entre ellas en términos de virulencia y carga parasitaria en sangre.

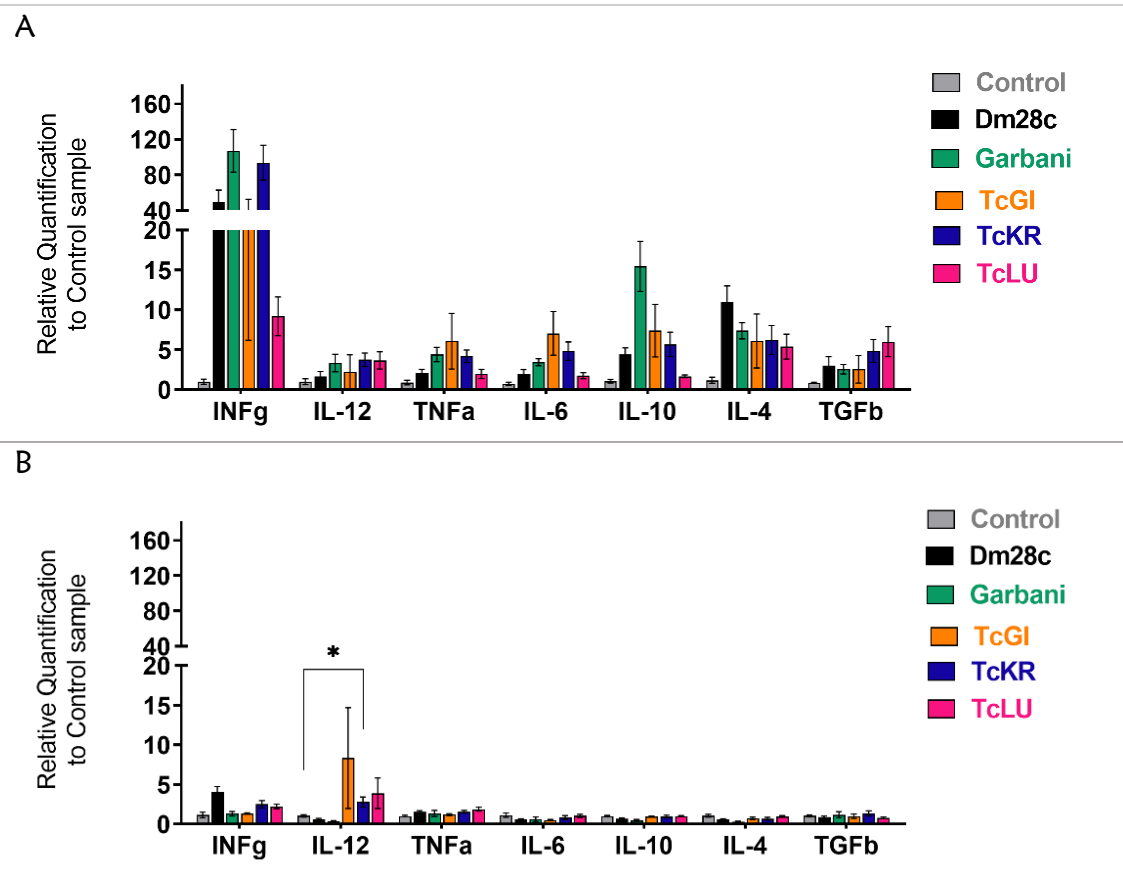


Figura 15. Cuantificación relativa de expresión de citoquinas. Cuantificación relativa de expresión de diferentes citoquinas en el bazo de las ratonas infectadas a los 30 (A) y a los 60 días post infección (B) con diferentes cepas de *T. cruzi*

### 13.1.7. La inmunización con un aislado de transmisión vertical protege a los ratones ante una re-infección con una cepa altamente virulenta

Con el fin de evaluar la capacidad de los aislados de TV de inducir protección frente a la infección con *T. cruzi*, diseñamos un experimento en donde realizamos un inóculo inicial y un Boost de  $10^5$  parásitos de una cepa de TV y luego de 60 días un inoculamos una dosis letal de la cepa de alta virulencia Garbani como se muestra en la Figura 16 de materiales y métodos. Durante el monitoreo de parasitemia en sangre se observa que los ratones del grupo no inmunizado presentan cantidades crecientes de parásitos a partir del día 70 (día 10 post inóculo Figura 16 parte B En la Figura 16 parte C se construyó una curva Kaplan-Meier que muestra la sobrevivida de los ratones en donde vemos que el grupo no inmunizado muere para el día 67 y el grupo inmunizado sobrevive al mismo inóculo (línea verde). Finalmente, se utilizó la esplenomegalia (manifestación macroscópica de

la expansión de células B y T que se produce con la infección) como medida indirecta de la severidad de la infección. El índice esplénico presentó valores significativamente más bajos en el grupo inmunizado respecto al grupo no inmunizado, indicando una severidad e impacto menor de la infección en el grupo inmunizado (Figura 16 parte D).

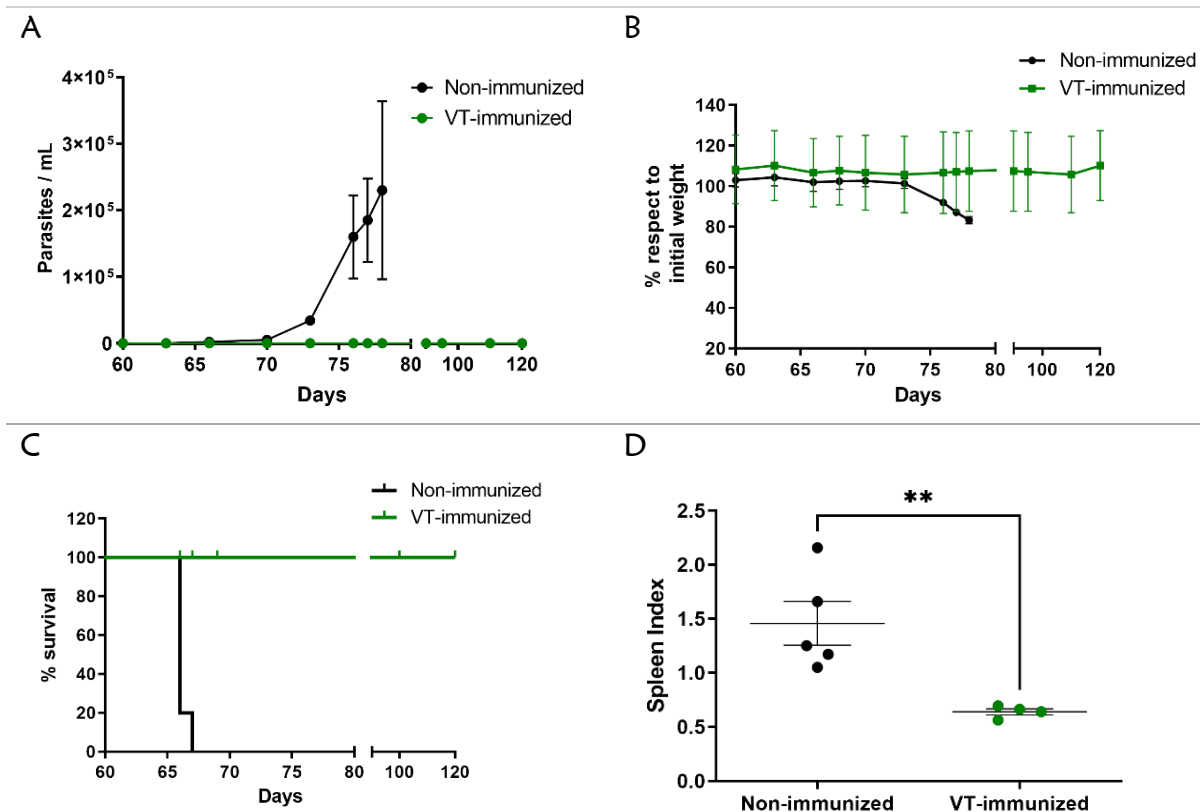


Figura 16. Experimento de determinación de la capacidad protectora.

En la figura se muestra el seguimiento de la parasitemia (A), el porcentaje de pérdida de peso (B), la curva de sobrevivencia (C) y el Índice esplénico (D) del grupo inmunizado (verde) y no inmunizado (negro).

### 13.2. Parte B: Transmisión vertical, tropismo y respuesta placentaria

13.2.1. La infección con las cepas no afecta de manera significativa ni diferencial la capacidad de las ratonas de reproducirse ni tampoco el resultado de la preñez

Con el fin de evaluar la tasa de transmisión vertical de las cepas, desarrollamos un modelo de preñez al final de la fase aguda de la infección cuyo esquema se muestra en la Figura 8 de la sección de materiales y métodos. En este experimento,

evaluamos si la infección con *T. cruzi* afecta algunos parámetros reproductivos de las hembras como son la cópula, la preñez y la ocurrencia de reabsorciones espontáneas. La tasa de cópula, calculada como la presencia de tapón mucoso en las hembras durante los días de cruzamiento, presenta valores significativamente menores en los grupos infectados comparados con el control sin infectar (entre 20-40% para los grupos infectados y 50% para el grupo sin infectar). La tasa de preñez (hembras preñadas sobre el total), fetos viables (fetos viables sobre el total de fetos) y las reabsorciones (reabsorciones sobre el total de fetos) presentaron una alta heterogeneidad entre los experimentos realizados, pero no presentan diferencias significativas con respecto al grupo control (Figura 17). En suma, la tasa de cópula para los grupos infectados disminuye, pero ni la cepa ni la infección afectan la tasa de preñez, la viabilidad de los fetos ni la ocurrencia de reabsorciones espontáneas.

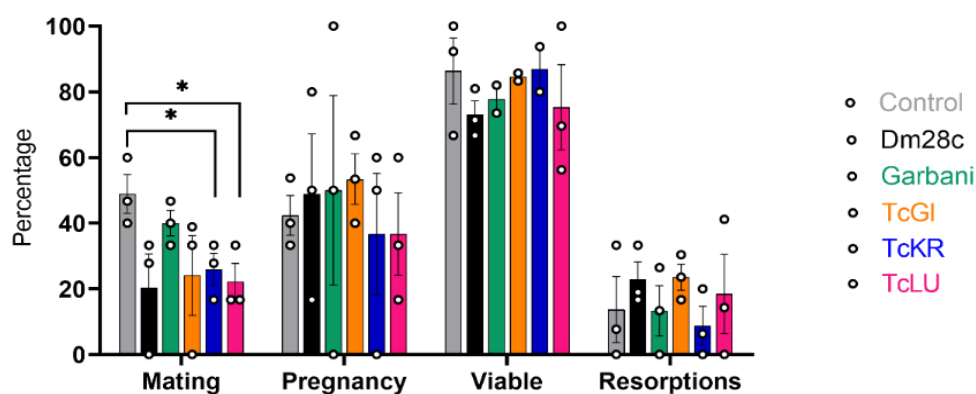


Figura 17. Efecto de la infección sobre parámetros reproductivos y resultado de preñez.

En la figura se observa el porcentaje de los distintos parámetros reproductivos, cópula, preñez, fetos viables y reabsorciones, obtenidos para los grupos infectados con las cepas de estudio.

### 13.2.2. Los aislados de transmisión vertical son más eficientes en su pasaje por la placenta que Dm28c y Garbani

Para determinar el tropismo placentario y la capacidad de las diferentes cepas de transmitirse verticalmente, se interrogó la presencia de ADN de *T. cruzi* tanto en tejido placentario como en tejido fetal. Se fijaron los valores de negatividad para *T. cruzi* utilizando tejido derivado de placentas y fetos no infectados (líneas

punteadas de la Figura 18 Respecto a las placentas evaluadas encontramos que ninguna placenta proveniente del grupo Dm28c estaba infectada y dentro del grupo Garbani 7 placentas de 12 resultaron positivas para *T. cruzi*, y las mismas promedian el valor de positividad más alto de todos los grupos. Dentro de las placentas de los grupos de los aislados de TV vemos que TcKR tiene 2 de 4 placentas positivas, TcGI 1 de 4 y TcLU y 1 positiva de 10, y para los tres los valores de positividad son menores que los que se encuentran en Garbani (Figura 18 parte A). En el tejido de los fetos nacidos de ratonas infectadas con Dm28c tampoco se encontraron valores positivos, 5 fetos de ratonas infectadas con Garbani presentaron valores positivos y 19 negativos, y para los aislados de TV la mayoría de fetos se detectaron como positivos esto resulta en que el valor promedio de los fetos del grupo de TV es positivo mientras que el de Garbani no (diferencias estadísticamente significativas, Figura 18 parte B). Estas diferencias sugieren que el pasaje transplacentario ocurrió, al menos para los aislados de TV, en algún momento al principio de la gestación (no se encuentra carga parasitaria en placentas al punto final) y que la transmisión vertical ocurre con mayor frecuencia en las ratonas infectadas con los aislados de TV que en las cepas de referencia.

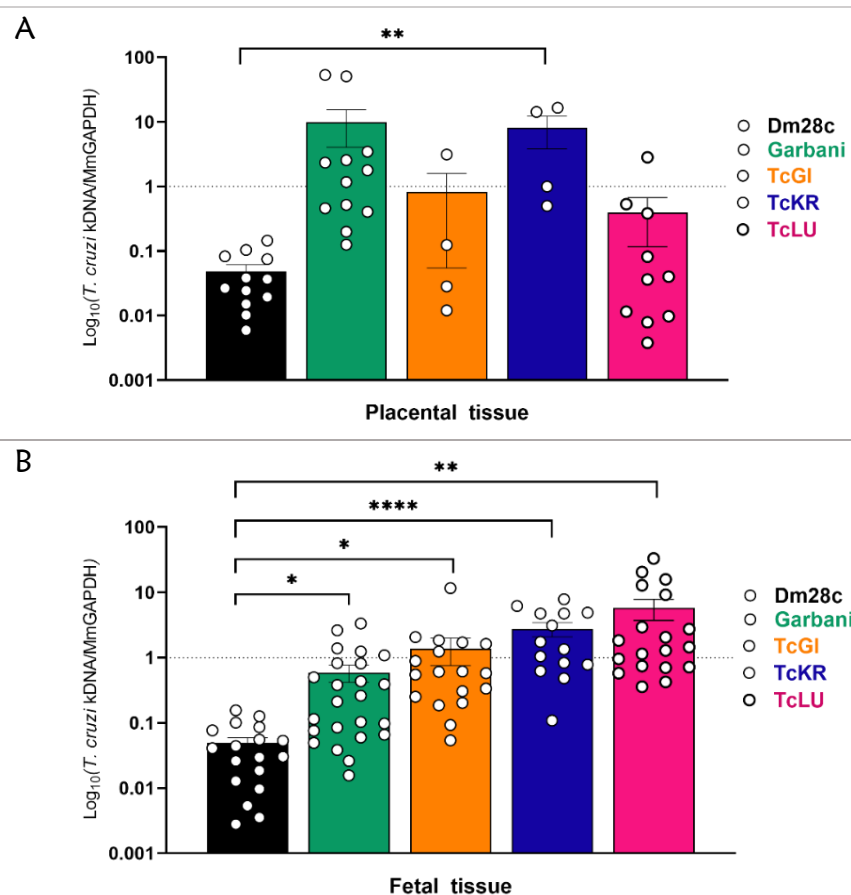


Figura 18.  
Cuantificación  
relativa de  
parásitos en  
tejido  
placentario y  
fetal.

En la figura se  
observa la carga  
parasitaria  
relativa  
detectada para  
tejido  
placentario  
(parte A) y  
tejido fetal  
(parte B). La  
línea punteada  
es la marca de  
positividad.



Los abortos espontáneos son naturales en ratonas, y al final de la gestación se observan como reabsorciones en el útero. Para evaluar el potencial abortogénico de las diferentes cepas de *T. cruzi* evaluamos la positividad en tejido de reabsorciones y lo comparamos con los resultados encontrados anteriormente de positividad de fetos viables. En la **Error! No se encuentra el origen de la referencia.** se observa la proporción tanto de reabsorciones como de fetos viables que fueron positivos para *T. cruzi* y están graficados en porcentaje respecto al total. Si bien se encuentra mucha heterogeneidad en los resultados, éstos son consistentes con lo observado anteriormente. Para la cepa Dm28c no se observan reabsorciones positivas, las reabsorciones del grupo infectado con Garbani tienen un valor promedio mayor al de los fetos viables y lo inverso se observa para las cepas de transmisión vertical: los valores promedio de positividad de los fetos viables son más altos que las reabsorciones, aunque esta diferencia es solo estadísticamente significativa para TcKR ( $p < 0,05$ ). Debido a que la frecuencia de abortos positivos no es mayor a la de fetos viables positivos y en el caso de Garbani, esto no es estadísticamente significativo, por lo cual no podemos afirmar que la infección esté provocando más abortos que lo que naturalmente ocurre en esta especie.

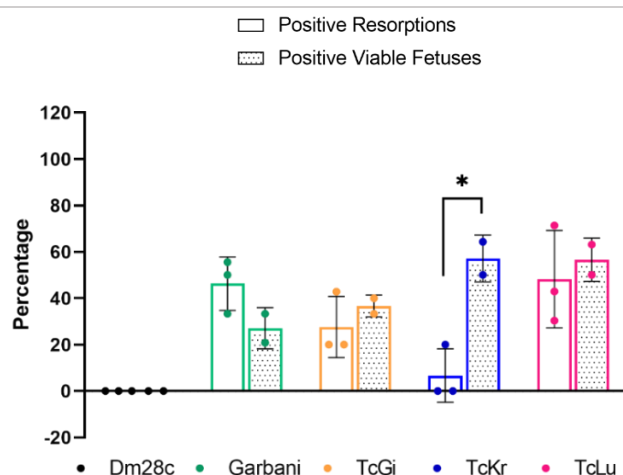


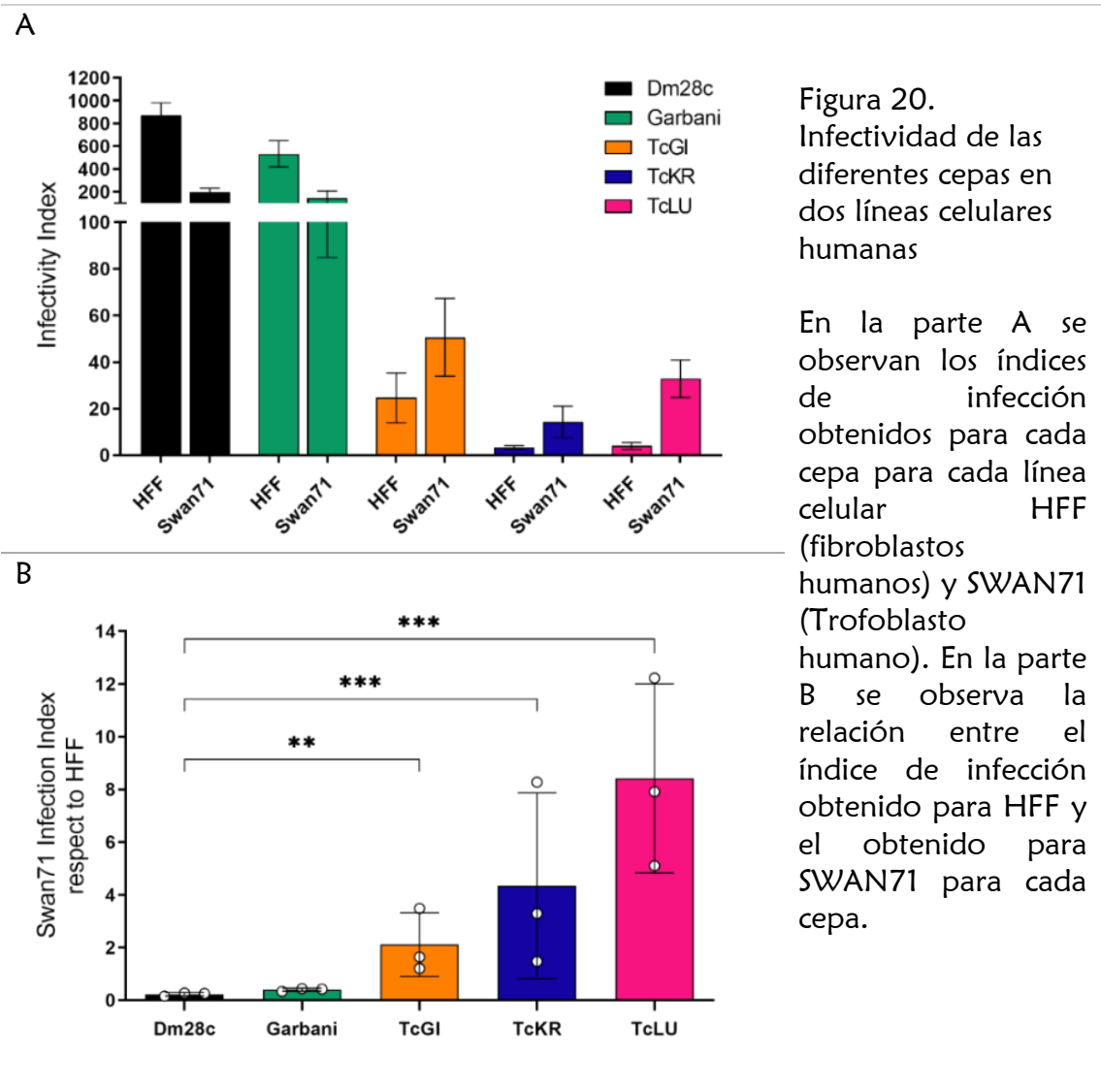
Figura 19. Porcentaje de reabsorciones y fetos viables positivos para *T. cruzi*.

En la figura se muestra el porcentaje de reabsorciones y fetos viables con señal positiva para *T. cruzi* respecto al total de cada categoría.

### 13.2.3. Los aislados de TV son más infectivos en células derivadas de trofoblasto que en fibroblastos comparadas con las cepas de referencia

Luego de dos horas de incubación, todas las cepas fueron capaces de infectar ambos tipos celulares; sin embargo se encontraron diferencias en los índices de infectividad de las cepas de referencia y los aislados de TV (Figura 20 parte A). En HFF, los índices de infección de las cepas TV son menores que los valores

observados para las cepas Dm28c y Garbani (2-40 vs 500-800) indicando que son significativamente menos infectivas. Un resultado similar se observa para SWAN-71 (20-30 vs 150-200) (Figura 20 parte A). Sin embargo al graficar la infectividad de SWAN en función de la infectividad de HFF para cada cepa (Figura 20 parte B) vemos que hay una tendencia invertida: las cepas de referencia son más infectivas en HFF que en SWAN y los aislados de TV, aunque menos infectivos en general, más infectivos en SWAN que en HFF. Dicho en otras palabras, el índice relativo SWAN/HFF (Figura 20 parte B) de las cepas TV se encuentra entre 4-10, mientras que para Garbani y Dm28c es menor a 1. Estos resultados muestran claramente que la infectividad de los aislados de TV está facilitada en células derivadas de trofoblasto y no en fibroblastos humanos, y esto no ocurre en cepas de otros orígenes como Dm28c y Garbani.



#### 13.2.4. Los aislados de TV presentan un patrón único de respuesta placentaria

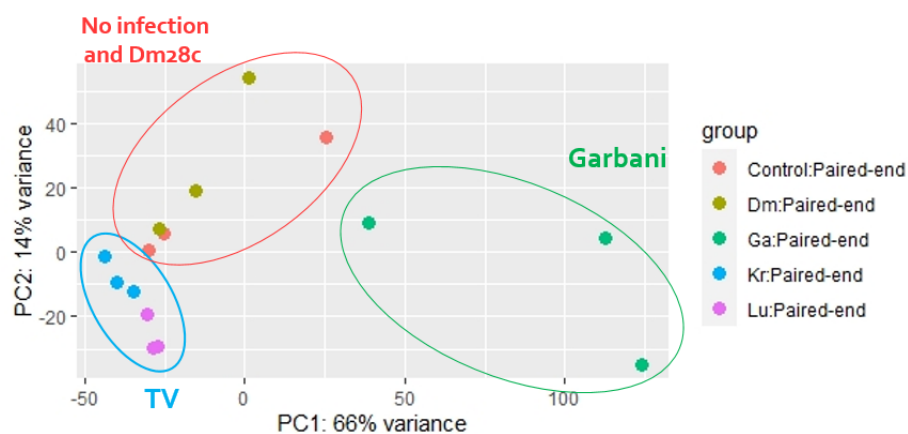
Con el fin de explorar la respuesta placentaria a la infección, realizamos una secuenciación masiva de ARN mensajeros totales presentes en los tejidos placentarios derivados de los diferentes grupos experimentales que, como se mostró anteriormente, presentan diversidad en términos de virulencia y tropismo. De la secuenciación masiva de tres placentas diferentes por grupo experimental (15 réplicas biológicas en total) se obtuvieron en promedio  $\sim 6 \times 10^7$  secuencias por réplica biológica para las cuales se determinó que en promedio 92% mapean con el genoma de *Mus musculus*. Los datos se muestran en la Tabla 2. Las secuencias obtenidas fueron analizadas con el objetivo de obtener los genes diferencialmente expresados (DEGs) para cada condición comparada con el control sin infectar.

**Tabla 2. Secuencias obtenidas a partir del experimento de secuenciación de mRNA de placentas**

| ID de la muestra | Secuencias totales (2x100) | GC%   | AT%   | Q20   | Q30   | % mapeo en genoma ratón |
|------------------|----------------------------|-------|-------|-------|-------|-------------------------|
| Ctr R1           | 62767886                   | 48,98 | 51,02 | 98,5  | 95,39 | 92,5                    |
| Ctr R2           | 62498184                   | 49,51 | 50,49 | 98,52 | 95,47 | 92,9                    |
| Ctr R3           | 62402510                   | 49,01 | 50,99 | 98,51 | 95,51 | 93,6                    |
| Dm R1            | 62990702                   | 49,29 | 50,71 | 98,59 | 95,71 | 91                      |
| Dm R2            | 62393746                   | 49,24 | 50,76 | 98,41 | 95,21 | 93                      |
| Dm R3            | 62400052                   | 49,85 | 50,15 | 98,49 | 95,53 | 89,7                    |
| Ga R1            | 62786212                   | 50,02 | 49,98 | 98,53 | 95,76 | 88,9                    |
| Ga R2            | 43860076                   | 48,73 | 51,27 | 98,52 | 95,73 | 90,1                    |
| Ga R3            | 62469128                   | 49,48 | 50,52 | 98,59 | 95,76 | 91,3                    |
| TcKR R1          | 63065852                   | 49,03 | 50,97 | 98,51 | 95,46 | 92,4                    |
| TcKR R2          | 62309090                   | 48,52 | 51,48 | 98,44 | 95,38 | 92,1                    |
| TcKR R3          | 62636588                   | 48,98 | 51,02 | 98,66 | 95,83 | 90,8                    |
| TcLU R1          | 62883540                   | 48,84 | 51,16 | 98,49 | 95,44 | 94                      |
| TcLU R2          | 62331662                   | 49,22 | 50,78 | 98,62 | 95,78 | 93,8                    |
| TcLU R3          | 63061018                   | 48,8  | 51,2  | 98,64 | 95,79 | 93,7                    |

Tomando en cuenta la alta variabilidad que generalmente presentan este tipo de experimentos *in vivo* realizamos un estudio de componentes principales (PCA) que se muestra en la Figura 21 parte A. El PCA muestra tres grupos claramente definidos: Control + Dm28c (círculo rojo), Garbani (círculo verde) y los aislados de TV (TcKR + TcLU, círculo celeste), estos grupos coinciden con patrones de baja, moderada y alta virulencia. Estos grupos también tienen su correlato en las agrupaciones jerárquicas realizadas con todos los DEG que se muestra en la Figura 22. Para la obtención de todos los genes diferencialmente expresados se consideraron los parámetros de cambio en la expresión (Fold Change, FC) de al menos 1,5 veces ( $-1,5 \geq \text{Log}_2\text{FC} \geq 1,5$ ) y un 99% de probabilidad (valor p ajustado por Benjamini & Hochberg  $\leq 0.05$  o  $0.01$  en los casos que se indica). Las placentas de las ratonas infectadas mostraron un total de 2888 DEGs (1340 inducidos y 1548 suprimidos) respecto al control sin infectar. La cepa altamente virulenta Garbani favorece el cambio de expresión de 2507 DEGs (1114 inducidos y 1393 suprimidos), los aislados de TV de baja virulencia 408 DEGs (232 inducidos and 176 suprimidos), y finalmente Dm28c de moderada virulencia, se comporta casi igual que el control excepto por 2 DEGs inducidos. Para todos los casos la relación entre los genes inducidos y suprimidos es 50/50 y ningún DEG es compartido por todas las condiciones, Garbani comparte solamente el 1,2% de DEGs con el resto de los grupos (29/2507) y TcLU comparte el 33,5% con TcKR (106/316).

A



B

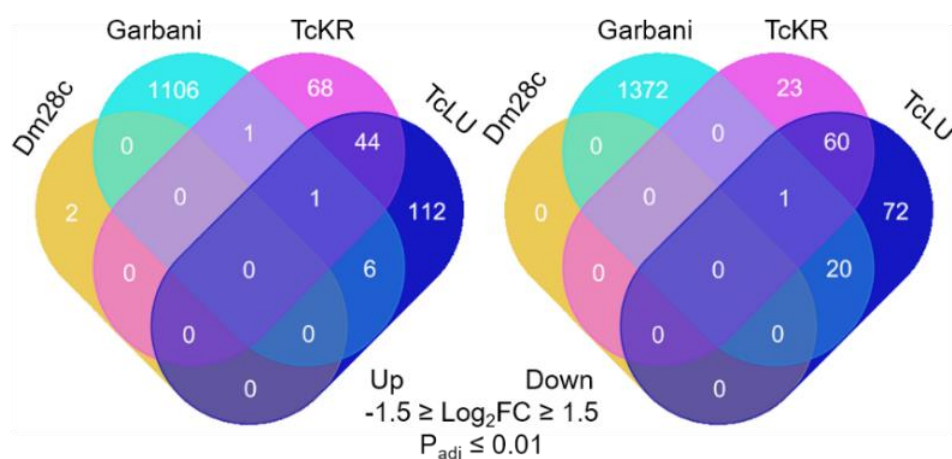


Figura 21. Transcriptómica de placenta, PCA y genes diferencialmente expresados.

Análisis de componente principales que muestra el agrupamiento de las diferentes muestras biológicas basado en los datos de expresión, los diferentes colores representan las tres réplicas biológicas dentro de cada grupo experimental (A). Genes diferencialmente expresados respecto al control ( $-1,5 \geq \text{Log}_2\text{FC} \geq 1,5$ ;  $P_{\text{adj}} \leq 0,05$ ) de las diferentes condiciones experimentales (B).

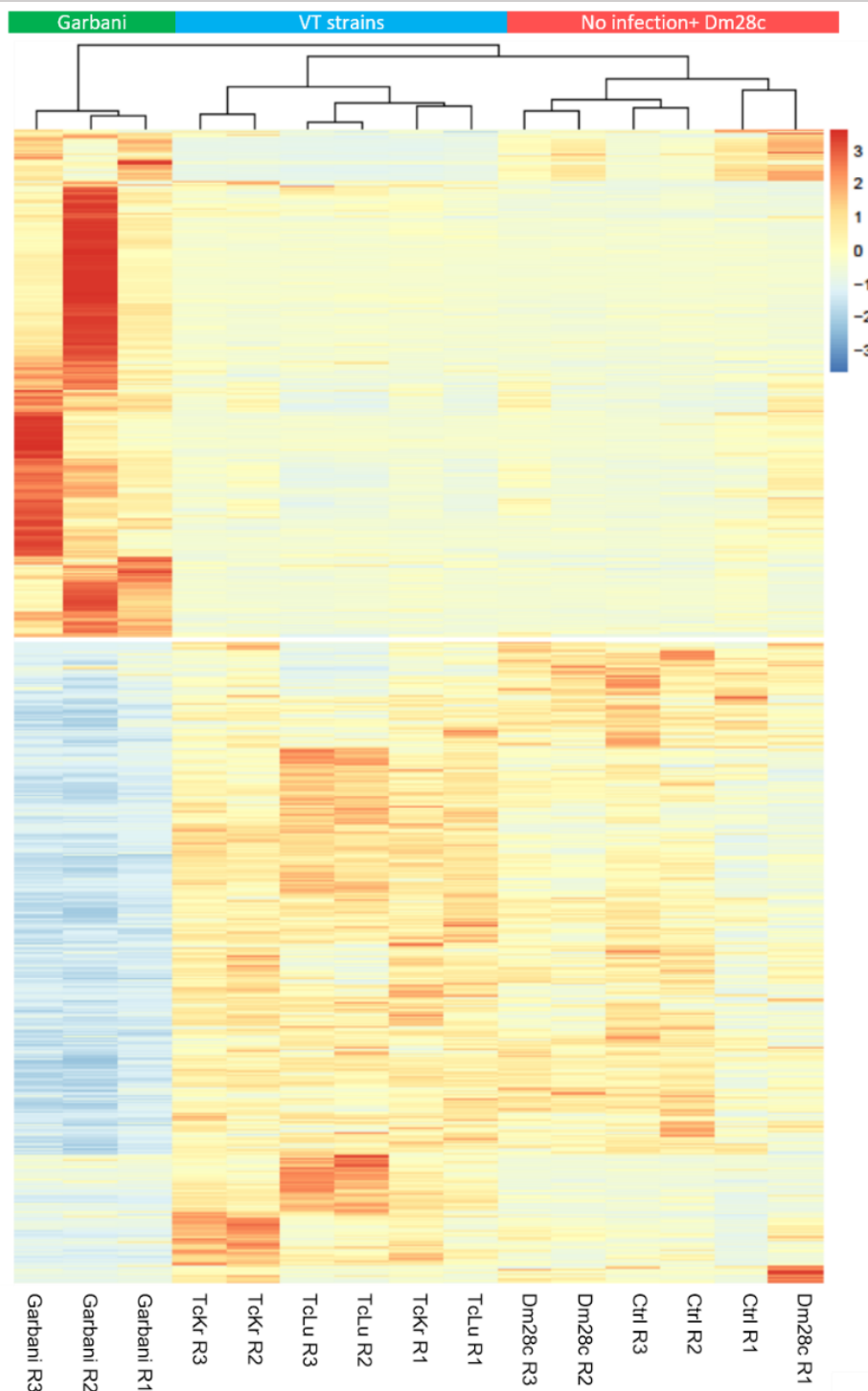


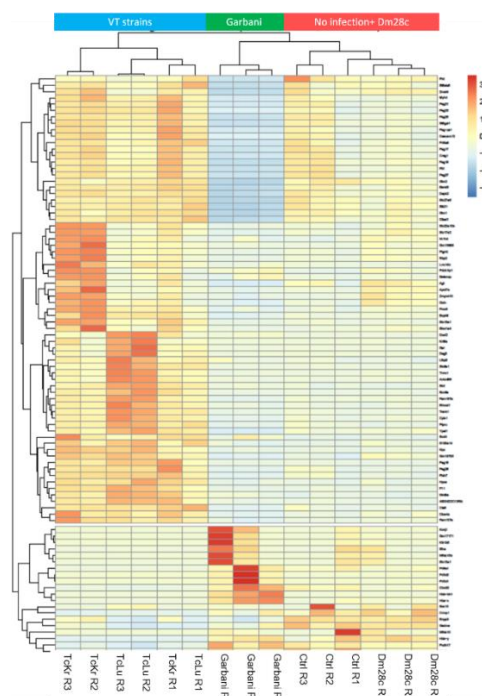
Figura 22. Agrupamiento jerárquico de los genes diferencialmente expresados (DEGs).

Agrupamiento jerárquico de conteos normalizados obtenidos para cada DEG ( $-1,5 \geq \text{Log}_2\text{FC} \geq 1,5$ ;  $P_{\text{adj}} \leq 0,05$ ) para cada réplica biológica. Según el comportamiento en términos de expresión las muestras se agrupan en 3: Control+Dm28c (rojo), aislados de transmisión vertical (celeste) y Garbani (verde).

Cuando graficamos los 30 DEG con valores de cambio más significativo ( $P_{adj} \leq 9,5 \times 10^{-5}$ ) (Figura 23 parte A) y los 30 DEG que muestran mayores valores de cambio ( $\log_2 FC \geq 3,13$ ) (Figura 23 parte B) para cada condición, vemos un patrón de imagen especular entre los aislados de TV y Garbani (los genes inducidos en Garbani se encuentran suprimidos o incambiados en los aislados de TV y viceversa). Este patrón podría estar indicando estrategias de pasaje transplacentario que son diametralmente opuestas en términos de los genes que inducen.

Profundizando aún más en los procesos biológicos vemos que los resultados se corresponden con los resultados obtenidos del análisis de ontología de genes (GO) (Figura 24), en donde los términos de GO más representados en los genes inducidos por el pasaje transplacentario (Figura 24 parte A) son diametralmente opuestos en Garbani que en TV. Particularmente, entre los procesos suprimidos para los aislados de TV se encuentran algunos relacionados a mitosis y meiosis (GO0000347, GO0140013, GO0007062, GO0000212, GO0051383), ciclo celular (R-MMU-1640170) y síntesis, replicación y daño del ADN (GO0006260, GO0071897, GO0000731, GO0006974). Procesos suprimidos exclusivamente en Garbani involucran transporte, metabolismo lipídico, morfología y adhesión celular (GO0015849, GO0044242, GO0048858, GO0051047, GO0034330, R-MMU-3000157, KEGG\_hsa4540). Respecto a los procesos estimulados exclusivamente en Garbani encontramos los relacionados a respuesta inmune, inflamación y proteínas ribosomales (WP163, GO0042110, GO0006954), mientras que los aislados de TV inducen genes relacionados con el transporte hacia adentro de la célula y la secreción (algunos suprimidos en las placentas del grupo Garbani, ver Figura 34 y Figura 35 en el Anexo 1 (GO0098657, GO0051047). Estos resultados indican que el pasaje transplacentario de las diferentes cepas de *T. cruzi* evaluadas genera respuestas muy diferentes en la placenta. El desglose gen a gen de los términos GO modulados con más representación estadística se muestran en el Anexo 1.

A



B

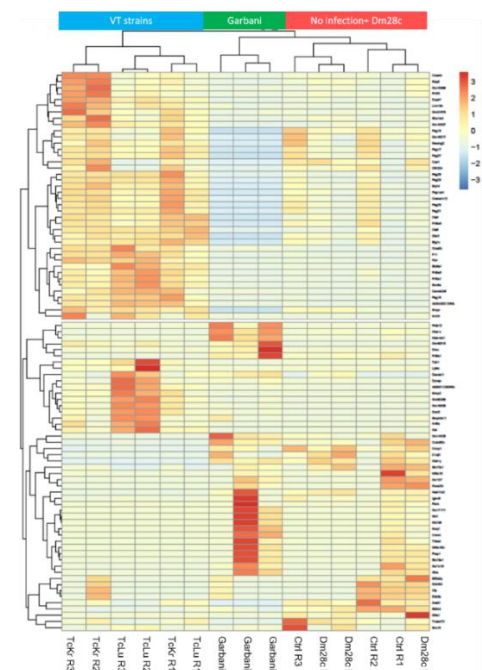


Figura 23. Top 30 de genes que más cambian y top 30 de genes con cambio más significativo.

Agrupamiento jerárquico de conteos normalizados obtenidos para cada gen, en este caso los 30 genes que cambian de manera más significativa (A) y los 30 que más cambian (B) para cada condición experimental completando 90 genes en total en cada Heatmap.



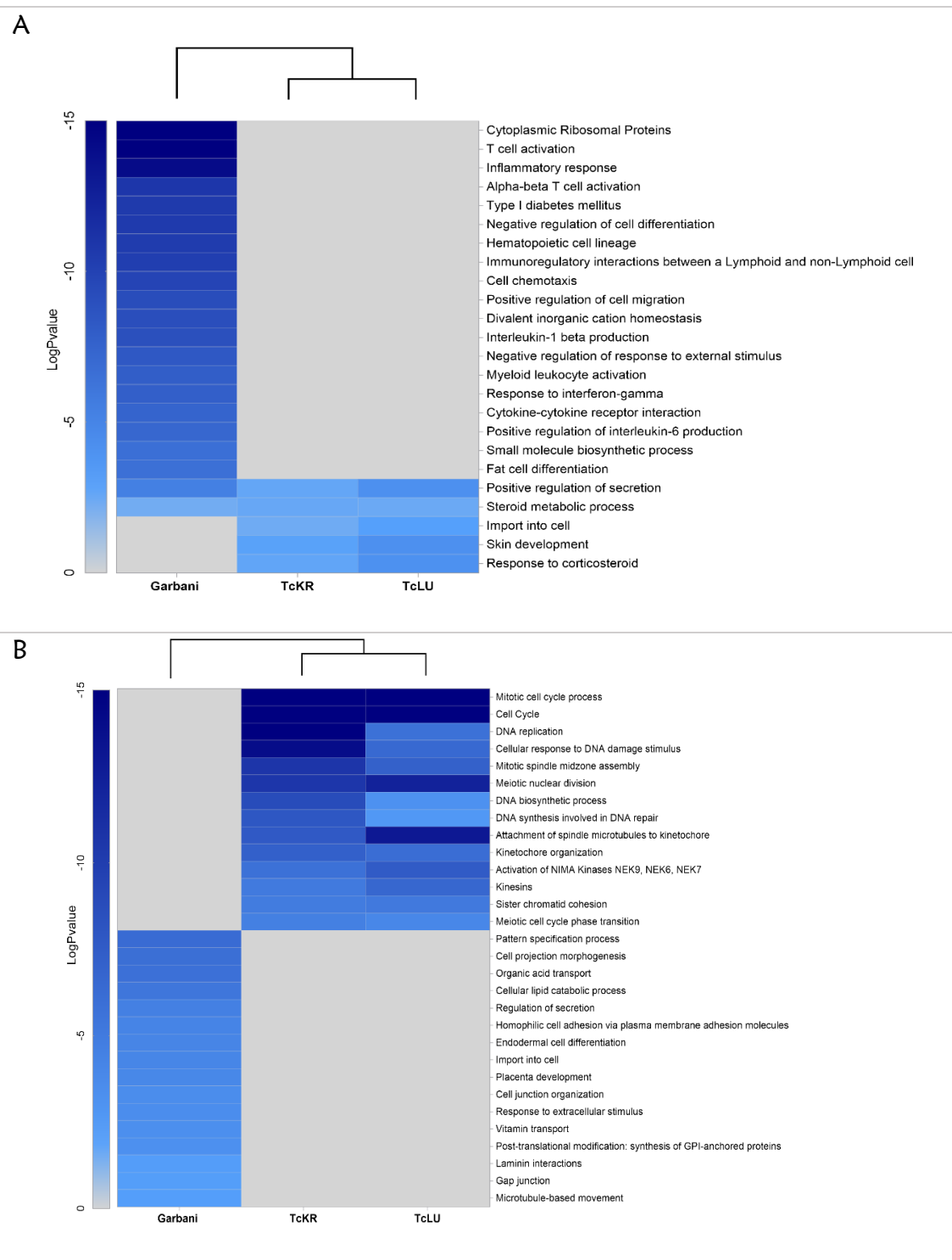


Figura 24. Enriquecimiento de genes en términos de ontología. Genes diferencialmente expresados que están inducidos (A) y que están suprimidos (B) respecto al control en las placentas de cada condición experimental (Garbani, TcKR, TcLU) agrupados según el enriquecimiento en cada término de ontología de genes. Menor Log2Pvalue mayor la representación de genes acumulados en ese término.

Otras familias génicas que están reguladas de manera inversa y que son de relevancia en enfermedades infecciosas se muestran en la Figura 25. Entre estos podemos mencionar genes con roles centrales de inmunomodulación en la interfase materno-fetal como por ejemplo los que codifican para *Pregnancy related glycoproteins (psg)*, *Carinoembryonic antigen cell adhesion molecules (ceacam<sub>1</sub>)* y *prolactin (prl)*. También encontramos genes relacionados a la permeabilidad celular y la unión célula-célula y célula-matriz como canales de sodio (*scn*), transportadores de solutos (*slc*), desmogleinas (*dsg*) y claudinas (*cld*). Encontramos, además, regulación diferencial en genes de metaloproteinasas, matrixinas (*mmp*) y adamolisinas (*adam*) y también a nivel de sus inhibidores tanto intracelulares (*timp*) como secretados (*sfrp*). Como ya fue mencionado, genes involucrados en mecanismos de defensa su expresión está aumentada en Garbani y disminuida en TV como por ejemplo las metalotioneinas (*mt*), proteínas que secuestran metales necesarios para el crecimiento de algunos parásitos, factores de señalización de linfocitos (*slam*) y factores pertenecientes al inflamósoma.

Otra familia génica diferencialmente modulada es la familia de proteínas S100 que tienen función inmunomoduladora y que participa en lo que se denomina “inmunidad nutricional”, secuestrando metales esenciales para algunos parásitos de manera similar que las metalotioneinas. La supresión de genes *psg* y *s100* también se ha asociado a un modelo placentario de restricción del crecimiento intrauterino (IUGR). Muchos genes asociados a desarrollo placentario y al funcionamiento saludable de la placenta están suprimidos en éste modelo. En este sentido, nos interesó ver cómo se comportaban los genes relacionados a IUGR en las diferentes condiciones experimentales y encontramos que en las placentas del grupo Garbani, un 70% de genes relacionados a IUGR estaban suprimidos, contrario a lo observado en las placentas de TV, en las cuales la mayoría de los genes no cambia o están aumentados (Figura 25).

En resumen, los tres grupos descritos anteriormente vinculados a la relación parásito-placenta, tienen un correlato en la respuesta diferencial inducida en el tejido placentario: mientras que las placentas de ratonas infectadas con la cepa Dm28c se comportan prácticamente igual a las placentas del control sin infectar, las placentas de ratones infectadas con las cepa Garbani y los aislados de TV presentan sus propios perfiles de modulación en términos de cantidad de genes y de la ontología de los mismos incluso llegando a mostrar en algunos casos un comportamiento diametralmente opuesto, remarcando la presencia de dos tipos

de parásitos bien diferentes en términos de su interacción con la interfase materno-fetal.

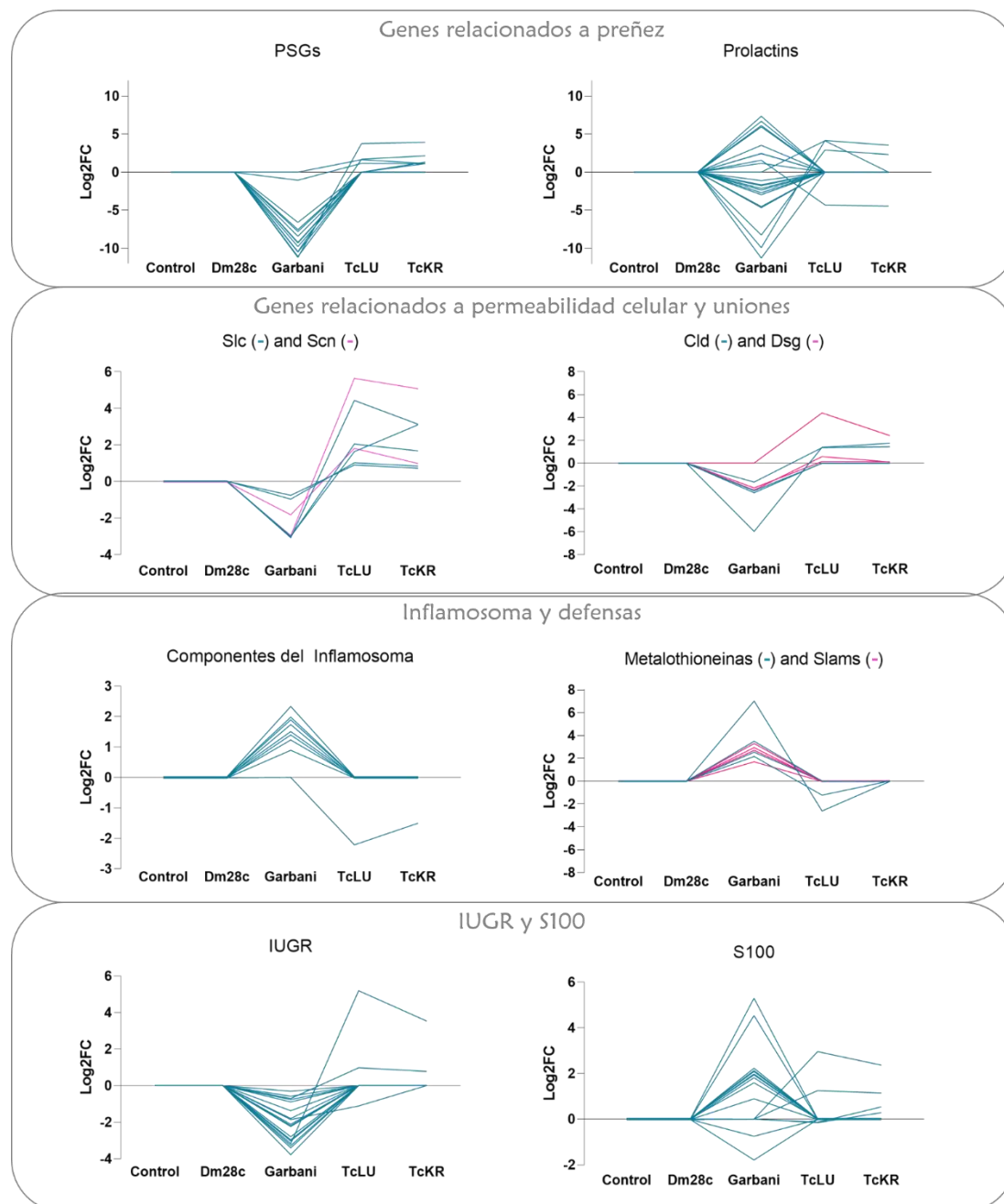


Figura 25. Familias génicas específicas con modulación diferencial entre las placentas de Garbani y los aislados de TV.

## 14. DISCUSIÓN

*Trypanosoma cruzi* es un parásito paradigmático ya que, además de ser transmitido por insectos triatomíneos y capaz de infectar una amplia variedad de mamíferos, puede también transmitirse verticalmente y prescindir del vector, y esto es lo que mayoritariamente ocurre en zonas no endémicas y zonas en donde la transmisión vectorial está interrumpida [38]. Podemos afirmar que en términos naturales y posiblemente ancestrales, *T. cruzi* tiene dos formas de transmisión: la forma vectorial (oral o por las heces) y la forma transplacentaria, siendo el resto de las formas de transmisión asociadas a actividades humanas modernas (transfusiones, transplantes, accidentes de laboratorio, etc.).

Para contestar preguntas en torno a las características naturales de la transmisión vertical es que seleccionamos un escenario particular: una región con transmisión vectorial interrumpida durante al menos 25 años [13] y en donde el control en bancos de sangre y durante el embarazo son obligatorios en todo el sistema de salud (Ordenanza N° 1119/2018). Nos enfocamos en el estudio de casos clínicos de bebés positivos que cumplieran con los siguientes requisitos: i) residir en áreas no endémicas, ii) que la enfermedad de Chagas de la madre fuera detectada en rutinas de embarazo, iii) que las madres no presentaran síntomas clínicos de la enfermedad, y vi) madres con una alta probabilidad de haber adquirido la enfermedad por transmisión vertical puesto que sus madres y/o abuelas también son seropositivas. A partir de tres de estos casos se aislaron mediante xenodiagnóstico e infección en ratón, tres cepas de *T. cruzi* y se confirmó que todas pertenecen al linaje híbrido BCb (DTU TcV) (Figura 10). Durante la caracterización observamos que, mientras que las cepas de referencia (Dm28c y Garbani) viraron a epimastigotas en el período esperado, los aislados no fueron capaces de realizar el pasaje de tripomastigota a epimastigota *in vitro*, que ocurre naturalmente en el intestino del insecto vector, quedando en forma de esferomastigota (Figura 11). Este resultado sugiere fuertemente que *T. cruzi* presenta una plasticidad que le permite especializarse en la transmisión no vectorial, perpetuando así la infección prescindiendo del vector. Este comportamiento recuerda a lo que ocurre en trypanosomas africanos que se han independizado de la transmisión vectorial ancestral, específicamente nuestro grupo observó que *Trypanosoma vivax*, con la introducción al continente americano y la consecuente transmisión mecánica, ocurrió una selección de parásitos especializados en el ciclo mamífero, que significó también la pérdida de

capacidad codificante del genoma mitocondrial [94]; el estudio de los genomas nucleares y mitocondriales de estos aislados puede darnos pistas sobre los mecanismos moleculares detrás de dicha adaptación.

Con el objetivo de evaluar la virulencia de estos aislados, realizamos diferentes infecciones en ratón que mostraron que los mismos tienen un perfil similar al observado en humanos: una presentación asintomática de baja virulencia que difiere de la presentación de las cepas Garbani y Dm28c de alta y moderada virulencia respectivamente (Figura 13). En este contexto nos preguntamos si los aislados eran capaces de colonizar los diferentes órganos o, en otras palabras, si la estrategia de persistencia de *T. cruzi*, seguía estando presente en estos aislados, y encontramos que tanto la capacidad de invasión y colonización en diferentes tejidos como la inducción de la respuesta inmune sistémica es similar (Figura 14 y Figura 15). Los aislados de TV inducen una respuesta inmune que es comparable en el nivel y en perfil con la respuesta inducida por cepas más virulentas: a partir de ARN del bazo se infiere una inducción de una respuesta de tipo Th1, caracterizada por el aumento de INF $\gamma$  e IL12, previamente descrita para la infección en esta cepa de ratón [95]. No hay diferencias significativas entre los niveles de expresión de las citoquinas en las ratonas infectadas con los aislados de TV y las cepas virulentas, excepto por las citoquinas anti inflamatorias IL10 e IL4 que muestran mayores niveles de expresión en las cepas Dm28c y Garbani, indicando una mayor tendencia al control de la inflamación. A los 60 días los parásitos en los órganos se vuelven indetectables, y también se alcanzan niveles basales de expresión de citoquinas en todos los grupos experimentales. Sin embargo, IL12 permanece aumentada de manera significativa en el grupo de ratonas infectadas con TV, lo cual puede explicar en parte la baja virulencia de estos aislados, teniendo en cuenta que esta interleuquina activa una respuesta Th1, además de estimular la producción de INF $\gamma$ . Esta diferencia a nivel de la virulencia de las cepas no induce una respuesta inmune diferencial de fase aguda, sino más bien las diferencias podrían estar en el pasaje a la cronicidad. Estos resultados hacen necesario un estudio más profundo de la respuesta inmune durante la fase crónica, a través de estudios de perfiles de citoquinas e inmunidad celular, de forma de profundizar la caracterización del estado inmunológico diferencial encontrado en nuestro trabajo.

A continuación se evaluó la susceptibilidad de las diferentes cepas a nifurtimox y benznidazol, y los aislados fueron similarmente sensibles a ambos compuestos, y

aunque existe una tendencia de los aislados de TV a ser más susceptibles a nfx y más resistentes a bzn comparados con las cepas de referencia, estas diferencias no son estadísticamente significativas y los valores se encuentran dentro de los rangos reportados para otros aislados en la literatura [67]. Este resultado sugiere que no hay diferencias a nivel metabólico entre las diferentes cepas y también es importante mencionar que no encontramos asociación entre la susceptibilidad a fármacos y el linaje, aportando evidencia a la dificultad que tiene asociar características fenotípicas de los diferentes linajes a sus diferencias genéticas.

La baja virulencia de los aislados en combinación con una respuesta inmune similar al de otras cepas, nos motivó a evaluar su capacidad de inducir una respuesta protectora. Nuestros resultados son muy alentadores ya que la infección con los aislados TV fue capaz de proteger a los ratones de una infección con dosis letal de la cepa Garbani, por lo cual es posible aprovechar esta atenuación natural como punto de partida para el desarrollo de una vacuna para la enfermedad de Chagas. Las vacunas a parásitos vivos se han explorado como una opción profiláctica y varios trabajos muestran la eficacia de cepas naturalmente atenuadas y/o atenuadas mediante delección génica [22, 96-100].

Una vez demostrado que los aislados de TV se comportan de manera similar entre las presentaciones clínicas de los casos originales y nuestro modelo experimental, nos preguntamos: ¿Son estos aislados capaces de transmitirse verticalmente de forma más eficiente que cepas de otros orígenes? Para ello desarrollamos un modelo de preñez y evaluamos el efecto de la infección sobre parámetros reproductivos y la transmisión vertical. No encontramos diferencias significativas en la tasa de preñez, viabilidad de los fetos, ni en la tasa natural de reabsorciones entre los diferentes grupos infectados. Por otro lado, la tasa de cópula disminuyó significativamente con respecto al control y de manera similar para todos los grupos infectados, estando esto en acuerdo con estudios anteriores [101] y sin afectar la tasa de preñez. En la bibliografía se ha descrito correlación entre la carga parasitaria con la transmisión vertical [43, 102], en nuestro experimento todas las ratonas están en fase crónica durante la cópula, sin parasitemia detectable, y la carga parasitaria en útero (a los 30 días) presenta valores similares entre las diferentes cepas (incluso hay una tendencia mayor para Dm28c y significativamente menor en TcKR, ver Figura 14 parte A). A la luz de nuestros resultados, las diferencias en las tasas de transmisión vertical no son atribuibles a

la carga parasitaria, esto refuerza la idea de que son las características propias de los diferentes aislados los que están favoreciendo la transmisión vertical.

La detección de ADN parasitario en los tejidos uterino, placentario, fetal y de reabsorciones, nos permitió identificar tres escenarios distintos:

- 1- La cepa Dm28c (de virulencia moderada) presenta altas cargas parasitarias en útero, pero los parásitos son indetectables en placentas, fetos y reabsorciones.
- 2- La cepa Garbani (de alta virulencia) tiene menor carga parasitaria en útero (particularmente a 60 dpi). Las placentas y reabsorciones son positivas pero los fetos presentan menor tasa de positividad y carga parasitaria con respecto a las obtenidas para los aislados de TV.
- 3- Los aislados de TV (baja virulencia) muestran las menores cargas parasitarias en útero (valores bajos o indetectables), las placentas de estos grupos son en su mayoría negativas, pero los fetos presentan altas tasas de positividad y carga parasitaria.

Estos resultados refuerzan la hipótesis de partida de que estas cepas están especializadas en la transmisión vertical porque con menor virulencia y baja colonización de útero y placenta, presentan la mayor tasa de transmisión. A los 30 días post infección, los úteros están infectados todos por igual (valores positivos en Figura 14) pero las placentas a los 60 días no (Figura 19): las placentas de Garbani siguen infectadas mientras que en las de TV no se detectan parásitos, éste resultado nos indica que dicho pasaje debe haber ocurrido en algún momento temprano durante la gestación. Por otro lado Garbani presenta altas cargas parasitarias en la placenta y menor tasa de transmisión (una estrategia menos eficiente), por lo que posiblemente el pasaje sea una consecuencia de las altas parasitemias sostenidas en el tiempo, que a su vez generan un estímulo inflamatorio constante y posiblemente resulte en algún nivel de daño. Una hipótesis que surge de estos resultados es que en las cepas altamente virulentas el pasaje se produzca en todas las etapas de la gestación, como consecuencia de un comportamiento agresivo para el hospedero, mientras que para las cepas TV exista una ventana de tiempo donde la misma se produzca. El monitoreo de carga a diferentes tiempos durante la gestación es necesario para testar esta hipótesis. Finalmente, también resulta de mucho interés, si bien no se aborda en profundidad en esta tesis, el hecho de que Dm28c no tenga la capacidad de transmitirse verticalmente.

En este trabajo de tesis evaluamos la capacidad de pasaje transplacentario en un modelo murino *in vivo*, encontrando que los aislados de TV pasan a los fetos con más frecuencia que las cepas de otros orígenes. Teniendo en cuenta que la placenta murina difiere de la humana en términos de las capas que separan la sangre fetal y la materna, nos pareció relevante evaluar el tropismo en trofoblasto de origen humano y para ello evaluamos la infectividad en SWAN 71. Lo que observamos es que la infección y replicación de los aislados de transmisión vertical está facilitada en trofoblasto y no en fibroblastos, y esto no ocurre para las cepas Garbani y Dm28c, indicando que se debe a características propias de las cepas. El tropismo diferencial para cepas de *T. cruzi* ha sido descrito anteriormente, específicamente un aislado de Chagas congénito (BCb/TcVI) mostró mayor tropismo en células de trofoblasto BeWO comparado con la cepa Y (Cc/TcII) [69]. Una vez más nuestros resultados refuerzan la idea de que los genotipos no Aa (TcI), pero más importante aún, la adaptación fenotípica a la transmisión transplacentaria, juegan un rol importante en tropismo tisular y que estos cambios adaptativos contribuyen directamente a la transmisión vertical.

A la luz de los tres escenarios descritos anteriormente, en donde dos de ellos logran transmitirse verticalmente nos preguntamos ¿cuáles son los mecanismos moleculares placentarios que favorecen la transmisión vertical? Para responder esta pregunta, decidimos evaluar los perfiles de expresión génica en las placentas a término de los diferentes grupos infectados, por estudios de RNAseq. Un primer análisis de este experimento muestra una correspondencia con los grupos anteriormente mencionados: Dm28c, que no atraviesa la placenta se agrupa con el control sin infectar, los aislados de TV TcKR y TcLU que atraviesan la placenta agrupan juntas, y por último Garbani se agrupa alejado de los demás y se observa en la Figura 21.

De los aproximadamente 3000 genes diferencialmente expresados, la mayoría corresponde a Garbani (alta virulencia), aproximadamente el 13% (~400 genes) a los aislados de TV (baja virulencia) y únicamente dos a Dm28c. Es sorprendente además que solo 29 genes son compartidos por Garbani y TV, y esto nos lleva a pensar que no hay una única estrategia de transmisión transplacentaria de *T. cruzi*. Por otro lado, sí hay correlación entre el hecho de que Dm28c no infecta ni atraviesa la placenta con la no inducción de cambios, lo cual puede estar indicando que el estado homeostático de la placenta (el del control) es un estado que no permite el pasaje de *T. cruzi* y, por ende, éste debe modificarlo para atravesarla.



Cuantitativamente la cepa de alta virulencia genera 10 veces más cambios a nivel de expresión génica cuando se la compara con las cepas TV, lo cual sugiere que una de las consecuencias de la alta virulencia es la transmisión vertical, no ya como tropismo placentario, sino como una alta capacidad infectiva y generación de daño, mientras que las cepas TV habrían sido seleccionadas evolutivamente para la transmisión vertical, tanto por su tropismo placentario como por su capacidad de remodelar los perfiles de expresión génica de este órgano. O dicho de otro modo, por un lado tenemos una cepa altamente agresiva que infecta indistintamente órganos y tejidos y los desorganiza, entre ellos la placenta, lo cual explica *per se* la transmisión vertical, mientras que en el otro extremo se ubican cepas que no generan patología, pero son capaces de persistir y transmitirse verticalmente. Que estas cepas además hayan perdido su capacidad de epimastigogénesis, reafirma esta observación, y nos lleva nuevamente a la Figura 4, donde planteamos que existen dos grandes formas de transmisión de la enfermedad de Chagas: vectorial y no vectorial. El parásito en su gran variabilidad está biológicamente preparado para ambas. Al comparar los perfiles desde el punto de vista del parasitismo, vemos que la cepa Garbani es un "buen patógeno pero un mal parásito", que lleva a la muerte, mientras que las cepas TV no son patogénicas, logrando el éxito desde el punto de vista parasitológico.

Es de destacar que cuando analizamos la ontología génica (Figura 24) vemos que prácticamente todos los procesos modulados para un grupo no están presentes en el otro grupo. Si bien el equilibrio en la modulación es 50/50 en términos de supresión/estimulación de genes (Figura 21), en los aislados de TV los genes se agrupan de manera tal que la respuesta está enriquecida en la supresión de procesos biológicos (mitosis, meiosis y ciclo celular, Figura 24 parte B) mientras que en Garbani se enriquecen procesos que se inducen (respuesta inmune, inflamación y proteínas Ribosomales, Figura 24 parte A). Este resultado nos está indicando que en las placentas de los grupos de TV se está induciendo un estado de detención del ciclo celular, mientras que en las placentas de las ratonas infectadas con Garbani gobierna un estado de estimulación de sistema inmune, esto también lo vemos en el mapa de todos los genes relacionados a respuesta inmune y como se modulan que se muestra en la Figura 36 del Anexo 2. Este resultado sorprendente se puede observar a todos los niveles: en los mapas de agrupamiento jerárquico (Figura 21 y 22), en aquellos de enriquecimiento de procesos biológicos (Figura 23) y en los mapas de cada uno de ellos desglosados

gen a gen (Figura 26 a la 35), las respuestas constituyen imágenes especulares, en donde los genes inducidos en Garbani son suprimidos o incambiados en los aislados TV y viceversa. Esto indica claramente, y es un hallazgo a destacar de esta tesis, que existen dos grandes estrategias de pasaje transplacentario, evidenciado por dos tipos de respuestas, que dependen tanto del origen como de la virulencia de las cepas. Retomando los dos escenarios discutidos previamente para las cepas teniendo en común que logran transmitirse verticalmente: mientras que la cepa Garbani pasa dejando una huella inflamatoria, los aislados de TV favorecen un estado inmunológicamente silencioso y de detención del ciclo celular. A continuación nos detendremos en los procesos más relevantes y que constituyen características distintivas de ambos tipos de respuesta. Desde este punto de vista, podemos pensar en la situación de Dm28c que perdió la capacidad (o nunca la tuvo) de modificar la expresión génica y romper la homeostasis placentaria con el objetivo de pasar, o dicho de otro modo, es necesario alterar la expresión génica para poder transmitirse verticalmente.

#### Genes relacionados a embarazo

Un primer hallazgo en nuestro análisis tiene que ver con genes que codifican familias génicas características del embarazo. La respuesta placentaria a Garbani, la cepa de alta virulencia, reprime la expresión de varios miembros de la familia *psg* (Pregnancy Related Glycoproteins) e induce la expresión de varios genes *prl* (familia de las prolactinas). Las PSG constituyen las proteínas trofoblásticas más abundantes durante la preñez y tienen funciones importantes como inmunomoduladoras, pro-angiogénicas y antiplaquetarias en la interfase materno fetal [103]. Recientemente se han descrito como activadores de las citoquinas anti-inflamatorias TGFb1 y TGFb2 [104] y se ha visto que en ratones tratados con PSG se disminuye la producción de TNFb e INFg (pro-inflamatorias) y aumentan los linfocitos T regulatorios y la activación alternativa de macrófagos (reparación y remodelación tisular luego de la inflamación) [105]. La disminución en los niveles normales de PSG se correlaciona con complicaciones del embarazo y restricciones en el crecimiento fetal (revisado en [103]). En nuestro experimento, las placentas del grupo infectado con Garbani responden suprimiendo la expresión de 11 genes *psg* mientras que están aumentados o incambiados en las placentas de TV. Este escenario (de genes *psg* suprimidos) puede ser en parte responsable de que estas placentas no sean capaces de controlar la respuesta inmune debido el rol inmunomodulador descrito, los niveles de *psg* de las placentas de TV (iguales a los

del control) coinciden con el escenario de control de la respuesta inmune. Adicionalmente, la inducción de algunos genes *psg* en los aislados de TV (*psg16*, *psg29*, *psg29*) podría estar específicamente modulados a favor de la estrategia parasitaria.

La prolactina es una hormona pituitaria que se expresa en endometrio y útero y durante el embarazo es producida por el trofoblasto placentario [106]. Varios miembros de la familia de las prolactinas se encuentran modulados en las placentas de nuestros grupos experimentales, 22 genes cambian su expresión frente a la infección ( $p_{adj} < 0.05$ ), algunos la aumentan y otros la disminuyen, pero lo que llama la atención es que ninguno de estos genes se comporta igual entre Garbani y TV: aquellos genes inducidos en TV (*prl3a1*, *prl8a6* y *prl51*) no cambian en Garbani, y *prl6a1* cuya expresión está reprimida en TV, aumenta en Garbani, el resto aumenta o disminuye en Garbani y no cambia en TV. Esta proteína, principalmente conocida por su función en la producción de leche, constituye una familia con diversas funciones como modulación metabólica, inmunomodulación y regulación de las infecciones microbianas en la interfase materno-fetal [106]. Se ha propuesto que tienen capacidad de aumentar la replicación del parásito *Toxocara canis* y su migración al útero y glándulas mamarias, habilitando la transmisión vertical [107] y se han encontrado niveles altos de prolactina en pacientes seronegativas para *Toxoplasma gondii* [108] (en comparación con seropositivas), y esto estaría asociado a su capacidad de restringir la replicación parasitaria e infección productiva (revisado en [109]). Específicamente en Chagas agudo, se ha encontrado un desbalance en el eje hipotálamo hipofisario protagonizado por disminución de la hormona de crecimiento y la prolactina [110]. Aunque no podemos decir nada sobre la expresión global de prolactina en las ratonas de nuestras diferentes condiciones experimentales, la expresión de estos genes relacionados a placenta y embarazo muestra una vez más la modulación diferencial entre los grupos Garbani y VT en donde la mayoría de cambios ocurren en Garbani, posiblemente relacionados al rol de la prolactina en la regulación de la respuesta inmune. Los aislados de TV pasan a través de la placenta afectando la expresión de estos genes en menor medida, y manteniendo la homeostasis placentaria, afectando lo menos posible el correcto funcionamiento de la misma aunque modulando lo que creemos son factores clave para aumentar la tasa de transmisión vertical sin generar daño. Sería interesante explorar si la administración exógena de éste tipo de proteínas (como PSG o prolactina) logra disminuir el fenotipo de daño y reduce la transmisión vertical de cepas virulentas.

### Genes relacionados a transporte y permeabilidad

Otro grupo importante de genes regulados de manera diferencial son aquellos vinculados a permeabilidad y transporte celular como por ejemplo canales de sodio (*scn*) y transportadores de solutos (*slc*) que están suprimidos o incambiados en Garbani y aumentados en TV. Entre ellos se encuentran: *Scn1a*, *Scn9a*, *Slc15a*, *Slc22a13*, *Slc9b2*, *Slc6a1*, *Slc17a2*, algunos de los cuales se han asociado previamente a la infección con HIV, HCV y se ha postulado que están modulados a favor de la propagación viral y el establecimiento de la infección crónica [111]. Es de destacar que Castillo y colaboradores encontraron varios *slc* aumentados frente a la infección de *T. cruzi* en explantes de placenta humana [112].

Por otro lado, muchos microorganismos modulan componentes de las uniones célula-célula como parte de su patogénesis, específicamente algunas bacterias y virus suprimen la expresión de genes y debilitan las uniones y generando desorganización tisular (Revisado en [113]). En nuestro trabajo encontramos un set de genes que codifican para componentes proteicos de las uniones célula-célula y célula-matriz que son clave para la estabilidad tisular y previenen el pasaje paracelular de patógenos [114]. Estos componentes están inducidos en las placentas de TV y suprimidos o sin cambio en las placentas de Garbani. Claudina 4 y Desmogleína 3 (*Cldn4* y *Dsg3*), componentes de las uniones estrechas y de los desmosomas respectivamente, que están aumentadas en TV, están directamente relacionados al pasaje paracelular de metabolitos y a la conductancia tisular. Adicionalmente la ocludina (*ocln*), otro componente de las uniones estrechas, está aumentado con el pasaje transplacentario de TcKR y también *Sgcg*, una glicoproteína transmembrana relacionada a distrofina, que ha sido previamente asociada a daño cardíaco en el contexto de cardiopatía Chagásica crónica [115]. Otros genes de interés y relacionados a permeabilidad que también están aumentados en TV, son *kng1*, un componente del sistema kalikreina-kinina, que ha sido vinculado como explotado por *T. cruzi* para invadir células cardiovasculares, *fam107a*, un regulador negativo de adhesiones focales involucrado en progresión de ciclo celular y proliferación, y también se encontró aumentado en la infección con el parásito apicomplejo *Theileria annulata* [116]. Otros genes aumentados diferencialmente, son la sinaptogamina 11 (*syn11*), un sensor de calcio que se sabe que inhibe la secreción de IL6 e INFγ en macrófagos [117] y *Orai1*, un canal de calcio que es la vía primaria de entrada de calcio en células T y neutrófilos [118].

Este patrón de modulación de genes relacionados a permeabilidad y estabilidad tisular nos lleva a postular que en las cepas TV podrían estar favorecido el pasaje transplacentario intracelular, y que se estimulan a través de la inducción de genes, las uniones entre células, mientras que la cepa virulenta Garbani no afecta estas vías, lo cual le permitiría además explotar el pasaje paracelular. Cabe mencionar que el pasaje paracelular de *T. cruzi* ha sido observado por microscopía electrónica en infecciones de esferoides 3D [119], y este proceso de invasión tisular es diferente al de invasión celular [120]. En nuestro caso no sabemos si los aislados de TV o Garbani explotan la vía paracelular, pero podemos inferir por la forma en que estos genes están modulados, que la vía paracelular está impedida o disminuida en las placentas de los aislados de TV, quizás como una estrategia de utilizar principalmente la vía intracelular a modo de “escondite” para evadir el sistema inmune. Una estrategia de este tipo fue descrita para *Plasmodium*, en donde a través de un mecanismo de pasaje de célula a célula denominado *cell traversal*, va migrando a través del tejido hasta encontrar el microambiente adecuado para replicar. Nuestros resultados (tropismo placentario, silencio inmunológico, y baja tasa de replicación) hacen pensar que los aislados TV podrían utilizar un mecanismo similar para su pasaje por la barrera placentaria, aunque esto debería ser estudiado en profundidad.

#### Genes relacionados a respuesta inmune

Como ya hemos mencionado, una diferencia sustancial entre las respuestas son los genes asociados a respuesta inmune. La estimulación de estos genes, exclusiva de Garbani, la vemos a nivel del enriquecimiento de procesos biológicos (Figura 24), en el desglose de genes diferencialmente expresados (Figura 27 y 28) y también cuando graficamos el comportamiento de todos los genes asociados a respuesta inmune indistintamente de su valor de FC y *padj* (Figura 36). En esta última figura, en donde vemos todos los genes aumentados en Garbani (lo cual está indicando una respuesta general inespecífica), llamó nuestra atención un grupo discreto de genes que se comporta diferente (parte inferior de la Figura 36), cuya expresión está aumentada en TV respecto Garbani.

Estos genes tienen un rol importante en procesos de inmunomodulación, de tolerancia y anti inflamatorios están aumentados en los aislados de TV y disminuidos en las de Garbani. Entre estos vale la pena mencionar *s10014a*, un gen que se encuentra suprimido en placentas de madres chagásicas [121]. Las

interacciones completas de este gen no se conocen aún, pero se sabe que aumenta la expresión del gen de *mmp2* (metaloproteasa de matriz 2) [122, 123], que es capaz de inducir la migración de macrófagos [124] y su inducción se ha ligado a una condición denominada corioamnionitis histológica (inflamación de los tejidos placentarios) [125]. Algunas de las proteínas codificadas por los genes *s100* funcionan vía “inmunidad nutricional”, secuestrando metales esenciales que son requeridos por parásitos intracelulares [126]. Otros *s100* reaccionan frente a DAMPs (*S100a1*, *S100a3*, *S100a4*, *S100a6*, *S100a7*, *S100a9*, *S100a10* y *S100a11*), están inducidos en Garbani y no en TV, y son genes RAGE dependientes, que es una diferencia fundamental con *s100a14* (se activa RAGE independiente) y que está aumentado en TV. Dado que RAGE (*Receptor for Advanced Glycation Endproducts*) es una vía pro inflamatoria, importante en la inmunidad innata, activar inmunomoduladores RAGE independientes (como *s100a14*) puede ser una forma de defensa más silenciosa en términos de inflamación.

Dentro del grupo de los inmunomoduladores también se encuentra la interleuquina 34 (*IL34*) que se sabe contribuye a la tolerancia inmunológica en macrófagos durante la infecciones virales y que inhibe la apoptosis [127], en las placentas de TV tendría un rol protector. Los microorganismos que infectan la placenta, rompen el balance inflamatorio y angiogénico y la hemodinámica materna y fetal necesaria para el correcto desarrollo vascular de la placenta y una nutrición saludable [128]. A la luz de las diferentes respuestas (incluso opuestas) inducidas por Garbani y los aislados de TV en las placentas, es posible interpretar que los aislados de TV estén compensando el desbalance placentario induciendo genes moduladores claves con el objetivo de prevenir el daño y su propagación.

Recientemente, se ha descrito que algunas citoquinas asociadas al inflamosoma están siendo liberadas desde la placenta de manera constitutiva en placentas sanas y en embarazos sin infección. Este estado es considerado una firma inmunológica que se aleja mucho de lo que se creía en el pasado que durante la gestación se conformaba un estado inmunosuprimido [129]. En nuestro análisis encontramos componentes del inflamosoma que están modulados en la placenta de manera diferencial entre las cepas. Mientras que las placentas de Garbani aumentan algunos genes (*nlrp1*, *nlrp3*, *pycard*, *gsdmd*, *casp1*, *casp4* and *casp12*), los mismos no cambian en TV, incluso algunos tienen su expresión suprimida. Esta activación de componentes del inflamosoma se ha descrito para infecciones placentarios con otros parásitos como por ejemplo *L. monocitogenes* [129]. De manera similar,

cuatro genes metalotioneinas (*mt1*, *mt2*, *mt3* and *mt4*), que son proteínas citosólicas que alivian el estrés por exceso de metales y superóxido [130], están inducidos en placentas de Garbani y no TV. Otros genes de este bloque de inmunomoduladores son *gal*, *cldn4*, *dgs3*, *Fam107a*, que ya hemos mencionado anteriormente o se mencionarán a continuación. A la luz de estos resultados podemos interpretar que la modulación de los genes mencionados está cumpliendo un rol protector en las placentas de TV, posiblemente evitando la inflamación y daño que observamos en las placentas de Garbani.

### Genes relacionados al crecimiento intrauterino

Varios parásitos con capacidad de transmitirse verticalmente pueden impactar la fisiología placentaria y el desarrollo fetal [131] y *T. cruzi* no es la excepción, una de las posibles manifestaciones clínicas del Chagas Congénito es el bajo peso al nacer [39, 132, 133] y por esto nos interesó ir a mirar en detalle genes vinculados a la restricción del crecimiento intra-uterino (IUGR). IUGR es considerado el resultado de la reducción de suministros nutricionales al feto y en la amplia mayoría de los casos está acompañado de insuficiencia placentaria [134], durante el desarrollo de un modelo murino de IUGR, se encontraron 50 genes placentarios suprimidos en comparación a placentas saludables [135]. En nuestro análisis encontramos diferencialmente expresados 26 de estos genes y 18 (70%) los encontramos suprimidos en las placentas de Garbani (*gpc1*, *gal*, *galr3*, *gcm1*, *esx1*, *dlx3*, *hand1*, *gjb2*, *ets2*, *fzd5*, *slc38a4*, *meg3*, *cdkn1c*, *peg3*, *grb10*, *usp29*, *zim1*, *cpg2*). Estos genes no cambian en placentas TV excepto dos cuya expresión está inducida (*gal*, *grb3*). Adicionalmente, algunos genes de la familia *s100* que ya mencionamos como aumentados en las placentas del grupo Garbani, también están aumentados en IUGR. Observar patrones de expresión placentarios similares entre IUGR y la infección con Garbani nos está sugiriendo que el pasaje transplacentario de Garbani induce anormalidades en el funcionamiento placentario y posiblemente también sus consecuencias. Más importante aún, el pasaje transplacentario de los aislados de TV es una vez más inocuo en términos de daño y en términos de impacto en el desarrollo, salud fetal y comorbilidades asociadas al futuro del individuo (que también impacta en la salud reproductiva de los mismos). Más experimentos que involucren la determinación del tamaño fetal y tamaño y función placentaria son necesarios para confirmar estos resultados.

### Análisis comparativo con otros estudios de expresión génica

Resultó interesante para nosotros ir a mirar en detalle el trabajo de colegas argentinos que realizaron un análisis transcriptómico comparando expresión de genes en placentas de madres seropositiva para Chagas con placentas de madres seronegativas y encontraron una lista de 42 genes DEG [121] entre los grupos. De estos 42 genes, 11 también son DEG en nuestro análisis y 8 de ellos se comportan igual al grupo de Garbani (*Kif12*, *Hcar2*, *Bhlhe40*, *Itgax*, *Gabrb3*, *Lypd3*, *Cps1* and *Ebf2*). *Fn1*, *Fat2* y *S100a14* se comportan diferente: *Fn1* y *Fat2* están inducidos en placentas humanas y suprimidos en murinas del grupo Garbani y finalmente *s100a14* (gen que ya hemos mencionado) está suprimido en placentas humanas, no cambia en Garbani y aumenta su expresión en TV.

Otros genes mencionados con frecuencia en la bibliografía de transmisión vertical de *T. cruzi* son *mmp2* y *mmp9*, dos metaloproteasas de matriz que se inducen en explantes de vellosidades coriónicas de placenta humana y su inhibición protegería al tejido de la invasión [65, 112]. Por otro lado, estudios genómicos han asociado polimorfismos en estos genes a la transmisión vertical de *T. cruzi* [50]. Aunque nosotros vemos modulación diferencial de algunos genes de metaloproteasas y también de sus inhibidores (*timp* y *sfrp*) en las placentas del grupo Garbani y VT, no encontramos diferencias en la expresión de *mmp2* ni de *mmp9*.

En términos generales, estos trabajos (resumidos en la Figura 7) describen respuestas placentarias del tipo de los obtenidos para cepas virulentas, concluyendo que el parásito pasa como consecuencia de una fuerte estimulación del sistema inmune con el consiguiente daño tisular, lo cual puede por un lado, bajar la carga parasitaria pero por otro facilitar el pasaje. Nuestros resultados son novedosos en cuanto muestran una estrategia no descrita hasta ahora de pasaje silencioso en términos de sistema inmune que no involucra daño.

En suma, el punto de partida de esta tesis fue una observación clínica: en un área libre de transmisión vectorial de la enfermedad de Chagas desde hace 25 años, se observó que los casos de transmisión vertical se presentan como asintomáticos tanto en los bebés como en las madres, y es frecuente que dicha transmisión haya ocurrido al menos en dos generaciones. Con la hipótesis de que estábamos ante la presencia de cepas especializadas en transmisión no vectorial, analizamos estas cepas encontrando características similares entre ellas. Por un lado, la incapacidad



de realizar epimastigogénesis *in vitro* iba en el sentido de nuestra hipótesis. Su comportamiento en el modelo murino, similar a la presentación clínica en pacientes, mostraba una muy baja virulencia, con parasitemias generalmente indetectables. Sin embargo, los aislados TV no perdieron ni su capacidad de colonizar diferentes órganos (propiedad clave para la persistencia de la infección), ni la de generar una respuesta inmune característica de la enfermedad. Asimismo, su susceptibilidad a benznidazol y nifurtimox indica que no existen cambios metabólicos significativos en comparación a las cepas de referencia. Por tanto, nos enfocamos en la respuesta placentaria frente a las diferentes cepas, y es aquí donde encontramos los resultados más relevantes y novedosos. En primer lugar, uno de los modelos (Dm28c) fue incapaz de transmitirse verticalmente; si bien no abordamos en esta tesis las causas de tal imposibilidad, el resultado sugiere que la modulación es necesaria para el pasaje y resulta interesante profundizar en futuros estudios. En cuanto a los aislados capaces de pasar a la siguiente generación, podemos establecer que existen al menos dos grandes mecanismos de transmisión vertical:

1- Inespecífico o sin tropismo preferencial por la placenta. Estos aislados se transmiten verticalmente induciendo daño como consecuencia de su alta virulencia, y esto se evidencia con los perfiles de expresión diferencial y respuesta placentaria pro inflamatoria exacerbada. Este tipo de patrón está presente en cepas virulentas utilizadas en el laboratorio que no necesariamente tienen una contraparte clínica, salvo en aquellos casos de enfermedad de Chagas aguda adquirida durante el embarazo, o en casos poco frecuentes de altas cargas parasitarias en los que se ha visto una mayor frecuencia de transmisión vertical [44, 136].

2- Específico o placento-trópico. Es el caso de los aislados de TV, que generan una modulación leve de la respuesta inmune, y un perfil característico de regulación a nivel placentario. Este mecanismo constituye una especialización en la transmisión no vectorial de *T. cruzi*, y tiene su contraparte clínica claramente definida, como se puede evidenciar en el hecho de que en la mayor parte de los casos de transmisión vertical las madres no presentan síntomas ni signos de la enfermedad de Chagas.

## 15. CONCLUSIONES

En esta tesis se trabajó con aislados de *Trypanosoma cruzi* que se han transmitido verticalmente durante al menos dos generaciones y se presentó su caracterización en términos moleculares, su capacidad de realizar el ciclo completo, su virulencia y capacidad de diseminarse e inducir una respuesta protectora y finalmente, se determinó su capacidad de transmitirse verticalmente y la respuesta placentaria asociada a dicho pasaje.

Respecto a la primera parte de esta tesis se determinó que los aislados pertenecen al linaje híbrido BCb, que los mismos son susceptibles a nifurtimox y benznidazol y que tienen reducida su capacidad de realizar epimastigogénesis, demostrando un nivel de plasticidad que le permite especializarse en la transmisión no vectorial, perpetuando así la infección prescindiendo del vector.

Los aislados de TV exhiben en ratón un fenotipo de baja virulencia que se condice con la presentación asintomática de los casos clínicos de los cuales fueron aisladas, pero son capaces de inducir una infección sistémica y de estimular el sistema inmune de manera similar al que lo hacen cepas más virulentas.

Los aislados de TV son capaces de inducir una respuesta protectora frente a una re infección con dosis letales, lo cual permite postularlas como potenciales plataformas para formulaciones vacunales.

En la segunda parte de la tesis se desarrolló un modelo murino de transmisión vertical, y se determinó que la infección con *T. cruzi* disminuye la tasa de cópula de manera independiente de la virulencia de la cepa pero sin afectar la tasa de preñez, ni la de reabsorciones espontáneas, y tampoco se detectó la inducción de abortos.

Respecto a la determinación de la transmisión vertical se observó que, de manera independiente a la carga parasitaria, los aislados de TV se transmiten con más frecuencia a la siguiente generación que cepas más virulentas.

La detección de ADN parasitario en los tejidos uterino, placentario y fetal nos permitió identificar tres escenarios distintos en la interfase materno fetal en el contexto de infección: i) La cepa **Dm28c** (de virulencia moderada) presenta altas

cargas parasitarias en útero, pero los parásitos son indetectables en placentas y fetos; ii) La cepa **Garbani** (de alta virulencia) tiene baja carga parasitaria en útero, alta en placentas pero los fetos presentan menor tasa de positividad y carga parasitaria con respecto a las obtenidas para los aislados de TV y finalmente iii) los **aislados de TV** (baja virulencia) muestran las menores cargas parasitarias en útero (valores bajos o indetectables), placentas negativas, pero los fetos presentan las mayores tasas de positividad y carga parasitaria.

Encontramos una correlación entre estos tres escenarios y los perfiles de expresión génica placentaria: 1. Dm28c (que no es capaz de transmitirse verticalmente) no induce cambios a este nivel, lo cual indica que modificar el estado homeostático placentario sería necesario para transmitirse; 2. Garbani induce cambios de expresión en un gran número de genes, enriquecidos en términos de respuesta inmune y en la supresión de genes necesarios para el mantenimiento de homeostasis placentaria, indicando que el pasaje estaría asociado a daño; 3. Los aislados de TV estimulan genes con rol inmunomodulador, y se induce un estado de poco cambio respecto al control, pero con una especificidad suficiente para lograr potenciar el pasaje transplacentario sin daño.

Describimos dos grandes estrategias de transmisión vertical: una **inespecífica** que involucra alta virulencia, inducción de respuesta inmune y daño tisular y otra que creemos es la más frecuente en los casos de Chagas Congénito, que denominamos **específica**, que se caracteriza por involucrar tropismo placentario, por ser silenciosa en términos de respuesta inmune lo cual facilita el pasaje transplacentario. La identificación de este tipo de estrategia específica representa un aporte novedoso dentro de los mecanismos de transmisión vertical descritos hasta el momento para *Trypanosoma cruzi*.

## 16. PERSPECTIVAS

A partir de los resultados obtenidos en esta tesis, podemos delinear tres grandes perspectivas en términos de preguntas y líneas de investigación que se abren y que nos resultan de interés:

- a) ¿Hay un correlato genómico y/o de expresión de genes a nivel de los aislados que explique las diferencias en las tasas de transmisión vertical y de la respuesta placentaria? Esta pregunta podría ser abordada mediante un análisis comparativo del genoma y expresión génica de los aislados de transmisión vertical.
- b) ¿Son las características de baja virulencia de los aislados una fortaleza para la formulación de una vacuna contra la enfermedad de Chagas? Profundizar en la caracterización y respuesta inmune que inducen distintas formulaciones de estos aislados como cepas vacunales podría darnos pistas.
- c) ¿Es posible obtener de nuestro análisis de respuesta placentaria genes drogables (para inhibirlos o estimularlos) y o factores clave que al administrarlos mejoren la homeostasis placentaria e impidan el pasaje de parásitos? Mediante la identificación de blancos y ensayos de transmisión vertical podríamos evaluar distintos candidatos.

## 17. REFERENCIAS

1. OMS, *La enfermedad de Chagas (tripanosomiasis americana)*. 2018.
2. OPS, *Enfermedad de Chagas*. 2020.
3. Flores-Ferrer, A., O. Marcou, E. Waleckx, E. Dumonteil, and S. Gourbiere, *Evolutionary ecology of Chagas disease; what do we know and what do we need?* *Evol Appl*, 2018. **11**(4): p. 470-487.
4. R, Salvatella, *Chagas en Uruguay, 1937-2016. Información básica para su prevención, control y atención*. *Arch Pediatr Urug* 2016. **87**(1): p. 49-52.
5. Rassi, A., Jr., A. Rassi, and J. A. Marin-Neto, *Chagas disease*. *Lancet*, 2010. **375**(9723): p. 1388-402.
6. Lee, B. Y., K. M. Bacon, M. E. Bottazzi, and P. J. Hotez, *Global economic burden of Chagas disease: a computational simulation model*. *Lancet Infect Dis*, 2013. **13**(4): p. 342-8.
7. Bern, C., *Chagas' Disease*. *N Engl J Med*, 2015. **373**(19): p. 1882.
8. Schmunis, G. A. and Z. E. Yadon, *Chagas disease: a Latin American health problem becoming a world health problem*. *Acta Trop*, 2010. **115**(1-2): p. 14-21.
9. Monge-Maillo, B. and R. Lopez-Velez, *Challenges in the management of Chagas disease in Latin-American migrants in Europe*. *Clin Microbiol Infect*, 2017. **23**(5): p. 290-295.
10. Ramos, J. M., C. Martorell, A. I. Lopez-Amoros, and M. Navarro, *[How much do Medicine students know about Chagas' disease in Spain?]*. *Gac Sanit*, 2017. **31**(2): p. 171-172.
11. Lidani, K. C. F., F. A. Andrade, L. Bavia, F. S. Damasceno, M. H. Beltrame, I. J. Messias-Reason, and T. L. Sandri, *Chagas Disease: From Discovery to a Worldwide Health Problem*. *Front Public Health*, 2019. **7**: p. 166.
12. Oliveira, I., F. Torrico, J. Munoz, and J. Gascon, *Congenital transmission of Chagas disease: a clinical approach*. *Expert Rev Anti Infect Ther*, 2010. **8**(8): p. 945-56.
13. Salvatella, Roberto, *Chagas en Uruguay, 1937-2016. Información básica para su prevención, control y atención*. *Arch Pediatr Urug* 2016. **87**(1): p. 49-52.
14. Salud, Ministerio de Salud Pública División Epidemiología Departamento de Vigilancia en, *Guía Nacional de Vigilancia y Control de Enfermedades y Eventos Sanitarios de Notificación Obligatoria*. 2015.
15. Bustos, P. L., N. Milduberger, B. J. Volta, A. E. Perrone, S. A. Laucella, and J. Bua, *Trypanosoma cruzi Infection at the Maternal-Fetal Interface: Implications of Parasite Load in the Congenital Transmission and Challenges in the Diagnosis of Infected Newborns*. *Front Microbiol*, 2019. **10**: p. 1250.
16. OPS. *Estimación Cuantitativa de la Enfermedad de Chagas en las Américas*. 2006.
17. Cancado, J. R., *Criteria of Chagas disease cure*. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 1999. **94 Suppl 1**: p. 331-5.
18. Viotti, R., C. Vigliano, B. Lococo, G. Bertocchi, M. Petti, M. G. Alvarez, M. Postan, and A. Armenti, *Long-term cardiac outcomes of treating chronic Chagas disease with benznidazole versus no treatment: a nonrandomized trial*. *Ann Intern Med*, 2006. **144**(10): p. 724-34.
19. WHO, *Chagas disease (American trypanosomiasis). Fact sheet N°340*, W.H. Organization, Editor. 2012.

20. Biter, A. B., S. Weltje, E. M. Hudspeth, C. A. Seid, C. P. McAtee, W. H. Chen, J. B. Pollet, U. Strych, P. J. Hotez, and M. E. Bottazzi, *Characterization and Stability of Trypanosoma cruzi 24-C4 (Tc24-C4), a Candidate Antigen for a Therapeutic Vaccine Against Chagas Disease*. J Pharm Sci, 2018. **107**(5): p. 1468-1473.
21. Domínguez-Guillén, A., J. López-Domínguez, P. Ochoa-Martínez, A. López-Monteon, and A. Ramos-Ligonio, *In search of the vaccine against Chagas Disease: a tedious road of more than 100 years*. Austin J Infect Dis, 2021. **8**(2).
22. Sanchez-Valdez, F. J., C. Perez Brandan, A. Ferreira, and M. A. Basombrio, *Gene-deleted live-attenuated Trypanosoma cruzi parasites as vaccines to protect against Chagas disease*. Expert Rev Vaccines, 2015. **14**(5): p. 681-97.
23. Quijano-Hernandez, I. and E. Dumonteil, *Advances and challenges towards a vaccine against Chagas disease*. Hum Vaccin, 2011. **7**(11): p. 1184-91.
24. Araya, J., M. I. Cano, H. B. Gomes, E. M. Novak, J. M. Requena, C. Alonso, M. J. Levin, P. Guevara, J. L. Ramirez, and J. F. Da Silveira, *Characterization of an interspersed repetitive DNA element in the genome of Trypanosoma cruzi*. Parasitology, 1997. **115 ( Pt 6)**: p. 563-70.
25. Lima, F. M., R. T. Souza, F. R. Santori, M. F. Santos, D. R. Cortez, R. M. Barros, M. I. Cano, H. M. Valadares, A. M. Macedo, R. A. Mortara, and J. F. da Silveira, *Interclonal variations in the molecular karyotype of Trypanosoma cruzi: chromosome rearrangements in a single cell-derived clone of the G strain*. PLoS One, 2013. **8**(5): p. e63738.
26. Reis-Cunha, J. L., G. F. Rodrigues-Luiz, H. O. Valdivia, R. P. Baptista, T. A. Mendes, G. L. de Moraes, R. Guedes, A. M. Macedo, C. Bern, R. H. Gilman, C. T. Lopez, B. Andersson, A. T. Vasconcelos, and D. C. Bartholomeu, *Chromosomal copy number variation reveals differential levels of genomic plasticity in distinct Trypanosoma cruzi strains*. BMC Genomics, 2015. **16**: p. 499.
27. Zingales, B., S. G. Andrade, M. R. Briones, D. A. Campbell, E. Chiari, O. Fernandes, F. Guhl, E. Lages-Silva, A. M. Macedo, C. R. Machado, M. A. Miles, A. J. Romanha, N. R. Sturm, M. Tibayrenc, and A. G. Schijman, *A new consensus for Trypanosoma cruzi intraspecific nomenclature: second revision meeting recommends TcI to TcVI*. Mem Inst Oswaldo Cruz, 2009. **104**(7): p. 1051-4.
28. Koren, S., M. C. Schatz, B. P. Walenz, J. Martin, J. T. Howard, G. Ganapathy, Z. Wang, D. A. Rasko, W. R. McCombie, E. D. Jarvis, and M. Phillippy Adam, *Hybrid error correction and de novo assembly of single-molecule sequencing reads*. Nat Biotechnol, 2012. **30**(7): p. 693-700.
29. Flores-Lopez, C. A. and C. A. Machado, *Analyses of 32 loci clarify phylogenetic relationships among Trypanosoma cruzi lineages and support a single hybridization prior to human contact*. PLoS Negl Trop Dis, 2011. **5**(8): p. e1272.
30. Lewis, M. D., M. S. Llewellyn, M. Yeo, N. Acosta, M. W. Gaunt, and M. A. Miles, *Recent, independent and anthropogenic origins of Trypanosoma cruzi hybrids*. PLoS Negl Trop Dis, 2011. **5**(10): p. e1363.
31. Abegg, C. P., A. P. Abreu, J. L. Silva, S. M. Araujo, M. L. Gomes, E. C. Ferreira, and M. J. Toledo, *Polymorphisms of blood forms and in vitro*

- metacyclogenesis of Trypanosoma cruzi I, II, and IV*. Exp Parasitol, 2017. **176**: p. 8-15.
32. Zingales, B., M. A. Miles, D. A. Campbell, M. Tibayrenc, A. M. Macedo, M. M. Teixeira, A. G. Schijman, M. S. Llewellyn, E. Lages-Silva, C. R. Machado, S. G. Andrade, and N. R. Sturm, *The revised Trypanosoma cruzi subspecific nomenclature: rationale, epidemiological relevance and research applications*. Infect Genet Evol, 2012. **12**(2): p. 240-53.
33. Berna, L., G. Greif, S. Pita, P. Faral-Tello, F. Diaz-Viraque, R. C. M. Souza, G. A. Vallejo, F. Alvarez-Valin, and C. Robello, *Maxicircle architecture and evolutionary insights into Trypanosoma cruzi complex*. PLoS Negl Trop Dis, 2021. **15**(8): p. e0009719.
34. Howard, E. J., X. Xiong, Y. Carlier, S. Sosa-Estani, and P. Buekens, *Frequency of the congenital transmission of Trypanosoma cruzi: a systematic review and meta-analysis*. BJOG, 2014. **121**(1): p. 22-33.
35. Buekens, P., O. Almendares, Y. Carlier, E. Dumonteil, M. Eberhard, R. Gamboa-Leon, M. James, N. Padilla, D. Wesson, and X. Xiong, *Mother-to-child transmission of Chagas' disease in North America: why don't we do more?* Matern Child Health J, 2008. **12**(3): p. 283-6.
36. Bern, C. and S. P. Montgomery, *An estimate of the burden of Chagas disease in the United States*. Clin Infect Dis, 2009. **49**(5): p. e52-4.
37. Carlier, Y., F. Torrico, S. Sosa-Estani, G. Russomando, A. Luquetti, H. Freilij, and P. Albajar Vinas, *Congenital Chagas disease: recommendations for diagnosis, treatment and control of newborns, siblings and pregnant women*. PLoS Negl Trop Dis, 2011. **5**(10): p. e1250.
38. Picado, A., I. Cruz, M. Redard-Jacot, A. G. Schijman, F. Torrico, S. Sosa-Estani, Z. Katz, and J. M. Ndung'u, *The burden of congenital Chagas disease and implementation of molecular diagnostic tools in Latin America*. BMJ Glob Health, 2018. **3**(5): p. e001069.
39. Amorín, Belén and Leticia Pérez, *Chagas congénito de segunda generación en Uruguay. Primer caso sintomático descrito en el país*. Arch Pediatr Urug, 2016. **87**(3): p. 245-252.
40. Altcheh, J., M. Biancardi, A. Lapena, G. Ballering, and H. Freilij, *[Congenital Chagas disease: experience in the Hospital de Niños, Ricardo Gutierrez, Buenos Aires, Argentina]*. Rev Soc Bras Med Trop, 2005. **38 Suppl 2**: p. 41-5.
41. Schijman, A. G., J. Altcheh, J. M. Burgos, M. Biancardi, M. Bisio, M. J. Levin, and H. Freilij, *Aetiological treatment of congenital Chagas' disease diagnosed and monitored by the polymerase chain reaction*. J Antimicrob Chemother, 2003. **52**(3): p. 441-9.
42. WHO, *Second report of the WHO Expert Committee: CONTROL OF CHAGAS DISEASE*. 2002.
43. Bua, J., B. J. Volta, E. B. Velazquez, A. M. Ruiz, A. M. Rissio, and R. L. Cardoni, *Vertical transmission of Trypanosoma cruzi infection: quantification of parasite burden in mothers and their children by parasite DNA amplification*. Trans R Soc Trop Med Hyg, 2012. **106**(10): p. 623-8.
44. Hermann, E., C. Truyens, C. Alonso-Vega, P. Rodriguez, A. Berthe, F. Torrico, and Y. Carlier, *Congenital transmission of Trypanosoma cruzi is associated with maternal enhanced parasitemia and decreased production of interferon- gamma in response to parasite antigens*. J Infect Dis, 2004. **189**(7): p. 1274-81.

45. Scapellato, P. G., E. G. Bottaro, and M. T. Rodriguez-Brieschke, *Mother-child transmission of Chagas disease: could coinfection with human immunodeficiency virus increase the risk?* Rev Soc Bras Med Trop, 2009. **42**(2): p. 107-9.
46. Alvarez, M. G., C. Vigliano, B. Lococo, G. Bertocchi, and R. Viotti, *Prevention of congenital Chagas disease by Benznidazole treatment in reproductive-age women. An observational study.* Acta Trop, 2017. **174**: p. 149-152.
47. Danesi, E., D. L. Fabbro, E. L. Segura, and S. Sosa-Estani, *Higher congenital transmission rate of Trypanosoma cruzi associated with family history of congenital transmission.* Rev Soc Bras Med Trop, 2020. **53**: p. e20190560.
48. Sanchez Negrette, O., M. C. Mora, and M. A. Basombrio, *High prevalence of congenital Trypanosoma cruzi infection and family clustering in Salta, Argentina.* Pediatrics, 2005. **115**(6): p. e668-72.
49. Apt, W., I. Zulantay, M. Arnello, D. Oddo, S. Gonzalez, J. Rodriguez, U. Kemmerling, C. Truyens, and Y. Carlier, *Congenital infection by Trypanosoma cruzi in an endemic area of Chile: a multidisciplinary study.* Trans R Soc Trop Med Hyg, 2013. **107**(2): p. 98-104.
50. Juiz, N. A., N. M. Cayo, M. Burgos, M. E. Salvo, J. R. Nasser, J. Bua, S. A. Longhi, and A. G. Schijman, *Human Polymorphisms in Placentally Expressed Genes and Their Association With Susceptibility to Congenital Trypanosoma cruzi Infection.* J Infect Dis, 2016. **213**(8): p. 1299-306.
51. Carlier, Y., C. Truyens, and E. Muraille, *Is Antibody-Dependent Enhancement of Trypanosoma cruzi Infection Contributing to Congenital/Neonatal Chagas Disease?* Front Immunol, 2021. **12**: p. 723516.
52. Volta, B. J., P. L. Bustos, C. Gonzalez, M. A. Natale, A. E. Perrone, N. Milduberger, S. A. Laucella, and J. Bua, *Circulating Cytokine and Chemokine Profiles of Trypanosoma cruzi-Infected Women During Pregnancy and Its Association With Congenital Transmission.* J Infect Dis, 2021. **224**(6): p. 1086-1095.
53. Ewald, P. W., *Evolution of virulence.* Infect Dis Clin North Am, 2004. **18**(1): p. 1-15.
54. Lipsitch, M., S. Siller, and M. A. Nowak, *The Evolution of Virulence in Pathogens with Vertical and Horizontal Transmission.* Evolution, 1996. **50**(5): p. 1729-1741.
55. Hall, C. A., E. M. Pierce, A. N. Wimsatt, T. Hobby-Dolbeer, and J. B. Meers, *Virulence and vertical transmission of two genotypically and geographically diverse isolates of Trypanosoma cruzi in mice.* J Parasitol, 2010. **96**(2): p. 371-6.
56. !!! INVALID CITATION !!!
57. Moore, Persaud, and Torchia, *The Developing Human: Clinically Oriented Embriology 11th edition*, ed. Saunders. 2019.
58. Burton, G. J. and E. Jauniaux, *What is the placenta?* Am J Obstet Gynecol, 2015. **213**(4 Suppl): p. S6 e1, S6-8.
59. Furukawa, S., Y. Kuroda, and A. Sugiyama, *A comparison of the histological structure of the placenta in experimental animals.* J Toxicol Pathol, 2014. **27**(1): p. 11-8.
60. Duaso, J., G. Rojo, G. Cabrera, N. Galanti, C. Bosco, J. D. Maya, A. Morello, and U. Kemmerling, *Trypanosoma cruzi induces tissue disorganization and destruction of chorionic villi in an ex vivo infection model of human placenta.* Placenta, 2010. **31**(8): p. 705-11.



61. Liempi, A., C. Castillo, I. Carrillo, L. Munoz, D. Droguett, N. Galanti, J. D. Maya, and U. Kemmerling, *A local innate immune response against Trypanosoma cruzi in the human placenta: The epithelial turnover of the trophoblast*. Microb Pathog, 2016. **99**: p. 123-129.
62. Liempi, A., C. Castillo, J. Duaso, D. Droguett, A. Sandoval, K. Barahona, A. Hernandez, N. Galanti, J. D. Maya, and U. Kemmerling, *Trypanosoma cruzi induces trophoblast differentiation: a potential local antiparasitic mechanism of the human placenta?* Placenta, 2014. **35**(12): p. 1035-42.
63. Lima, A. P., P. C. Almeida, I. L. Tersariol, V. Schmitz, A. H. Schmaier, L. Juliano, I. Y. Hirata, W. Muller-Esterl, J. R. Chagas, and J. Scharfstein, *Heparan sulfate modulates kinin release by Trypanosoma cruzi through the activity of cruzipain*. J Biol Chem, 2002. **277**(8): p. 5875-81.
64. Maeda, F. Y., C. Cortez, M. A. Izidoro, L. Juliano, and N. Yoshida, *Fibronectin-degrading activity of Trypanosoma cruzi cysteine proteinase plays a role in host cell invasion*. Infect Immun, 2014. **82**(12): p. 5166-74.
65. Castillo, C., R. Lopez-Munoz, J. Duaso, N. Galanti, F. Jana, J. Ferreira, G. Cabrera, J. D. Maya, and U. Kemmerling, *Role of matrix metalloproteinases 2 and 9 in ex vivo Trypanosoma cruzi infection of human placental chorionic villi*. Placenta, 2012. **33**(12): p. 991-7.
66. Guilmot, A., J. Bosse, Y. Carlier, and C. Truysens, *Monocytes play an IL-12-dependent crucial role in driving cord blood NK cells to produce IFN-g in response to Trypanosoma cruzi*. PLoS Negl Trop Dis, 2013. **7**(6): p. e2291.
67. Gulin, J. E. N., M. Bisio, D. M. Rocco, J. Altcheh, M. E. Solana, and F. Garcia-Bournissen, *Molecular and biological characterization of a highly pathogenic Trypanosoma cruzi strain isolated from a patient with congenital infection*. Exp Parasitol, 2018. **186**: p. 50-58.
68. Juiz, N. A., M. E. Solana, G. R. Acevedo, A. F. Benatar, J. C. Ramirez, P. A. da Costa, A. M. Macedo, S. A. Longhi, and A. G. Schijman, *Different genotypes of Trypanosoma cruzi produce distinctive placental environment genetic response in chronic experimental infection*. PLoS Negl Trop Dis, 2017. **11**(3): p. e0005436.
69. Medina, L., C. Castillo, A. Liempi, M. Herbach, G. Cabrera, L. Valenzuela, N. Galanti, M. de Los Angeles Curto, A. G. Schijman, and U. Kemmerling, *Differential infectivity of two Trypanosoma cruzi strains in placental cells and tissue*. Acta Trop, 2018. **186**: p. 35-40.
70. Pattillo, R. A., G. O. Gey, E. Delfs, and R. F. Mattingly, *Human hormone production in vitro*. Science, 1968. **159**(3822): p. 1467-9.
71. Pattillo, R. A., R. Hussa, Bernstein, and E. Delfs, *The jar cell line-continuous human multihormone production and controls*,. In Vitro, 1971. **6**.
72. Kohler, P. O. and W. E. Bridson, *Isolation of hormone-producing clonal lines of human choriocarcinoma*. J Clin Endocrinol Metab, 1971. **32**(5): p. 683-7.
73. Graham, C. H., T. S. Hawley, R. G. Hawley, J. R. MacDougall, R. S. Kerbel, N. Khoo, and P. K. Lala, *Establishment and characterization of first trimester human trophoblast cells with extended lifespan*. Exp Cell Res, 1993. **206**(2): p. 204-11.
74. Choy, M. Y. and I. T. Manyonda, *The phagocytic activity of human first trimester extravillous trophoblast*. Hum Reprod, 1998. **13**(10): p. 2941-9.
75. Straszewski-Chavez, S. L., V. M. Abrahams, A. B. Alvero, P. B. Aldo, Y. Ma, S. Guller, R. Romero, and G. Mor, *The isolation and characterization of a*

- novel telomerase immortalized first trimester trophoblast cell line*, Swan 71. Placenta, 2009. **30**(11): p. 939-48.
76. Nahmias, A. J., W. E. Josey, Z. M. Naib, M. G. Freeman, R. J. Fernandez, and J. H. Wheeler, *Perinatal risk associated with maternal genital herpes simplex virus infection*. Am J Obstet Gynecol, 1971. **110**(6): p. 825-37.
77. Schwartz, D. A., *The Origins and Emergence of Zika Virus, the Newest TORCH Infection: What's Old Is New Again*. Arch Pathol Lab Med, 2017. **141**(1): p. 18-25.
78. Stegmann, B. J. and J. C. Carey, *TORCH Infections. Toxoplasmosis, Other (syphilis, varicella-zoster, parvovirus B19), Rubella, Cytomegalovirus (CMV), and Herpes infections*. Curr Womens Health Rep, 2002. **2**(4): p. 253-8.
79. Cuna, W. R., A. G. Choque, R. Passera, and C. Rodriguez, *Pro-inflammatory cytokine production in chagasic mothers and their uninfected newborns*. J Parasitol, 2009. **95**(4): p. 891-4.
80. Hermann, E., C. Alonso-Vega, A. Berthe, C. Truyens, A. Flores, M. Cordova, L. Moretta, F. Torrico, V. Braud, and Y. Carlier, *Human congenital infection with Trypanosoma cruzi induces phenotypic and functional modifications of cord blood NK cells*. Pediatr Res, 2006. **60**(1): p. 38-43.
81. Orange, S. J., D. Painter, J. Horvath, B. Yu, R. Trent, and A. Hennessy, *Placental endothelial nitric oxide synthase localization and expression in normal human pregnancy and pre-eclampsia*. Clin Exp Pharmacol Physiol, 2003. **30**(5-6): p. 376-81.
82. Oliveira, A. E. R., V. Grazielle-Silva, L. R. P. Ferreira, and S. M. R. Teixeira, *Close encounters between Trypanosoma cruzi and the host mammalian cell: Lessons from genome-wide expression studies*. Genomics, 2020. **112**(1): p. 990-997.
83. Cura, C. I., T. Duffy, R. H. Lucero, M. Bisio, J. Peneau, M. Jimenez-Coello, E. Calabuig, M. J. Gimenez, E. Valencia Ayala, S. A. Kjos, J. Santalla, S. M. Mahaney, N. M. Cayo, C. Nagel, L. Barcan, E. S. Malaga Machaca, K. Y. Acosta Viana, L. Brutus, S. B. Ocampo, C. Aznar, C. A. Cuba Cuba, R. E. Gurtler, J. M. Ramsey, I. Ribeiro, J. L. VandeBerg, Z. E. Yadon, A. Osuna, and A. G. Schijman, *Multiplex Real-Time PCR Assay Using TaqMan Probes for the Identification of Trypanosoma cruzi DTUs in Biological and Clinical Samples*. PLoS Negl Trop Dis, 2015. **9**(5): p. e0003765.
84. Kessler, R. L., V. T. Contreras, N. P. Marliere, A. Aparecida Guarneri, L. H. Villamizar Silva, Gaca Mazzarotto, M. Batista, V. T. Soccol, M. A. Krieger, and C. M. Probst, *Recently differentiated epimastigotes from Trypanosoma cruzi are infective to the mammalian host*. Mol Microbiol, 2017. **104**(5): p. 712-736.
85. Pineyro, M. D., A. Parodi-Talice, T. Arcari, and C. Robello, *Peroxiredoxins from Trypanosoma cruzi: virulence factors and drug targets for treatment of Chagas disease?* Gene, 2008. **408**(1-2): p. 45-50.
86. Schenkman, S., E. S. Robbins, and V. Nussenzweig, *Attachment of Trypanosoma cruzi to mammalian cells requires parasite energy, and invasion can be independent of the target cell cytoskeleton*. Infect Immun, 1991. **59**(2): p. 645-54.
87. Grab, D. J. and J. J. Bwayo, *Isopycnic isolation of African trypanosomes on Percoll gradients formed in situ*. Acta Trop, 1982. **39**(4): p. 363-6.
88. Ramirez, J. C., C. I. Cura, O. da Cruz Moreira, E. Lages-Silva, N. Juiz, E. Velazquez, J. D. Ramirez, A. Alberti, P. Pavia, M. D. Flores-Chavez, A.

- Munoz-Calderon, D. Perez-Morales, J. Santalla, P. Marcos da Matta Guedes, J. Peneau, P. Marcet, C. Padilla, D. Cruz-Robles, E. Valencia, G. E. Crisante, G. Greif, I. Zulantay, J. A. Costales, M. Alvarez-Martinez, N. E. Martinez, R. Villarroel, S. Villarroel, Z. Sanchez, M. Bisio, R. Parrado, L. Maria da Cunha Galvao, A. C. Jacome da Camara, B. Espinoza, B. Alarcon de Noya, C. Puerta, A. Riarte, P. Diosque, S. Sosa-Estani, F. Guhl, I. Ribeiro, C. Aznar, C. Britto, Z. E. Yadon, and A. G. Schijman, *Analytical Validation of Quantitative Real-Time PCR Methods for Quantification of Trypanosoma cruzi DNA in Blood Samples from Chagas Disease Patients*. J Mol Diagn, 2015. **17**(5): p. 605-15.
89. Qvarnstrom, Y., A. G. Schijman, V. Veron, C. Aznar, F. Steurer, and A. J. da Silva, *Sensitive and specific detection of Trypanosoma cruzi DNA in clinical specimens using a multi-target real-time PCR approach*. PLoS Negl Trop Dis, 2012. **6**(7): p. e1689.
90. Dobin, A., C. A. Davis, F. Schlesinger, J. Drenkow, C. Zaleski, S. Jha, P. Batut, M. Chaisson, and T. R. Gingeras, *STAR: ultrafast universal RNA-seq aligner*. Bioinformatics, 2013. **29**(1): p. 15-21.
91. Liao, Y., G. K. Smyth, and W. Shi, *featureCounts: an efficient general purpose program for assigning sequence reads to genomic features*. Bioinformatics, 2014. **30**(7): p. 923-30.
92. Love, M. I., W. Huber, and S. Anders, *Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2*. Genome Biol, 2014. **15**(12): p. 550.
93. Zhou, Y., B. Zhou, L. Pache, M. Chang, A. H. Khodabakhshi, O. Tanaseichuk, C. Benner, and S. K. Chanda, *Metascape provides a biologist-oriented resource for the analysis of systems-level datasets*. Nat Commun, 2019. **10**(1): p. 1523.
94. Greif, G., M. Rodriguez, A. Reyna-Bello, C. Robello, and F. Alvarez-Valin, *Kinetoplast adaptations in American strains from Trypanosoma vivax*. Mutat Res, 2015. **773**: p. 69-82.
95. Ferreira, B. L., E. R. Ferreira, M. V. de Brito, B. R. Salu, M. L. V. Oliva, R. A. Mortara, and C. M. Orikaza, *BALB/c and C57BL/6 Mice Cytokine Responses to Trypanosoma cruzi Infection Are Independent of Parasite Strain Infectivity*. Front Microbiol, 2018. **9**: p. 553.
96. Basombrio, M. A., *Trypanosoma cruzi: partial prevention of the natural infection of guinea pigs with a killed parasite vaccine*. Exp Parasitol, 1990. **71**(1): p. 1-8.
97. Basombrio, M. A., J. R. Nasser, M. A. Segura, and L. E. Gomez, *Trypanosoma cruzi: effect of immunization on the risk of vector-delivered infection in guinea pigs*. J Parasitol, 1997. **83**(6): p. 1059-62.
98. Perez Brandan, C., A. M. Padilla, D. Xu, R. L. Tarleton, and M. A. Basombrio, *Knockout of the dhfr-ts gene in Trypanosoma cruzi generates attenuated parasites able to confer protection against a virulent challenge*. PLoS Negl Trop Dis, 2011. **5**(12): p. e1418.
99. Sanchez-Valdez, F. J., C. Perez Brandan, G. Ramirez, A. D. Uncos, M. P. Zago, R. O. Cimino, R. M. Cardozo, J. D. Marco, A. Ferreira, and M. A. Basombrio, *A monoallelic deletion of the TcCRT gene increases the attenuation of a cultured Trypanosoma cruzi strain, protecting against an in vivo virulent challenge*. PLoS Negl Trop Dis, 2014. **8**(2): p. e2696.

100. Zago, M. P., A. B. Barrio, R. M. Cardozo, T. Duffy, A. G. Schijman, and M. A. Basombrio, *Impairment of infectivity and immunoprotective effect of a LYT1 null mutant of Trypanosoma cruzi*. Infect Immun, 2008. **76**(1): p. 443-51.
101. Solana, M. E., A. M. Celentano, V. Tekiel, M. Jones, and S. M. Gonzalez Cappa, *Trypanosoma cruzi: effect of parasite subpopulation on murine pregnancy outcome*. J Parasitol, 2002. **88**(1): p. 102-6.
102. Bern, C., M. Verastegui, R. H. Gilman, C. Lafuente, G. Galdos-Cardenas, M. Calderon, J. Pacori, M. Del Carmen Abastoflor, H. Aparicio, M. F. Brady, L. Ferrufino, N. Angulo, S. Marcus, C. Sterling, and J. H. Maguire, *Congenital Trypanosoma cruzi transmission in Santa Cruz, Bolivia*. Clin Infect Dis, 2009. **49**(11): p. 1667-74.
103. Moore, T. and G. S. Dveksler, *Pregnancy-specific glycoproteins: complex gene families regulating maternal-fetal interactions*. Int J Dev Biol, 2014. **58**(2-4): p. 273-80.
104. Ha, C. T., R. Waterhouse, J. Wessells, J. A. Wu, and G. S. Dveksler, *Binding of pregnancy-specific glycoprotein 17 to CD9 on macrophages induces secretion of IL-10, IL-6, PGE2, and TGF-beta1*. J Leukoc Biol, 2005. **77**(6): p. 948-57.
105. Blois, S. M., G. Sulkowski, I. Tirado-Gonzalez, J. Warren, N. Freitag, B. F. Klapp, D. Rifkin, I. Fuss, W. Strober, and G. S. Dveksler, *Pregnancy-specific glycoprotein 1 (PSG1) activates TGF-beta and prevents dextran sodium sulfate (DSS)-induced colitis in mice*. Mucosal Immunol, 2014. **7**(2): p. 348-58.
106. Soares, M. J., *The prolactin and growth hormone families: pregnancy-specific hormones/cytokines at the maternal-fetal interface*. Reprod Biol Endocrinol, 2004. **2**: p. 51.
107. Rio-Araiza, V. H. D., K. E. Nava-Castro, F. Alba-Hurtado, A. Quintanar-Stephano, H. Aguilar-Diaz, M. A. Munoz-Guzman, P. Ostoa-Saloma, M. D. Ponce-Regalado, and J. Morales-Montor, *Prolactin as immune cell regulator in Toxocara canis somatic larvae chronic infection*. Biosci Rep, 2018. **38**(4).
108. Mohammadpour, A., H. Keshavarz, M. Mohebbi, M. Salimi, A. Teimouri, and S. Shojaei, *The relation of serum prolactin levels and Toxoplasma infection in humans*. Int J Gen Med, 2019. **12**: p. 7-12.
109. Galvan-Ramirez Mde, L., A. F. Gutierrez-Maldonado, F. Verduzco-Grijalva, and J. M. Jimenez, *The role of hormones on Toxoplasma gondii infection: a systematic review*. Front Microbiol, 2014. **5**: p. 503.
110. Correa-de-Santana, E., M. Paez-Pereda, M. Theodoropoulou, U. Renner, J. Stalla, G. K. Stalla, and W. Savino, *Modulation of growth hormone and prolactin secretion in Trypanosoma cruzi-infected mammosomatotrophic cells*. Neuroimmunomodulation, 2009. **16**(3): p. 208-12.
111. Nguyen, N. N. T., Y. S. Lim, L. P. Nguyen, S. C. Tran, T. T. D. Luong, T. T. T. Nguyen, H. T. Pham, H. N. Mai, J. W. Choi, S. S. Han, and S. B. Hwang, *Hepatitis C Virus Modulates Solute carrier family 3 member 2 for Viral Propagation*. Sci Rep, 2018. **8**(1): p. 15486.
112. Castillo, C., I. Carrillo, G. Libisch, N. Juiz, A. Schijman, C. Robello, and U. Kemmerling, *Host-parasite interaction: changes in human placental gene expression induced by Trypanosoma cruzi*. Parasit Vectors, 2018. **11**(1): p. 479.
113. Guttman, J. A. and B. B. Finlay, *Tight junctions as targets of infectious agents*. Biochim Biophys Acta, 2009. **1788**(4): p. 832-41.

114. Jimenez-Pelayo, L., M. Garcia-Sanchez, J. Regidor-Cerrillo, P. Horcajo, E. Collantes-Fernandez, M. Gomez-Bautista, N. Hambruch, C. Pfarrer, and L. M. Ortega-Mora, *Differential susceptibility of bovine caruncular and trophoblast cell lines to infection with high and low virulence isolates of Neospora caninum*. Parasit Vectors, 2017. **10**(1): p. 463.
115. Malvestio, L. M., M. R. Celes, C. Milanezi, J. S. Silva, L. A. Jelicks, H. B. Tanowitz, M. A. Rossi, and C. M. Prado, *Role of dystrophin in acute Trypanosoma cruzi infection*. Microbes Infect, 2014. **16**(9): p. 768-77.
116. Durrani, Z., W. Weir, S. Pillai, J. Kinnaird, and B. Shiels, *Modulation of activation-associated host cell gene expression by the apicomplexan parasite Theileria annulata*. Cell Microbiol, 2012. **14**(9): p. 1434-54.
117. Arango Duque, G., M. Fukuda, and A. Descoteaux, *Synaptotagmin XI regulates phagocytosis and cytokine secretion in macrophages*. J Immunol, 2013. **190**(4): p. 1737-45.
118. Grimes, D., R. Johnson, M. Pashos, C. Cummings, C. Kang, G. R. Sampedro, E. Tycksen, H. J. McBride, R. Sah, C. A. Lowell, and R. A. Clemens, *ORAI1 and ORAI2 modulate murine neutrophil calcium signaling, cellular activation, and host defense*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2020. **117**(39): p. 24403-24414.
119. Rodriguez, M. E., M. Rizzi, L. D. Caeiro, Y. E. Masip, A. Perrone, D. O. Sanchez, J. Bua, and V. Tekiel, *Transmigration of Trypanosoma cruzi trypomastigotes through 3D cultures resembling a physiological environment*. Cell Microbiol, 2020. **22**(8): p. e13207.
120. Yang, A. S. P., M. T. O'Neill, C. Jennison, S. Lopaticki, C. C. Allison, J. S. Armistead, S. M. Erickson, K. L. Rogers, A. M. Ellisdon, J. C. Whisstock, R. E. Tweedell, R. R. Dinglasan, D. N. Douglas, N. M. Kneteman, and J. A. Boddey, *Cell Traversal Activity Is Important for Plasmodium falciparum Liver Infection in Humanized Mice*. Cell Rep, 2017. **18**(13): p. 3105-3116.
121. Juiz, N. A., I. Torrejon, M. Burgos, A. M. F. Torres, T. Duffy, N. M. Cayo, A. Tabasco, M. Salvo, S. A. Longhi, and A. G. Schijman, *Alterations in Placental Gene Expression of Pregnant Women with Chronic Chagas Disease*. Am J Pathol, 2018. **188**(6): p. 1345-1353.
122. Chen, H., Y. Yuan, C. Zhang, A. Luo, F. Ding, J. Ma, S. Yang, Y. Tian, T. Tong, Q. Zhan, and Z. Liu, *Involvement of S100A14 protein in cell invasion by affecting expression and function of matrix metalloproteinase (MMP)-2 via p53-dependent transcriptional regulation*. J Biol Chem, 2012. **287**(21): p. 17109-17119.
123. Qian, J., F. Ding, A. Luo, Z. Liu, and Z. Cui, *Overexpression of S100A14 in human serous ovarian carcinoma*. Oncol Lett, 2016. **11**(2): p. 1113-1119.
124. Chen, B., A. L. Miller, M. Rebelatto, Y. Brewah, D. C. Rowe, L. Clarke, M. Czapiga, K. Rosenthal, T. Imamichi, Y. Chen, C. S. Chang, P. S. Chowdhury, B. Naiman, Y. Wang, D. Yang, A. A. Humbles, R. Herbst, and G. P. Sims, *S100A9 induced inflammatory responses are mediated by distinct damage associated molecular patterns (DAMP) receptors in vitro and in vivo*. PLoS One, 2015. **10**(2): p. e0115828.
125. Kim, Min A, You Sun Lee, Chung Won Lee, and Kyung Seo, *Expression of S100A14 in placenta and its potential role in chorioamnionitis*. Placenta, 2014. **35**(9): p. A89.

126. Kozlyuk, N., A. J. Monteith, V. Garcia, S. M. Damo, E. P. Skaar, and W. J. Chazin, *S100 Proteins in the Innate Immune Response to Pathogens*. Methods Mol Biol, 2019. **1929**: p. 275-290.
127. Ge, Y., M. Huang, and Y. M. Yao, *Immunomodulation of Interleukin-34 and its Potential Significance as a Disease Biomarker and Therapeutic Target*. Int J Biol Sci, 2019. **15**(9): p. 1835-1845.
128. Weckman, A. M., M. Ngai, J. Wright, C. R. McDonald, and K. C. Kain, *The Impact of Infection in Pregnancy on Placental Vascular Development and Adverse Birth Outcomes*. Front Microbiol, 2019. **10**: p. 1924.
129. Megli, C., S. Morosky, D. Rajasundaram, and C. B. Coyne, *Inflammasome signaling in human placental trophoblasts regulates immune defense against Listeria monocytogenes infection*. J Exp Med, 2021. **218**(1).
130. Subramanian Vignesh, K. and G. S. Deepe, Jr., *Metallothioneins: Emerging Modulators in Immunity and Infection*. Int J Mol Sci, 2017. **18**(10).
131. Megli, C. J. and C. B. Coyne, *Infections at the maternal-fetal interface: an overview of pathogenesis and defence*. Nat Rev Microbiol, 2021.
132. Carlier, Y., S. Sosa-Estani, A. O. Luquetti, and P. Buekens, *Congenital Chagas disease: an update*. Mem Inst Oswaldo Cruz, 2015. **110**(3): p. 363-8.
133. Antinori, S. and M. Corbellino, *Chagas disease in Europe: A long way to go*. Eur J Intern Med, 2018. **48**: p. e29-e30.
134. Sharma, D., S. Shastri, and P. Sharma, *Intrauterine Growth Restriction: Antenatal and Postnatal Aspects*. Clin Med Insights Pediatr, 2016. **10**: p. 67-83.
135. Bobetsis, Y. A., S. P. Barros, D. M. Lin, R. M. Arce, and S. Offenbacher, *Altered gene expression in murine placentas in an infection-induced intrauterine growth restriction model: a microarray analysis*. J Reprod Immunol, 2010. **85**(2): p. 140-8.
136. Moretti, E., B. Basso, I. Castro, M. Carrizo Paez, M. Chaul, G. Barbieri, D. Canal Feijoo, M. J. Sartori, and R. Carrizo Paez, *Chagas' disease: study of congenital transmission in cases of acute maternal infection*. Rev Soc Bras Med Trop, 2005. **38**(1): p. 53-5.

## 18. ANEXOS

## 18.1. Anexo 1. Heatmaps de conteos normalizados de genes diferencialmente expresados agrupados por término de ontología

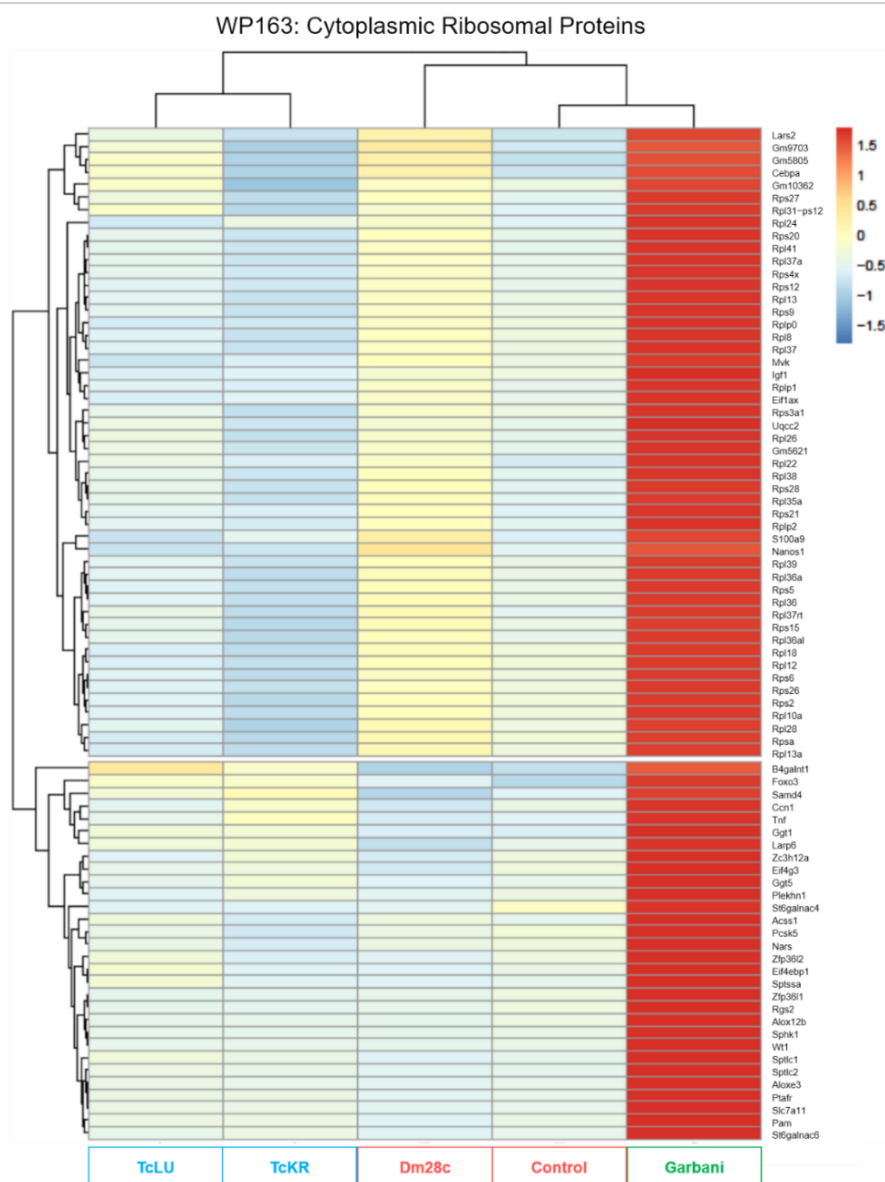


Figura 26. Genes diferencialmente expresados relacionados al termino de ontología “*Cytoplasmic Ribosomal Proteins*”

Se grafica un valor de conteos de secuencias normalizado encontrado para cada gen en cada condición perteneciente al termino de ontología “*Cytoplasmic Ribosomal Proteins*” que se encontró diferencialmente inducido en las placentas del grupo Garbani.

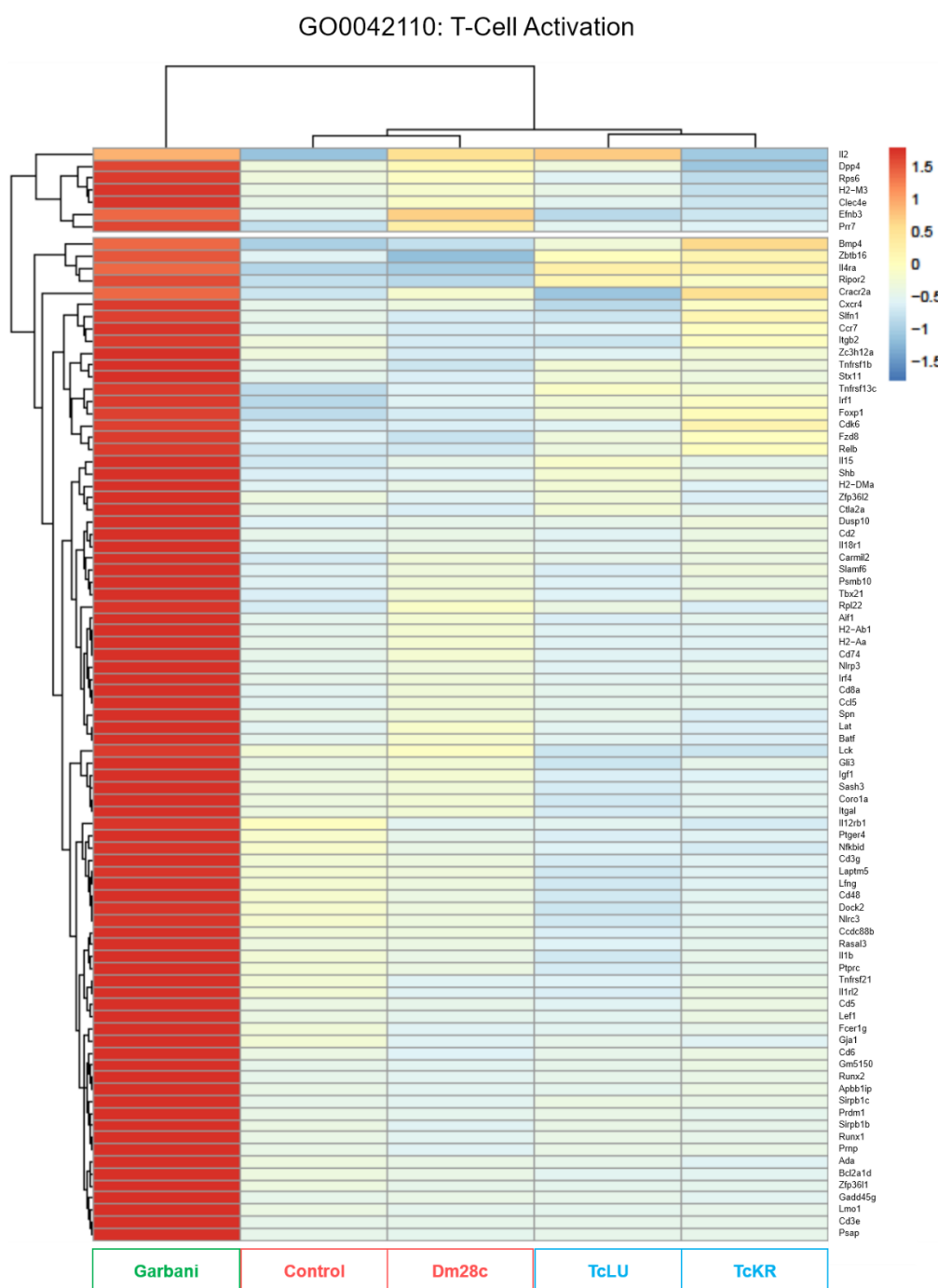


Figura 27. Genes diferencialmente expresados relacionados al termino de ontología “*T-cell activation*”

Se grafica un valor de conteos de secuencias normalizado encontrado para cada gen en cada condición perteneciente al termino de ontología “*T-cell activation*” que se encontró diferencialmente inducido en las placentas del grupo Garbani.



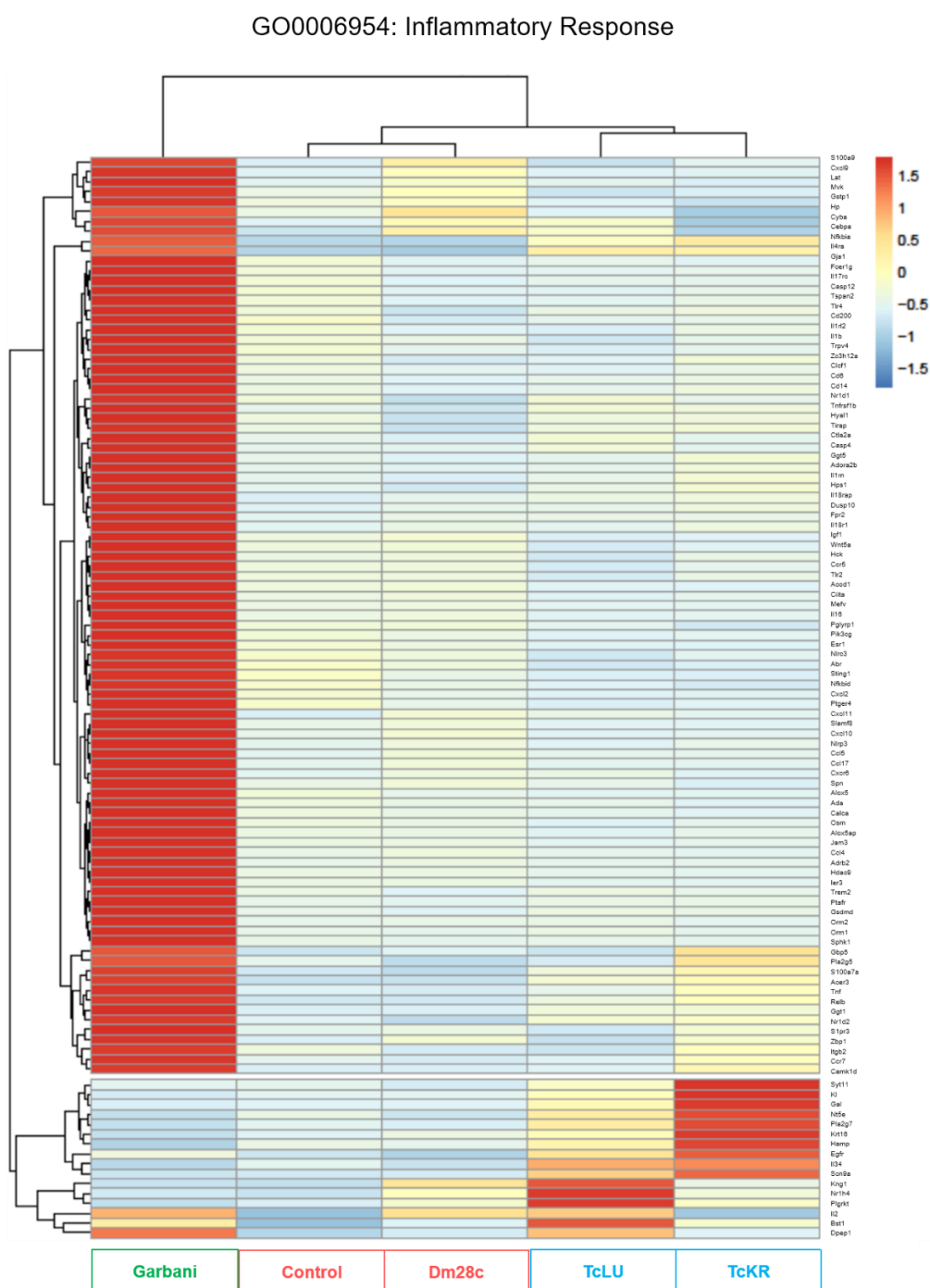


Figura 28. Genes diferencialmente expresados relacionados al termino de ontología “*Inflammatory Response*”

Se grafica un valor de conteos de secuencias normalizado encontrado para cada gen en cada condición perteneciente al termino de ontología “*Inflammatory Response*” que se encontró diferencialmente inducido en las placentas del grupo Garbani.

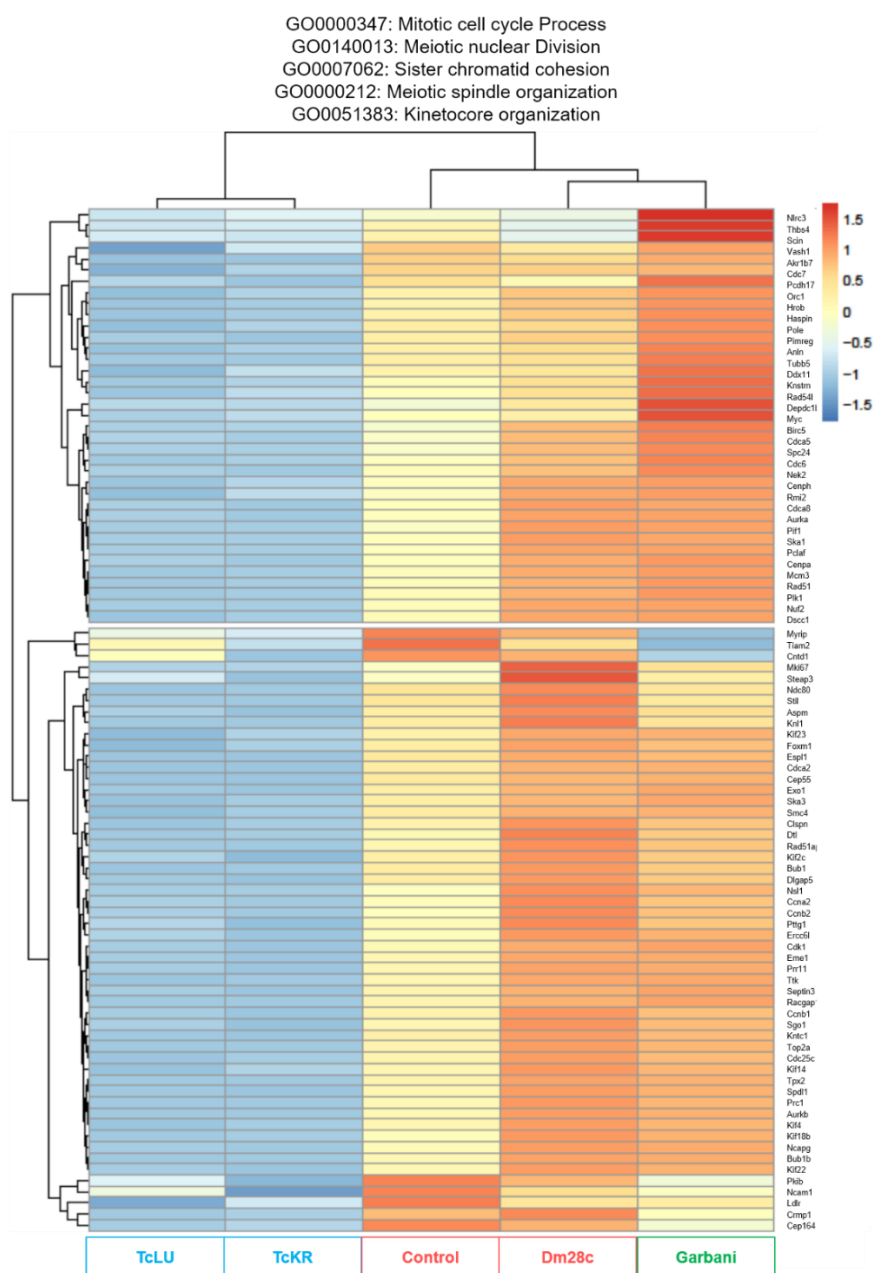


Figura 29. Genes diferencialmente expresados relacionados a los términos de ontología “*Mitotic cell cycle process*”, “*Meiotic nuclear division*”, “*Sister chromatid cohesion*”, “*Meiotic spindle organization*” and “*Kinetocore organization*”

Se grafica un valor de conteos de secuencias normalizado encontrado para cada gen en cada condición perteneciente a los términos de ontología mencionados que se encontraron diferencialmente suprimidos en las placentas de los aislados de VT TcKR y TcLU.

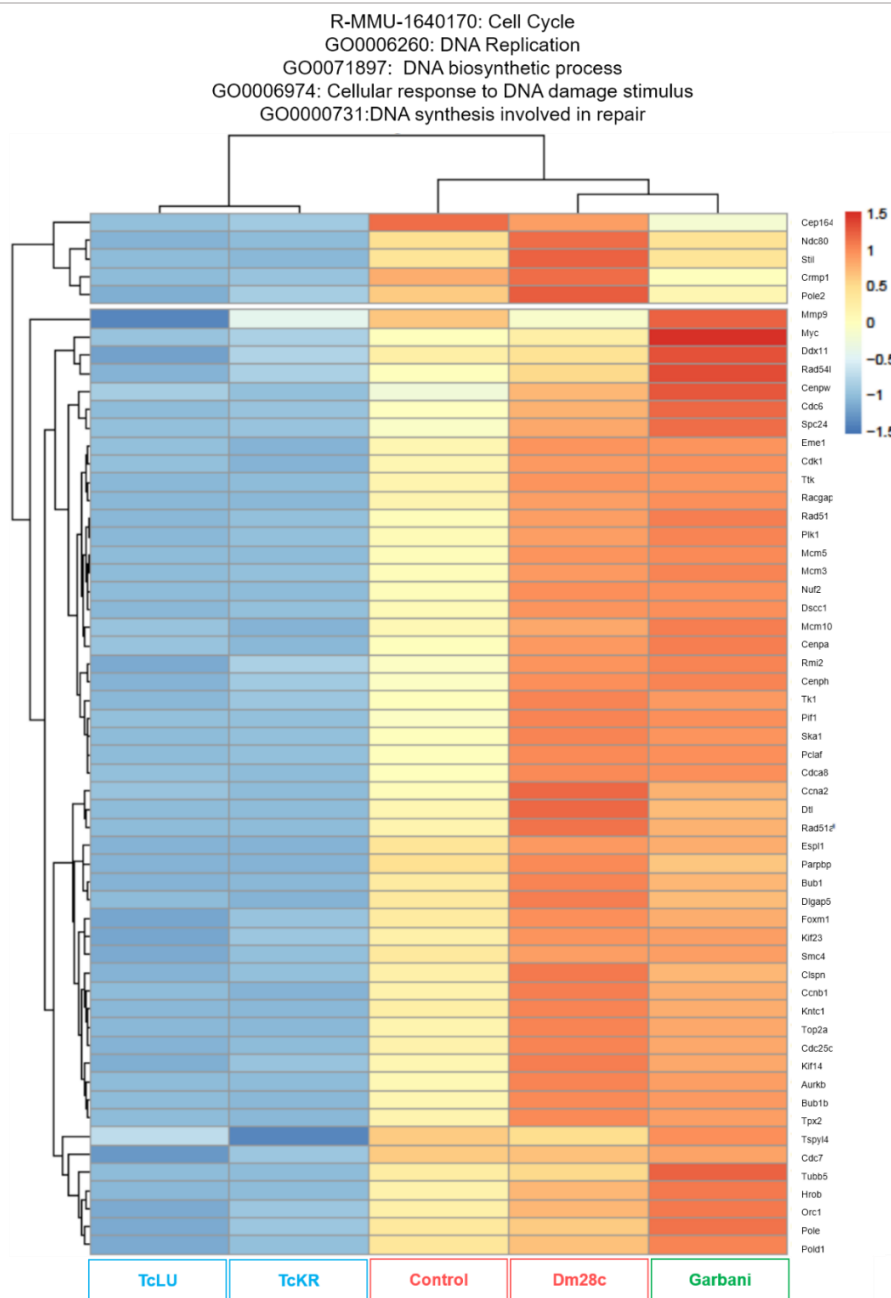


Figura 30. Genes diferencialmente expresados relacionados a los términos de ontología “*Cell cycle*”, “*DNA Replication*”, “*DNA biosynthetic process*”, “*Cellular response to DNA damage stimulus*” and “*DNA synthesis involved in repair*”

Se grafica un valor de conteos de secuencias normalizado encontrado para cada gen en cada condición perteneciente a los términos de ontología mencionados que se encontraron diferencialmente suprimidos en las placentas de los aislados de VT TcKR y TcLU.

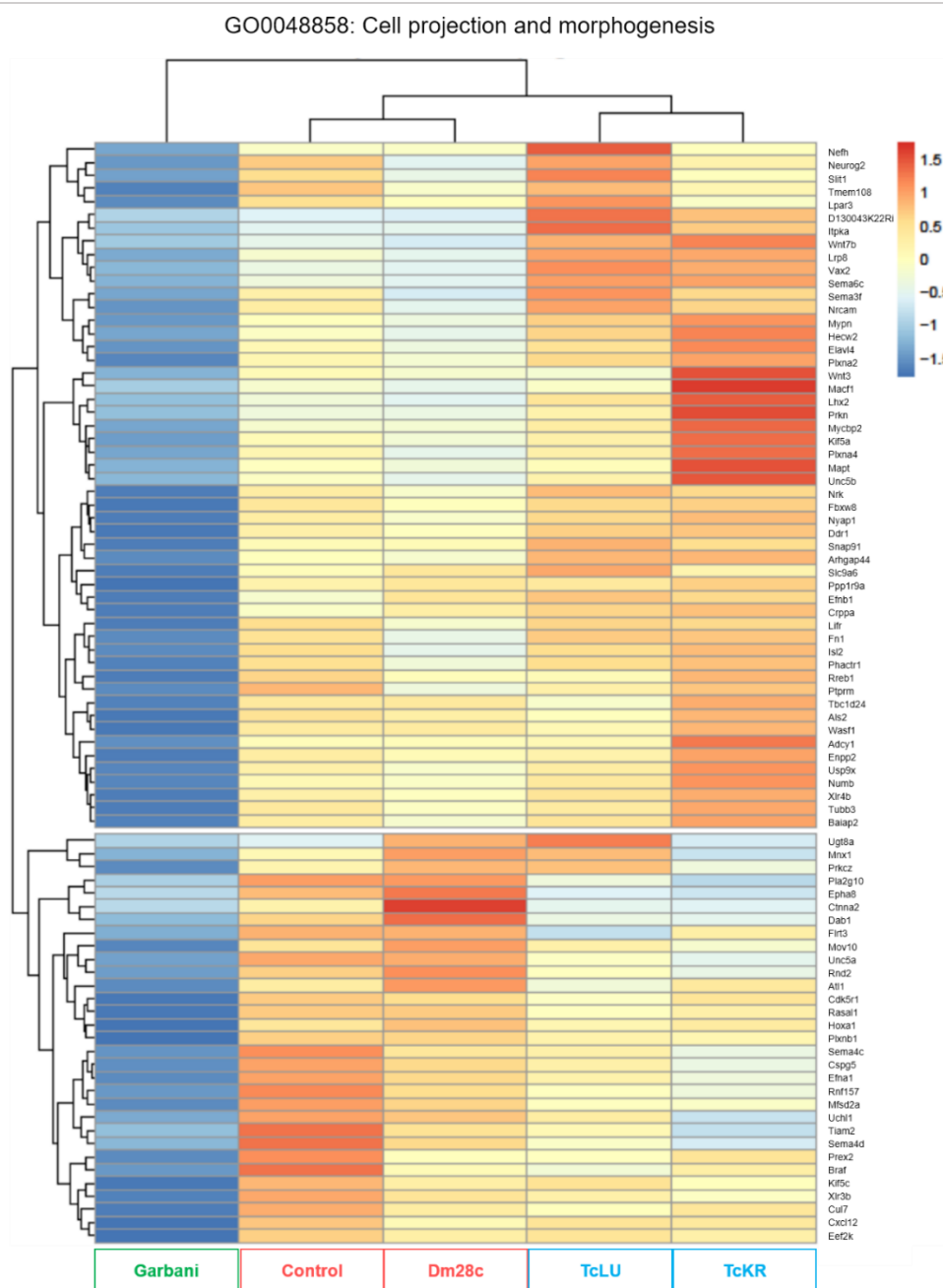


Figura 31. Genes diferencialmente expresados relacionados al termino de ontología “*Cell projection and morphogenesis*”

Se grafica un valor de conteos de secuencias normalizado encontrado para cada gen en cada condición y perteneciente al término de ontología mencionado que se encontraron diferencialmente suprimidos en las placentas del grupo Garbani.

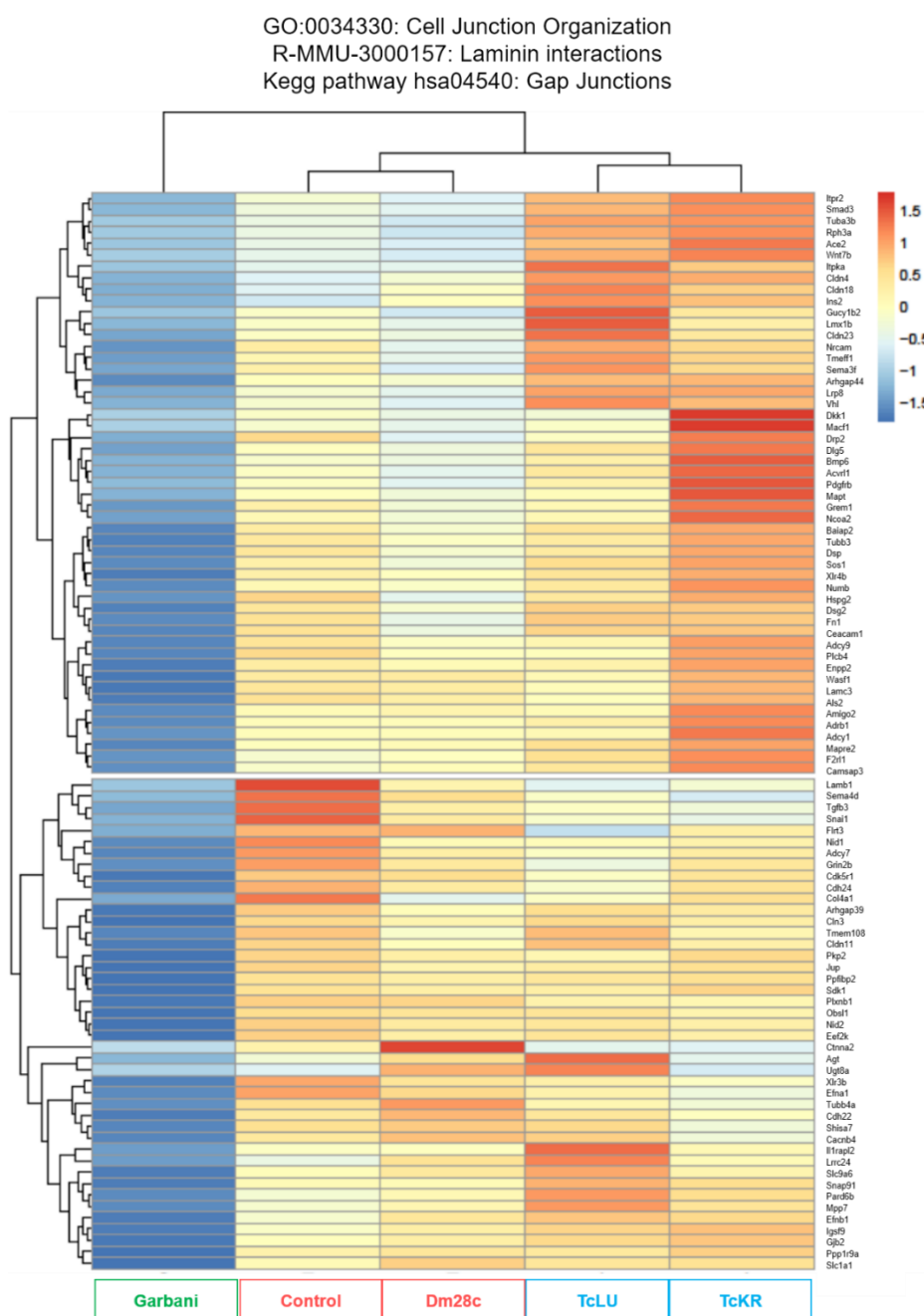


Figura 32. Genes diferencialmente expresados relacionados a los términos de ontología “*Cell junction organization*”, “*Laminin interactions*”, and “*Gap junctions*”

Se grafica un valor de conteos de secuencias normalizado encontrado para cada gen en cada condición y perteneciente al término de ontología mencionado que se encontraron diferencialmente suprimidos en las placentas del grupo Garbani.

GO:0044242 : Cellular Lipid catabolic process  
GO0015849: Organic acid transport

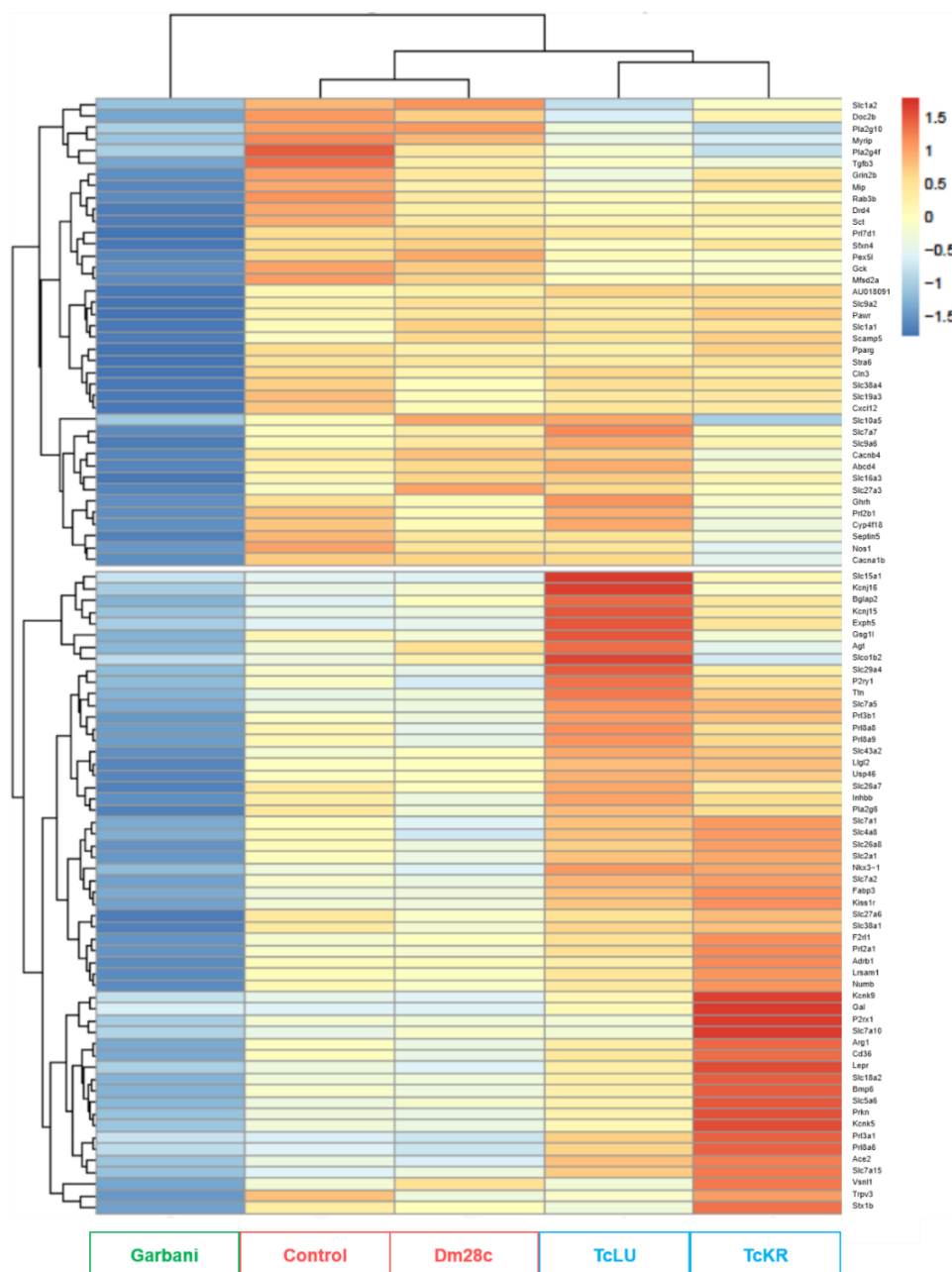


Figura 33. Genes diferencialmente expresados relacionados a los términos de ontología "*Cellular lipid catabolic process*", and "*Organic Acid Transport*"

Se grafica un valor de conteos de secuencias normalizado encontrado para cada gen en cada condición y perteneciente al término de ontología mencionado que se encontraron diferencialmente suprimidos en las placentas del grupo Garbani.

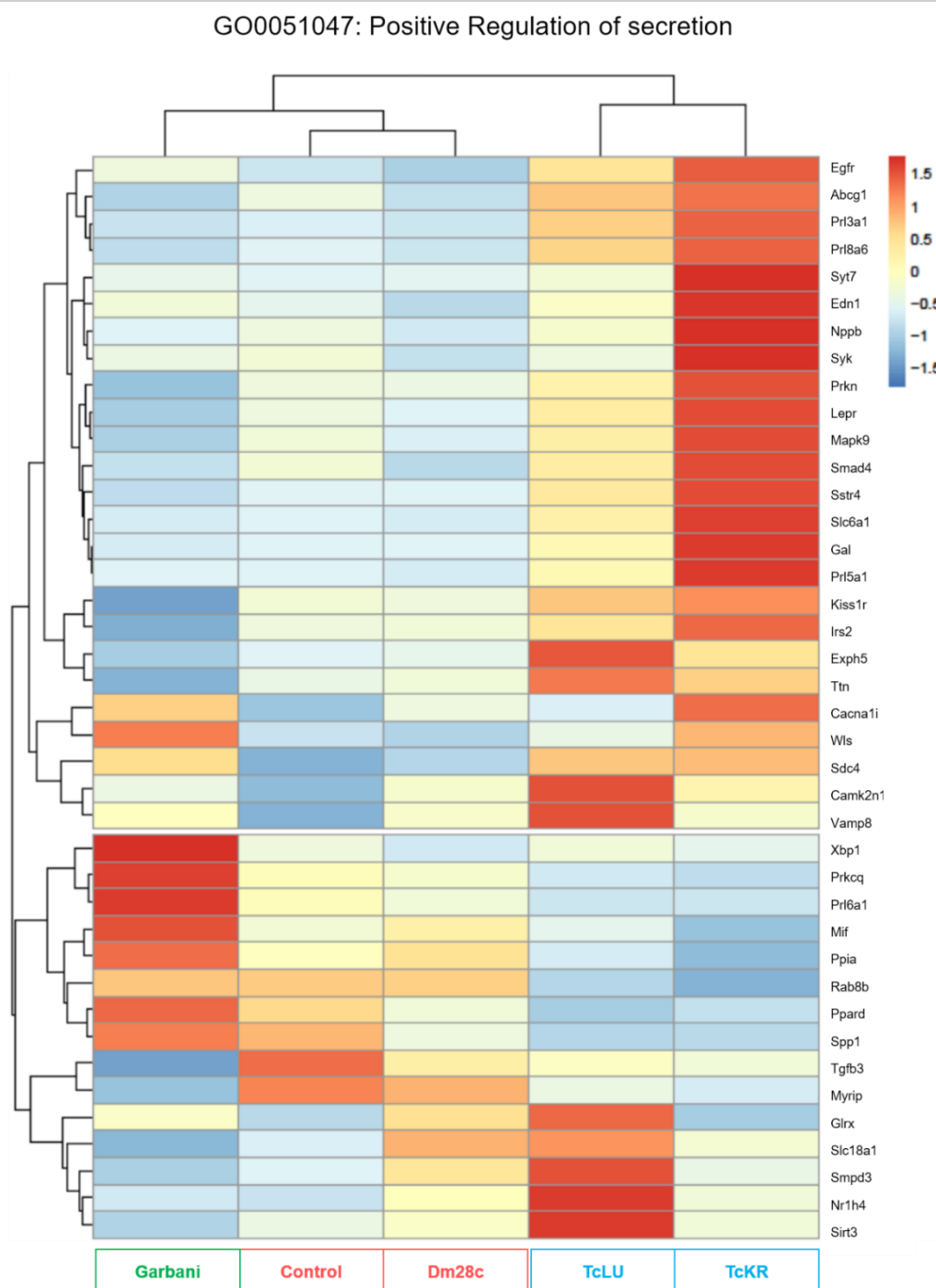


Figura 34. Genes diferencialmente expresados relacionados al termino de ontología "*Positive regulation of secretion*"

Se grafica un valor de conteos de secuencias normalizado encontrado para cada gen en cada condición y perteneciente al término de ontología mencionado que se encontró enriquecido tanto inducido en los aislados de VT como en el grupo Garbani.

## GO0098657: Import to the cell

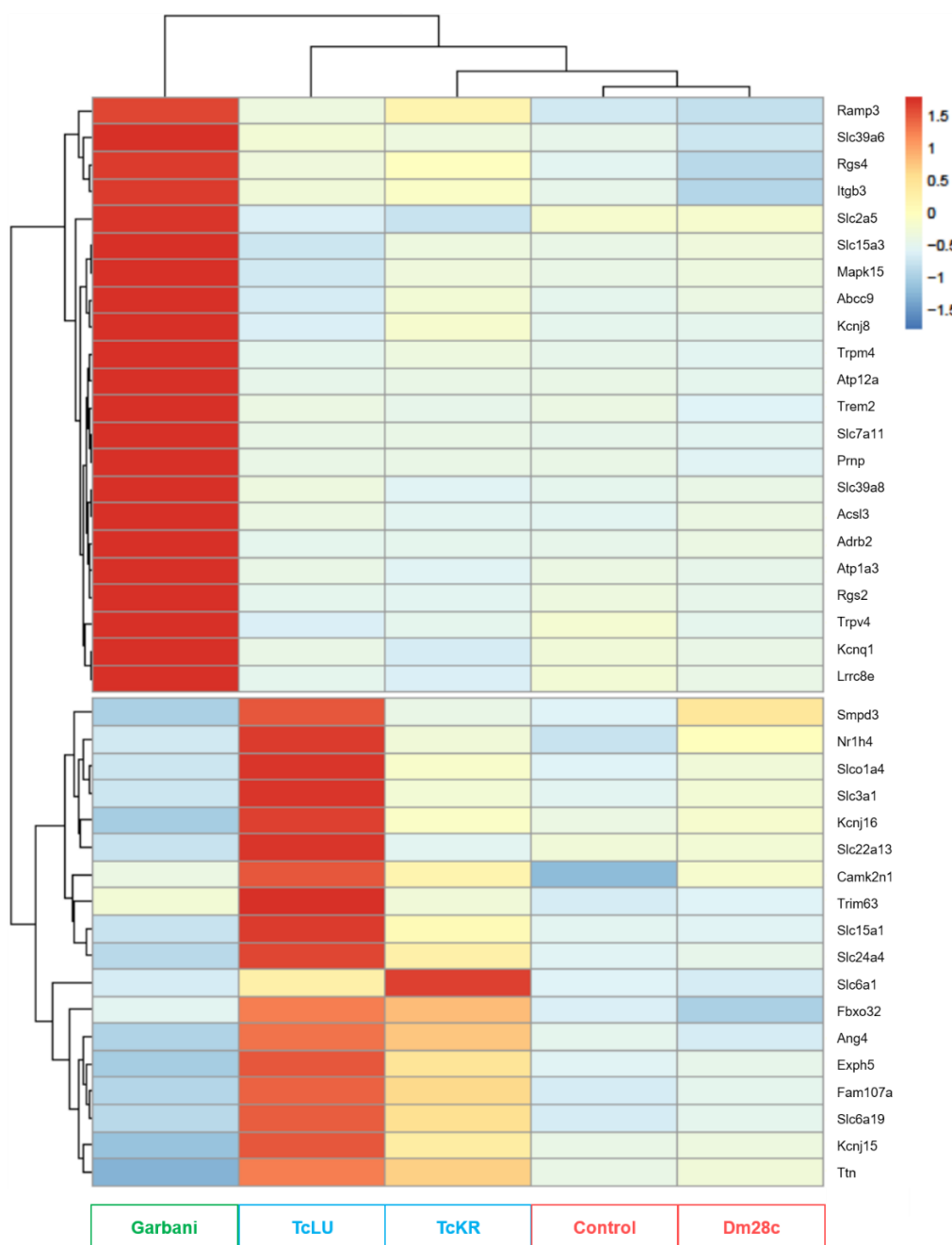


Figura 35. Genes diferencialmente expresados relacionados al termino de ontología *"Import to the cell"*

Se grafica un valor de conteos de secuencias normalizado encontrado para cada gen en cada condición y perteneciente al término de ontología mencionado que se encontró enriquecido tanto inducido en los aislados de VT como en el grupo Garbani.



## 18.2. Anexo 2. Heatmaps de todos los genes relacionados a un proceso

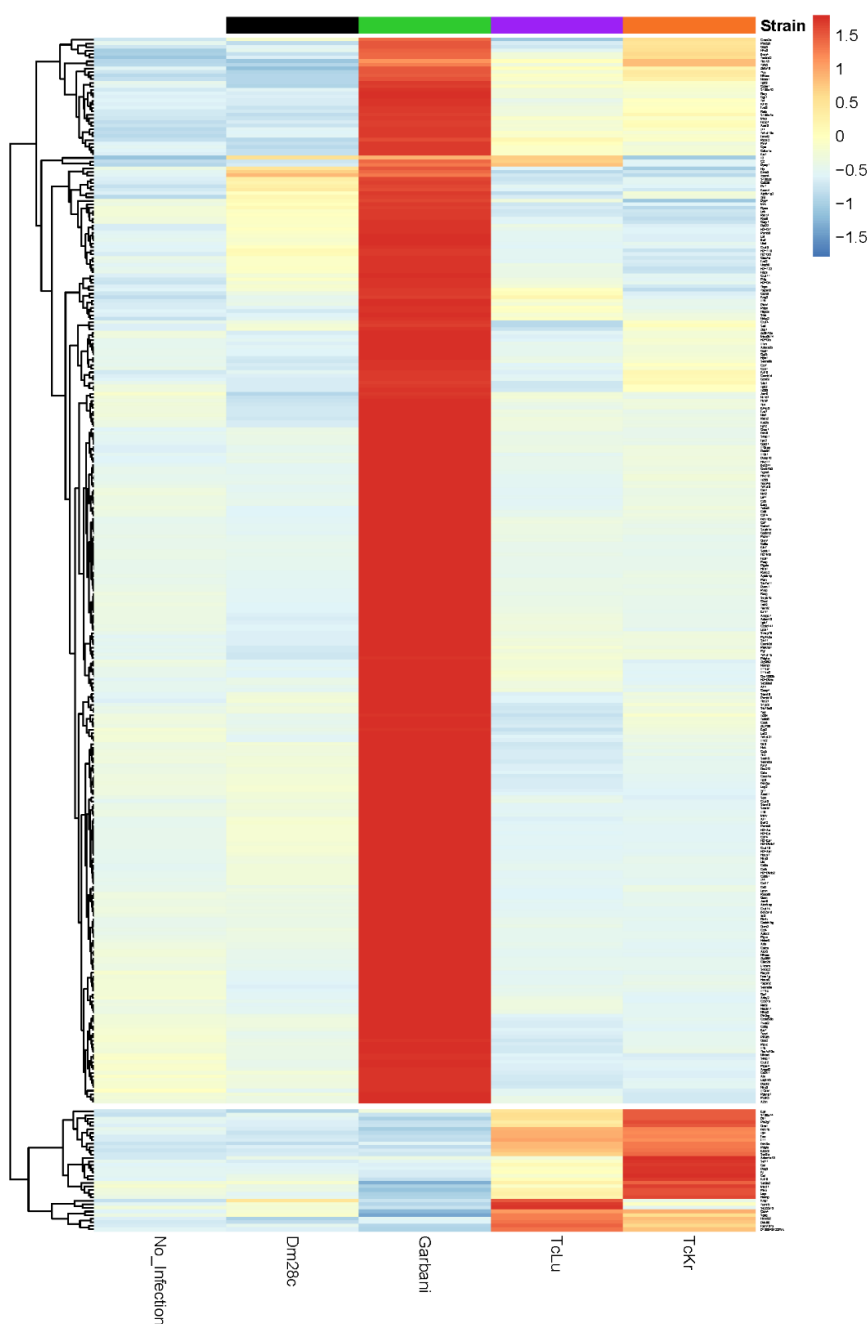


Figura 36. Comportamiento de todos los genes relacionados a Respuesta inmune

Se grafica un valor de conteos de secuencias normalizado encontrado para cada gen en cada condición y perteneciente al término de ontología “*immune response*” independientemente de si está diferencialmente expresado o su valor de p.

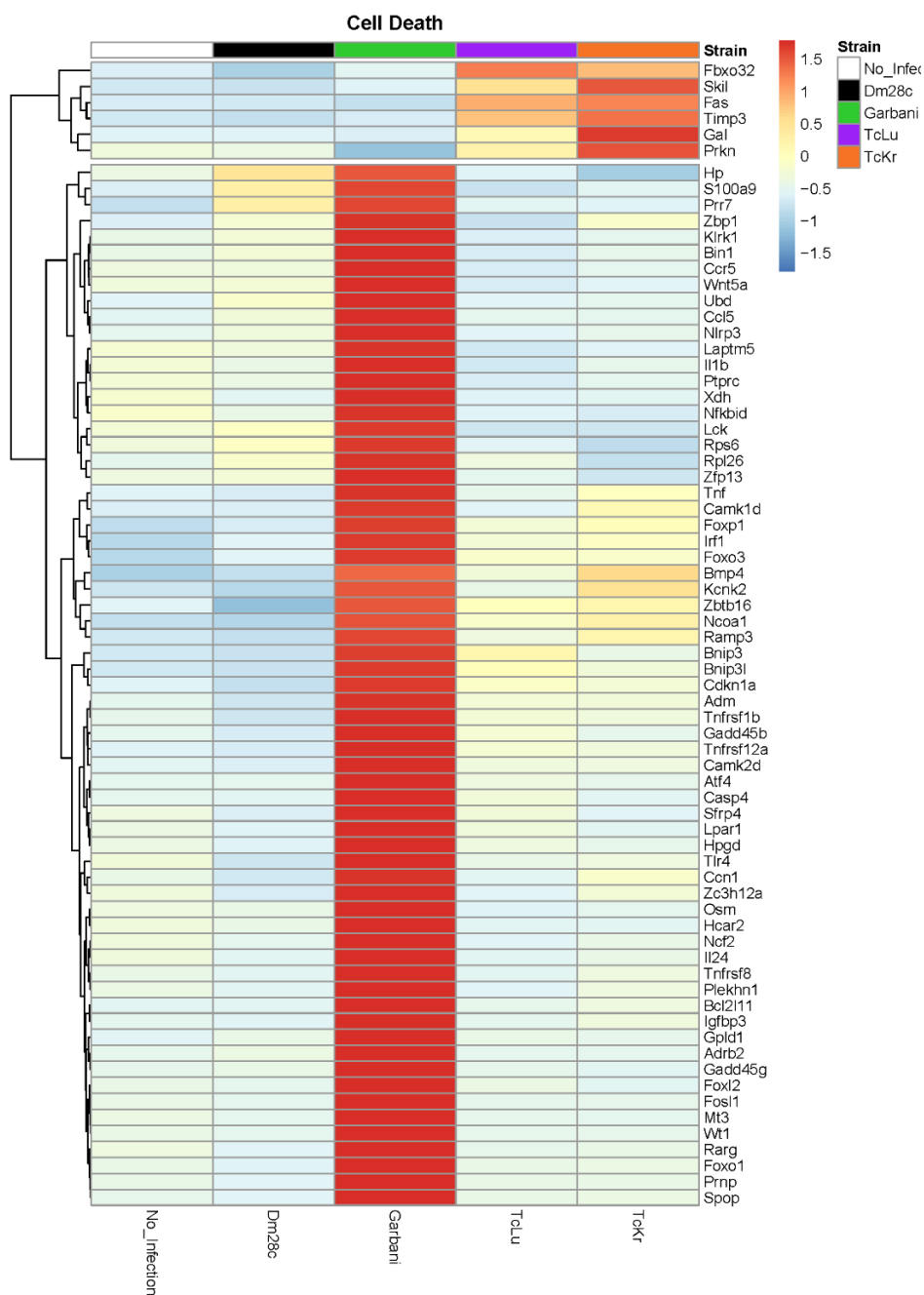


Figura 37. Comportamiento de todos los genes relacionados a Muerte celular

Se grafica un valor de conteos de secuencias normalizado encontrado para cada gen en cada condición y perteneciente al término de ontología “muerte celular” independientemente de si está diferencialmente expresado o su valor de p.

### 18.3. Anexo 3. Otras publicaciones

Durante el desarrollo de mi tesis doctoral participe activamente en otros trabajos de investigación llevados adelante por otros investigadores e investigadoras dentro del grupo de Interacciones Hospedero Patógeno. También colaboré con grupos de investigación de otras instituciones nacionales e internacionales. En el marco de estas colaboraciones he escrito proyectos, realizado formación de recursos humanos y también hemos publicado trabajos. A continuación se detalla una lista de las publicaciones en las que he participado durante los años de doctorado (2015-2021):

Berná L, Greif G, Pita S, **Faral-Tello P**, Diaz-Viraque F, De Cassia Moreira R, Vallejo GA, Alvarez-Valin F, Robello C. Maxicircle architecture and evolutionary insights into *Trypanosoma cruzi* complex. Plos Neg Trop Dis 15(8):e0009719. 2021. Doi: 10.1371/journal.pntd.0009719

Perdomo C, Aguilera E, Corvo I, **Faral-Tello P**, Serna E, Robello C, Wilkinson SR, Yaluff G, Alvarez G. Preclinical Studies in Anti-Trypanosomatidae Drug Development. Pharmaceuticals (Basel). 2021 Jul 5;14(7):644. doi: 10.3390/ph14070644. PMID: 34358070; PMCID: PMC8308625.

Arias DG, Cabeza MS, Echarren ML, **Faral-Tello P**, Iglesias AA, Robello C, Guerrero SA. On the functionality of a methionine sulfoxide reductase B from *Trypanosoma cruzi*. Free Radic Biol Med. 2020 Oct;158:96-114. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2020.06.035. Epub 2020 Jul 15. PMID: 32682073.

Aguilera E, Perdomo C, Espindola A, Corvo I, **Faral-Tello P**, Robello C, Serna E, Benítez F, Riveros R, Torres S, Vera de Bilbao NI, Yaluff G, Alvarez G. A Nature-Inspired Design Yields a New Class of Steroids Against Trypanosomatids. Molecules. 2019 Oct 22;24(20):3800. doi: 10.3390/molecules24203800. PMID: 31652542; PMCID: PMC6832524.

Correa R, Coronado L, Caballero Z, **Faral-Tello P**, Robello C, Spadafora C. Extracellular vesicles carrying lactate dehydrogenase induce suicide in increased population density of *Plasmodium falciparum* in vitro. Sci Rep. 2019 Mar 25;9(1):5042. doi: 10.1038/s41598-019-41697-x. Erratum in: Sci Rep. 2020 Jul 27;10(1):12717. PMID: 30911042; PMCID: PMC6434017.

Libisch MG, **Faral-Tello P**, Garg NJ, Radi R, Piacenza L, Robello C. Early *Trypanosoma cruzi* Infection Triggers mTORC1-Mediated Respiration Increase and Mitochondrial Biogenesis in Human Primary Cardiomyocytes. *Front Microbiol.* 2018 Aug 16;9:1889. doi: 10.3389/fmicb.2018.01889. PMID: 30166980; PMCID: PMC6106620.

Varela J, Birriel E, Nargoli J, Faral-Tello P, Robello C, Coqueiro A, Hae Choi Y, Cerecetto H, González M. Identification of New Anti-*Trypanosoma Cruzi* Agents in Some Uruguayan Plants by NMR-Based Metabolomic Profiling. *Arch Nat Med Chem* 2017: ANMC-105.

Greif G, **Faral-Tello P**, Scardoelli Vianna C, Hernandez A, Basmadjian Y, Robello C. The first case report of trypanosomiasis caused by *Trypanosoma evansi* in Uruguay. *Vet Parasitol Reg Stud Reports.* 2018 Jan;11:19-21. doi: 10.1016/j.vprsr.2017.11.002. Epub 2017 Nov 11. PMID: 31014612.

Pizzo C, **Faral-Tello P**, Yaluff G, Serna E, Torres S, Vera N, Saiz C, Robello C, Mahler G. New approach towards the synthesis of selenosemicarbazones, useful compounds for Chagas' disease. *Eur J Med Chem.* 2016 Feb 15;109:107-13. doi: 10.1016/j.ejmech.2015.12.040. Epub 2015 Dec 23. PMID: 26774036.

**18.4. Anexo 4. Publicaciones finales asociadas a esta tesis**

## Autochthonous Outbreak and Expansion of Canine Visceral Leishmaniasis, Uruguay

Dinora Satragno,<sup>1</sup> Paula Faral-Tello,<sup>1</sup>  
Bruno Canneva, Lorenzo Verger,  
Alejandra Lozano, Edgardo Vitale, Gonzalo Greif,  
Carlos Soto, Carlos Robello, Yester Basmadján

Author affiliations: Universidad de la República, Montevideo, Uruguay (D. Satragno, B. Canneva, L. Verger, A. Lozano, E. Vitale, C. Soto, C. Robello, Y. Basmadján); Instituto Pasteur, Montevideo (P. Faral-Tello, G. Greif, C. Robello)

DOI: <http://dx.doi.org/10.3201/eid2303.160377>

We report an outbreak of canine visceral leishmaniasis in Uruguay. Blood specimens from 11/45 dogs tested positive for *Leishmania* spp. Specimens of *Lutzomyia longipalpis* sand flies were captured; typing revealed *Leishmania infantum*. Our findings document an expansion of visceral leishmaniasis to southern South America and risk for vectorborne transmission to humans.

Visceral leishmaniasis (VL) is a zoonotic disease caused by flagellated protozoa of the genus *Leishmania* and transmitted by sand flies belonging to the Phlebotominae subfamily; those of the *Lutzomyia longipalpis* species are the main vectors. VL affects humans and canids; canids are identified as the main reservoir of the parasite (1). This zoonosis has been endemic in northeastern Brazil for several centuries, but it has been recently expanding to southern areas of the South American continent (2–4). In 2010, the presence of the vector *L. longipalpis* sand flies was recorded for the first time in Uruguay (5); the right environmental conditions, the presence of competent sand fly vectors, and the constant appearance of new cases of canine and human leishmaniasis in border countries have made Uruguay susceptible to VL transmission (5).

In 2015, we performed a house-by-house survey in Arenitas Blancas (31°25.000'S, 58°00.066'W) in Salto, Uruguay. We included 49 dogs in the survey. Whole-blood samples from 11 (22%) tested positive for *Leishmania* spp. with 2 different diagnostic kits, TR DPP (Bio-Manguinhos, Rio de Janeiro, Brazil) and Speed Leish K (Virbac, Carros, France), both of which detect antibodies raised against *Leishmania* antigens in whole blood, plasma, or serum by immunochromatographic methods. Among the dogs whose specimens tested positive, 8 showed the common clinical signs of skin lesions, fever, weight loss, and eye lesions; 3 were asymptomatic. Dogs

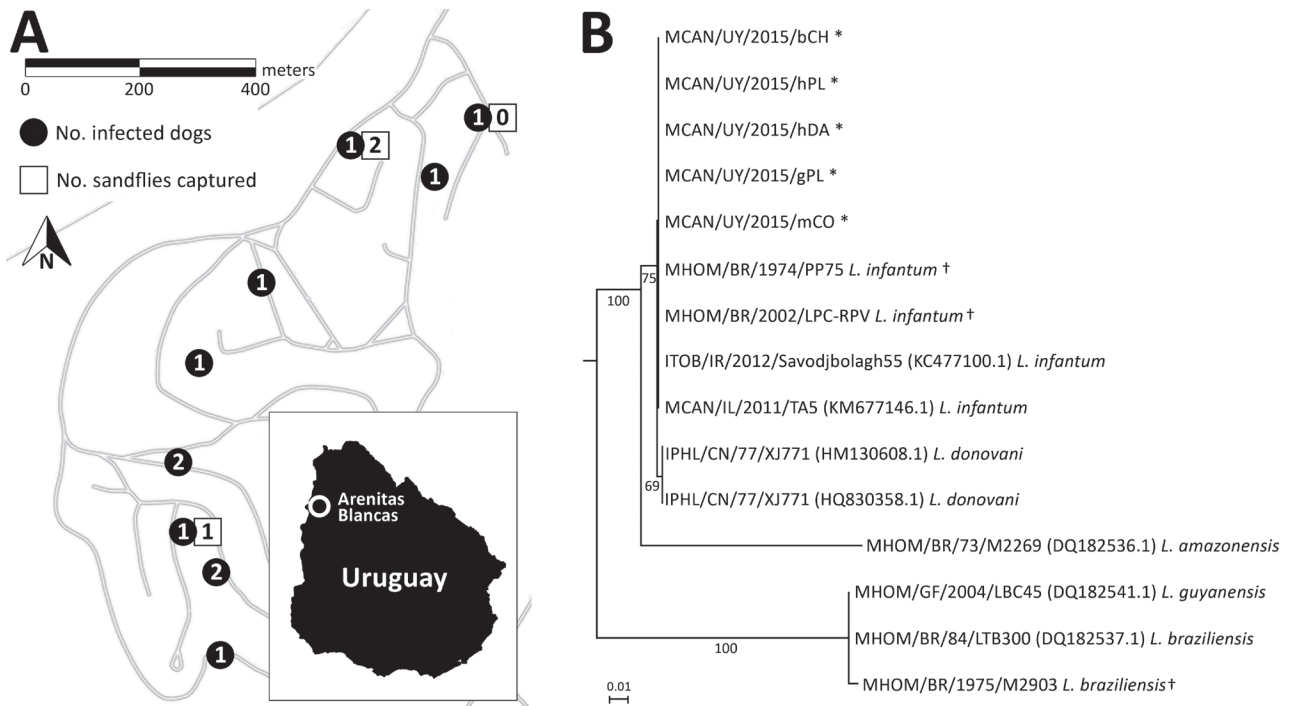
whose specimens tested positive came from 9 different houses in the same neighborhood (Figure, panel A); of these, 2 dogs had never traveled outside their residence, and in 2 other cases, both dam and offspring were infected. Three dogs came from breeding kennels, and the rest were born in Arenitas Blancas.

We performed lymph node biopsies and bone marrow aspiration in dogs whose specimens tested positive; we also confirmed infection by direct observation of amastigotes in stained slide smears of aspirates. After extracting DNA from tissue samples by using the Quick-DNA Universal kit (Zymo Research, Irvine, California, USA), we performed PCR and sequencing of the ribosomal internal transcribed spacer 1 (6) to achieve typing of *Leishmania* spp. at the species level. We aligned and analyzed the sequences by using MAFFT software (7); the neighbor-joining phylogenetic tree obtained from the analysis showed that sequences identified from our samples group together with sequences belonging to *L. infantum* reference strains that we sequenced, as well as with sequences obtained from GenBank (Figure, panel B). Accession numbers and percentage of identity of the sequences obtained from GenBank are *L. infantum*, KM677146.1 and KC477100.1 (100%); *L. donovani*, HM130608.1 and HQ830358.1 (99%); *L. amazonensis*, DQ182536.1 (86%); *L. guyanensis*, DQ182541.1 (81%); and *L. braziliensis*, DQ182537.1 (81%).

To verify that the complete domestic cycle of *Leishmania* spp. was taking place in the affected area, we placed CDC Miniature Light Traps (John W. Hock Company, Gainesville, FL, USA) in domiciles in which affected dogs had been found. All sampling was peridomestic and consisted of 13 traps placed overnight on 3 different nights; sampling resulted in collection of 3 sand flies, 1 male and 2 female. Using observational analysis, we identified the collected samples as *L. longipalpis*; this result was confirmed by PCR with species-specific primer LiCac (8,9). Furthermore, we performed PCR amplification with *Leishmania*-specific primers AJS1 and DeB8 (8) using sand fly DNA as a template. A PCR product of 300 bp from one of the sand flies was amplified and sequenced and showed *Leishmania* DNA in the vector (data not shown).

In summary, we describe an autochthonous outbreak of canine VL in Uruguay. The reported cases represent the expansion of VL to southern areas of the continent; the evidence shows that *L. infantum* is the parasite responsible for the outbreak in both canine hosts and a sand fly vector. The presence of competent vectors in the area constitutes a risk for the human population. Further work is needed to implement effective measures to control the extension of cases. It is also mandatory to improve surveillance of the vector and expand surveillance to other wild and domestic potential hosts. Finally, efforts should be made to prevent new cases of human VL in Uruguay.

<sup>1</sup>These authors contributed equally to this article.



**Figure.** Survey of *Leishmania* spp. infection in dogs in Arenitas Blancas, Salto, Uruguay. A) Surveyed area in the locality of Arenitas Blancas in Salto, Uruguay. White squares represent the location of *Lutzomyia longipalpis* sand fly captures, and black circles represent domiciles in which infected dogs were found; numbers indicate number of *Leishmania* spp.–infected sand flies or dogs at that location. B) Neighbor-joining phylogenetic tree obtained from the analysis of *Leishmania* internal transcribed spacer 1 sequences from tissue samples of infected dogs. Bootstrap values are represented at the nodes of major branches. Scale bar indicates nucleotide substitutions per site. \*Sequences obtained from infected dog samples. †Reference strains sequenced by the authors.

## Acknowledgments

We thank Victoria Barrios, Laura Odriozola, Pedro Martino, Marcelo Novoa, and Cirino Sequeira for their contribution to this work, and María Eugenia Francia (Institut Pasteur de Montevideo) for critically reading the manuscript.

This work was supported by Comisión Sectorial de Investigación Científica, Universidad de la República, Uruguay; Agencia Nacional de Investigación e Innovación (Uruguay) grant DCI-ALA/2011/023-502, “Contrato de apoyo a las políticas de innovación y cohesión territorial”; and Fondo para la Convergencia Estructural del Mercado Común del Sur (FOCEM) 03/11.

Dr. Satragno is a veterinarian in the laboratory of the Faculty’s Veterinary Hospital of the Universidad de la República, Uruguay, and has extensive experience in the diagnosis of parasitic protozoa. Ms. Faral-Tello works at the Pasteur Institute in Montevideo and has extensive experience in molecular biology and parasite cultures.

## References

- Ashford DA, David JR, Freire M, David R, Sherlock I, Eulálio MC, et al. Studies on control of visceral leishmaniasis: impact of dog control on canine and human visceral leishmaniasis in Jacobina, Bahia, Brazil. *Am J Trop Med Hyg.* 1998;59:53–7.
- Barrio A, Parodi CM, Locatelli F, Mora MC, Basombrío MA, Korenaga M, et al. *Leishmania infantum* and human visceral leishmaniasis, Argentina. *Emerg Infect Dis.* 2012;18:354–5. <http://dx.doi.org/10.3201/eid1802.110924>
- Gould IT, Perner MS, Santini MS, Saavedra SB, Bezzi G, Maglianese MI, et al. Visceral leishmaniasis in Argentina. Cases notification and distribution of vectors (2006–2012) [in Portuguese]. *Medicina (B Aires).* 2013;73:104–10.
- Maia-Elkhoury AN, Alves WA, Sousa-Gomes ML, Sena JM, Luna EA. Visceral leishmaniasis in Brazil: trends and challenges. *Cad Saude Publica.* 2008;24:2941–7. <http://dx.doi.org/10.1590/S0102-311X2008001200024>
- Salomón OD, Basmajdian Y, Fernández MS, Santini MS. *Lutzomyia longipalpis* in Uruguay: the first report and the potential of visceral leishmaniasis transmission. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2011;106:381–2. <http://dx.doi.org/10.1590/S0074-02762011000300023>
- Schönian G, Nasereddin A, Dinse N, Schweynoch C, Schallig HD, Presber W, et al. PCR diagnosis and characterization of *Leishmania* in local and imported clinical samples. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2003;47:349–58. [http://dx.doi.org/10.1016/S0732-8893\(03\)00093-2](http://dx.doi.org/10.1016/S0732-8893(03)00093-2)
- Katoh K, Standley DM. MAFFT multiple sequence alignment software version 7: improvements in performance and usability. *Mol Biol Evol.* 2013;30:772–80. <http://dx.doi.org/10.1093/molbev/mst010>
- Smyth AJ, Ghosh A, Hassan MQ, Basu D, De Bruijn MH, Adhya S, et al. Rapid and sensitive detection of *Leishmania* kinetoplast DNA from spleen and blood samples of kala-azar patients. *Parasitology.* 1992;105:183–92. <http://dx.doi.org/10.1017/S0031182000074096>

9. Lins RM, Oliveira SG, Souza NA, de Queiroz RG, Justiniano SC, Ward RD, et al. Molecular evolution of the cacophony IVS6 region in sandflies. *Insect Mol Biol*. 2002;11:117–22. <http://dx.doi.org/10.1046/j.1365-2583.2002.00315.x>

Addresses for correspondence: Carlos Robello, Unidad de Biología, Molecular Institut Pasteur de Montevideo, Matajo 2020 CP11400, Montevideo, Uruguay; email: [robello@pasteur.edu.uy](mailto:robello@pasteur.edu.uy); Yester Basmadján, Departamento de Parasitología y Micología, Instituto de Higiene. Avda Alfredo Navarro 3051, CP 11600, Montevideo, Uruguay; email: [yesterb@gmail.com](mailto:yesterb@gmail.com)

## Worldwide Endemicity of a Multidrug-Resistant *Staphylococcus capitis* Clone Involved in Neonatal Sepsis

Marine Butin, Patricia Martins-Simões, Jean-Philippe Rasigade, Jean-Charles Picaud, Frédéric Laurent

Author affiliations: Hospices Civils de Lyon, Lyon, France (M. Butin, P. Martins-Simões, J-P. Rasigade, J-C. Picaud, F. Laurent); INSERM, Lyon (M. Butin, P. Martins-Simões, J-P. Rasigade, F. Laurent); Claude Bernard University Lyon 1, Villeurbanne, France (J-P. Rasigade, J-C. Picaud, F. Laurent)

DOI: <http://dx.doi.org/10.3201/eid2303.160833>

A multidrug-resistant *Staphylococcus capitis* clone, NRCS-A, has been isolated from neonatal intensive care units in 17 countries throughout the world. *S. capitis* NRCS-A prevalence is high in some neonatal intensive care units in France. These data highlight the worldwide endemicity and epidemiologic relevance of this multidrug-resistant, coagulase-negative staphylococci clone.

Preterm birth is the world's leading cause of death before 5 years of age (1). Neonatal sepsis, mostly due to coagulase-negative staphylococci, occurs frequently in neonatal intensive care units, especially in very low birthweight preterm infants (2). Cases and series of neonatal sepsis involving *Staphylococcus capitis* have been reported in different countries (3) and were initially considered unrelated epidemic bursts. More recently, we detected a single multidrug-resistant clone of *S. capitis*, designated as the NRCS-A clone and characterized by a specific pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) pattern, in several neonatal intensive care units (NICUs) in France, Belgium, the United Kingdom, and Australia (4,5). The clonality

of the strains was confirmed by PFGE, multilocus sequence typing–like analysis, and whole-genome sequencing. We also showed that all NRCS-A isolates exhibited a decreased susceptibility to all of the antimicrobial agents frequently used in NICUs, namely  $\beta$ -lactams, aminoglycosides, and vancomycin (5). Furthermore, a recent study showed that *S. capitis* NRCS-A–associated sepsis constitutes an independent risk factor for severe illness in neonates (6).

We suspected that the initial report of NRCS-A dissemination in NICUs from 4 distant countries was only the tip of the iceberg and that the spread of NRCS-A strains was much wider than expected. To determine the extent of NRCS-A dissemination, we asked microbiologic laboratories worldwide to send us methicillin-resistant *S. capitis* strains isolated from blood cultures of neonates. These isolates were identified by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry and subjected to PFGE using the *Sma*I restriction enzyme as previously described (7). NRCS-A's characteristic PFGE pattern was found for 154 strains isolated between 1994 and 2015 in 34 NICUs from 17 countries: Australia, Belgium, Brazil, Canada, Czech Republic, Denmark, Finland, France, Germany, the Netherlands, New Zealand, Norway, South Korea, Switzerland, Taiwan, the United Kingdom, and the United States.

Retrospective, laboratory-based epidemiologic investigations to estimate the prevalence of NRCS-A strains in NICUs could not be performed on the same worldwide scale, so we conducted such a study in France. Results collected from 47 of the 57 NICUs in France during 2014 indicated that only 4 NICUs were free of NRCS-A. In the 43 other NICUs, NRCS-A strains accounted for up to 46% of all cases of positive cultures of blood from neonates (median 13%, interquartile range 10%–20%) and represented 19% of all coagulase-negative staphylococci strains isolated from the blood cultures of neonates.

Taken together, these data unquestionably demonstrate the unusual worldwide endemicity of the multidrug-resistant NRCS-A clone in NICUs. In addition, the epidemiologic data from France highlight the propensity of NRCS-A to invade and settle in most NICUs on a national scale. Once endemic in a NICU, NRCS-A strains expose infected neonates to a risk of therapeutic failure because treatment of neonatal sepsis involving methicillin-resistant coagulase-negative staphylococci is usually based on vancomycin and aminoglycosides, to which NRCS-A isolates are not susceptible (3–5).

A thorough investigation of the determinants of the worldwide spread of NRCS-A is urgently needed to unravel the dissemination routes and reservoirs of this multidrug-resistant clone and to succeed in managing and controlling its diffusion. The risk of vancomycin treatment failure warrants an investigation of alternate antimicrobial stewardship strategies, in particular linezolid, daptomycin, and ceftarolin, to treat NRCS-A–associated neonatal sepsis.



## CORRECTION

[View Article Online](#)  
[View Journal](#)Cite this: DOI: 10.1039/  
d0md90026e**Correction: *Leishmania infantum* isolates exhibit high infectivity and reduced susceptibility to amphotericin B**Paula Faral-Tello,<sup>a</sup> Gonzalo Greif,<sup>a</sup> Dinora Satragno,<sup>b</sup>  
Yester Basmadjian<sup>c</sup> and Carlos Robello<sup>\*ad</sup>

DOI: 10.1039/d0md90026e

[rsc.li/medchem](http://rsc.li/medchem)Correction for '*Leishmania infantum* isolates exhibit high infectivity and reduced susceptibility to amphotericin B' by Paula Faral-Tello et al., *RSC Med. Chem.*, 2020, DOI: 10.1039/d0md00073f.

The authors regret that there were some errors in their manuscript. In section 3, Results and discussion, the second paragraph starting with 'After species typing...' should be replaced by the following text: After species typing with hsp70-RFLP (Fig. S1), growth curves were determined including the reference strain LPC-RPV, and the five isolates. When seeded at  $5 \times 10^6$  parasites per mL, all strains showed equivalent exponential growth until approximately 140 hours of culture ( $1 \times 10^8$  p mL<sup>-1</sup>) when entering the lag phase of growth (Fig. S2). These parameters of exponential growth were used for further IC<sub>50</sub> experiments. Five drugs were tested *in vitro*: nifurtimox, miltefosine, glucantime, AmB and mevinoline. For each drug the IC<sub>50</sub> was determined and the values are shown in Table 2, and the dose response curves in Fig. S2. Behavior in the drug response curves and IC<sub>50</sub> values for nifurtimox, miltefosine and glucantime are very similar, and no significant differences are found among the strains, values are in the range of 6, 4 and 50  $\mu$ M, respectively.

In section 3, Results and discussion, the sixth paragraph starting with 'Our second focus...', should have the following sentence added at the end of the paragraph: All values are summarized in Fig. 1D.

Fig. 2 should be deleted from the manuscript as its content is shown in Fig. 1.

The Royal Society of Chemistry apologises for these errors and any consequent inconvenience to authors and readers.

<sup>a</sup> Laboratorio de Interacciones Hospedero Patógeno, Unidad de Biología Molecular, Institut Pasteur de Montevideo, Matajojo 2020, Montevideo, 11400, Uruguay<sup>b</sup> Centro Hospital Veterinario, Facultad de Veterinaria, Universidad de la República, Uruguay<sup>c</sup> Departamento de Parasitología, Instituto de Higiene, Facultad de Medicina, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay<sup>d</sup> Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay. E-mail: [robello@pasteur.edu.uy](mailto:robello@pasteur.edu.uy)

## RESEARCH ARTICLE

[View Article Online](#)  
[View Journal](#)

Cite this: DOI: 10.1039/d0md00073f

# *Leishmania infantum* isolates exhibit high infectivity and reduced susceptibility to amphotericin B†

Paula Faral-Tello, <sup>a</sup> Gonzalo Greif,<sup>a</sup> Dinora Satragno,<sup>b</sup> Yester Basmadjian<sup>c</sup> and Carlos Robello <sup>\*ad</sup>

Leishmaniasis is a neglected disease caused by a protozoan parasite of the *Leishmania* species in over 98 countries in five continents. Visceral leishmaniasis is one of the main forms of the disease and is mainly caused by *Leishmania infantum*, whose main vector is the dipteran *Lutzomyia longipalpis*. The presence of the vector in Uruguay was recorded for the first time in 2010 and an autochthonous outbreak of canine visceral leishmaniasis occurred in the northern locality of the country in 2015. We report the isolation in blood-free FBS-supplemented defined media of five isolates responsible for the referred outbreak, and characterize them in terms of their growth as promastigotes, infectivity and replication in human derived monocytes and drug resistance. Results indicate similar promastigote growth among the strains, enhanced infectivity and replication for the five strains isolated from the Uruguayan outbreak when compared with reference strains from South America, equivalent drug susceptibility for miltefosine and nifurtimox and a significant difference in IC<sub>50</sub> values for amphotericin B between the Uruguayan strains, 3–4 fold higher than the reference strain.

Received 3rd March 2020,  
Accepted 12th June 2020

DOI: 10.1039/d0md00073f

[rsc.li/medchem](http://rsc.li/medchem)

## 1. Introduction

Leishmaniasis constitutes a group of diseases caused by over 35 different protozoan parasites of the genus *Leishmania* that are transmitted to humans and other wild or domestic animals by the bite of phlebotomine sandflies.<sup>1</sup> The disease is spread worldwide affecting 98 countries in five continents,<sup>2</sup> and is categorized as one of the “most neglected tropical diseases”, strongly associated with poverty, affecting some of the poorest people on earth.<sup>1,3</sup> Its spread is tightly linked to environmental changes such as deforestation, building of dams and urbanization.<sup>1</sup>

There are three main forms of the disease: cutaneous, mucocutaneous and visceral leishmaniasis (VL), the latter being lethal in 95% of untreated cases and is characterized by irregular fever episodes, weight loss, anemia, hepatomegaly and splenomegaly. In the American continent,

VL is caused by *Leishmania infantum*, whose main vector is the dipteran *Lutzomyia longipalpis*.<sup>4</sup> Mammals can get infected and stay infected without presenting symptomatology for long periods of time. During this subclinical forms of the disease, mammals are chronically infected and parasites can be transmitted to other mammals through competent vectors.<sup>5</sup> Infected dogs are the main urban reservoir for zoonotic visceral leishmaniasis mostly due to the high rate of canine infection in endemic areas and intense parasitism in the skin,<sup>6</sup> and are the most significant risk factor predisposing humans to infection.<sup>7</sup>

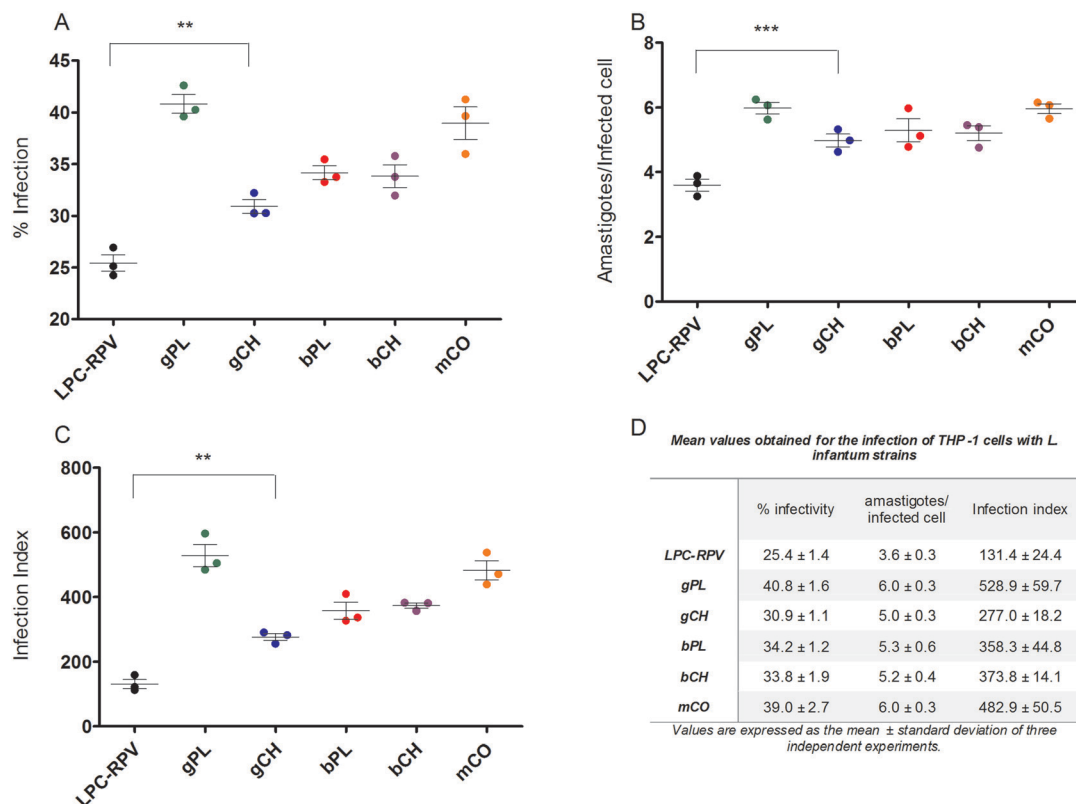
Treatment is only indicated when the disease is confirmed, and treatment options are highly dependent on several factors such as clinical manifestation, coinfections, parasite species and geographical localization.<sup>8</sup> This complexity is given in part because parasite species have different susceptibility to drugs in different geographical areas of the globe. Chemotherapy has proven to be the only

<sup>a</sup> Laboratorio de Interacciones Hospedero Patógeno, Unidad de Biología Molecular, Institut Pasteur de Montevideo, Matajojo 2020, Montevideo, 11400, Uruguay<sup>b</sup> Centro Hospital Veterinario, Facultad de Veterinaria, Universidad de la República, Uruguay<sup>c</sup> Departamento de Parasitología, Instituto de Higiene, Facultad de Medicina, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay<sup>d</sup> Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay. E-mail: [robello@pasteur.edu.uy](mailto:robello@pasteur.edu.uy)

† Electronic supplementary information (ESI) available. See DOI: 10.1039/d0md00073f

**Table 1** *Leishmania infantum* isolate nomenclature

| Dog | Tissue   | Isolate name | Isolate complete name |
|-----|----------|--------------|-----------------------|
| 1   | Ganglion | gPL8         | MCAN_UY_2015_gPL8     |
| 1   | Spleen   | bPL7         | MCAN_UY_2015_bPL7     |
| 2   | Ganglion | gCH2         | MCAN_UY_2015_gCH2     |
| 2   | Spleen   | bCH11        | MCAN_UY_2015_bCH11    |
| 3   | Medulla  | mCO2         | MCAN_UY_2015_mCO8     |



**Fig. 1** Invasion, amastigote replication and infection indexes in THP-1 cells calculated at 48 hours post infection with the LPC-RPV strain and the five Uruguayan isolates. A. Percentage of the infected cells with respect to the total cells. B. Number of parasites per infected cell. C. Infection index. D. Summary table. Statistical differences were determined using the unpaired *t*-test, *p*-value < 0.05.

**Table 2** IC<sub>50</sub> values (μM) determined for the reference strain (LPC-RPV) and the five isolates

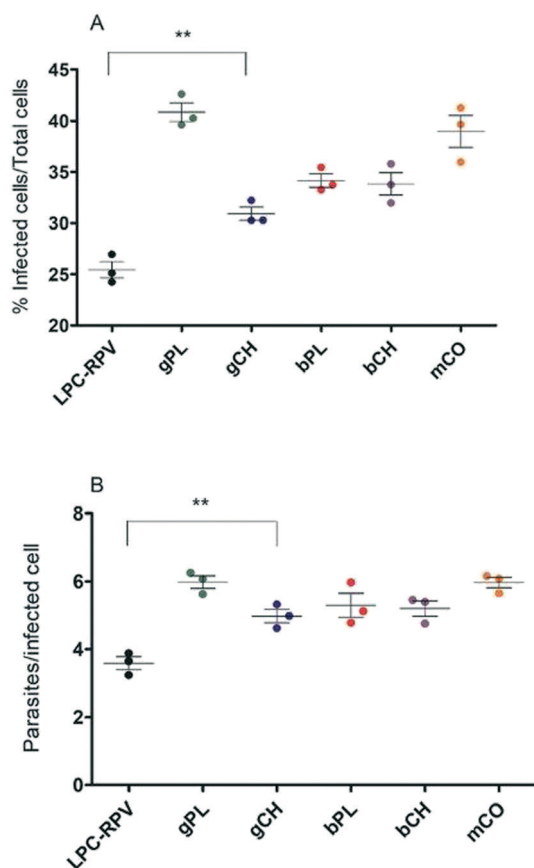
|                | LPC-RPV    | gPL8       | gCH2       | bPL7       | bCH11      | mCO2       |
|----------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|
| Nifurtimox     | 6.3 ± 0.1  | 6.0 ± 0.1  | 6.7 ± 0.2  | 6.5 ± 0.1  | 6.5 ± 0.1  | 6.7 ± 0.2  |
| Miltefosine    | 5.3 ± 0.1  | 4.1 ± 0.1  | 4.1 ± 0.1  | 3.6 ± 0.1  | 3.8 ± 0.1  | 3.4 ± 0.1  |
| Glucantime     | 50.1 ± 0.1 | 50.1 ± 0.1 | 50.2 ± 0.1 | 50.4 ± 0.1 | 50.5 ± 0.1 | 51.0 ± 0.2 |
| Amphotericin B | 6.5 ± 0.1  | 24.4 ± 0.1 | 24.8 ± 0.9 | 24.9 ± 0.1 | 24.6 ± 0.1 | 12.7 ± 0.1 |
| Mevinolin      | 12.9 ± 0.2 | 25.4 ± 0.3 | 25.3 ± 0.2 | 25.3 ± 0.2 | 25.3 ± 0.2 | 25.4 ± 0.2 |

Values are expressed as the mean ± standard deviation of three independent experiments.

effective way of controlling infections and treatment often comprises antimony-containing drugs, such as sodium stibogluconate. Amphotericin B (AmB) is used when resistance to antimonials or pharmacological toxicity emerge, and also when antimonials are contraindicated for clinical conditions of the patient such as coinfections and parasite reactivation.<sup>8,9</sup> AmB has a better clinical efficacy and is better tolerated, but its high cost sometimes limits its availability.<sup>10</sup>

The presence of the vector *L. longipalpis* was recorded for the first time in 2010 in northern Uruguay, on the border with Argentina.<sup>11</sup> In 2015, the first cases of canine leishmaniasis caused by *L. infantum* were reported in the same region, which constituted the southernmost case of the disease.<sup>12</sup> In 2017, the first human case of VL was diagnosed in our country,<sup>13</sup> and few months later a new case was

reported which ended with the patient's death because of comorbidity causes.<sup>14</sup> In the 2015 outbreak, our group detected the presence of *L. infantum* DNA in dog samples and in sandflies captured in the area, demonstrating the presence of an autochthonous transmission cycle.<sup>12</sup> Although new molecular methods for diagnosis tend to become independent of isolation, the culture of *Leishmania* spp. still remains essential for research and characterization purposes, antigen production for adequate diagnosis, and determination of biological characteristics and sensitivity to antiparasitic drugs. In the present work we describe the isolation in blood-free defined medium of five strains of *Leishmania infantum* that were responsible for the 2015 outbreak in Uruguay, and the characterization in terms of their growth, infectivity in human monocytes and drug susceptibility patterns.



**Fig. 2** Invasion and infection percentages in THP-1 cells at 48 hours post infection of the LPC-RPV strain and the isolates. A. Percentage of the infected cells with respect to the total cells. B. Number of parasites per infected cell. Statistical differences were determined using the unpaired t-test (\*\**p*-value < 0.05).

## 2. Material and methods

### 2.1. Parasites and cells

The *L. (L.) infantum* strain (MHOM/BR/2002/LPC-RPV) and *L. (L.) donovani* strain (MHOM/ET/1967/HU3) used as references were purchased from the *Leishmania* Collection of the Oswaldo Cruz Foundation (CLIOC) and gradually adapted to the RPMI medium described in the next section. All parasites were grown under axenic conditions at 28 °C. THP-1 monocytes (ATCC® TIB-202™) were cultured as recommended in RPMI-1640 (Cat No. 30-2001 Thermo Fisher Scientific, USA) supplemented to a final concentration of 0.05 mM β-mercaptoethanol and 10% fetal bovine serum (FBS, Gibco, USA).

### 2.2. Parasite isolation and culture

Samples were taken from symptomatic seropositive dogs, through bone marrow or lymph node aspiration, and spleen biopsies, which were aseptically collected and stored in cold PBS + penicillin/streptomycin until processing in the lab.

Samples were minced by scraping and cutting in a Petri-dish and then filtered through a 100 μm nitrocellulose filter. The cell suspension was seeded into a multiwell plate

containing RPMI medium supplemented with 0.7% glucose, 0.1% ornitin, 0.4% fructose, 0.6% malate, 0.05% fumarate and 0.06% succinate, 20% FBS and vitamins and amino acid solution (Gibco, USA). Briefly, all solids (for 1 L) including RPMI were dissolved in 600 mL of distilled water and afterwards amino acid and vitamin solutions were added, pH was adjusted to 7.2 with NaOH. Finally, water is added to 800 ml final volume, sterilized by filtration with a 0.22 μm pore filter and stored at 4 °C until use. Aspirates were inoculated directly into the RPMI medium described above supplemented with FBS 20% v/v.

Plates were monitored every day and when promastigotes were observed, they were cryopreserved and stored in liquid nitrogen as passage 0 (P0) and passed to an F25 cm<sup>2</sup> flask into a 1:5 dilution of the same medium, when a stable culture was established, isolates were cryopreserved and considered P1. Experiments were made with parasites from P0 or P1 and never exceeded P5.

### 2.3. DNA extraction, amplification and species typing

DNA extraction from promastigotes in the log phase of growth was performed with a Quick-DNA Universal kit (Zymo Research, California, USA). PCR and restriction of the hsp70 fragment were performed as described previously in order to confirm the species level.<sup>15</sup>

### 2.4. Growth curve and IC<sub>50</sub> determination

For the construction of growth curves, parasites were seeded at 1 × 10<sup>6</sup> cells per mL and at each time point counted at least 5 times. For IC<sub>50</sub> experiments parasites were seeded at 3 × 10<sup>6</sup> cells per mL and incubated with serial dilutions of compounds starting from: 100 μM AmB, 50 μM nifurtimox, 25 μM miltefosine and 200 μM for mevinolin. Control conditions of parasites without drug (100% growth) and medium without parasites were included. After 72 h at 28 °C parasite viability was determined by the resazurin method as described by Rolón *et al.*<sup>16</sup> Results are expressed as the mean of three different and independent experiments.

### 2.5. Macrophage infectivity

THP-1 monocytes (ATCC®TIB-202™) were grown following ATCC recommendations and seeded at 30 000 cells per well onto 18 mm round glass coverslips in 12 wells. For stimulation, the cells were incubated with 100 nM PMA for 48 h, PMA was washed and the cells left in growth media for 24 hours more after incubation with parasites. 30 000 parasites per well were added and left to interact. After 48 hours, coverslips were washed with PBS, fixed with 95% (v/v) ethanol and stained with Fluoroshield™ with DAPI (sigma). Infectivity was assessed considering invasion and replication capacity counting infected cells and parasites per infected cell, respectively, using fluorescence microscopy. For each replicate, at least 500 macrophages were counted in total. The infection index was calculated as:

$$\text{Infection index} = \frac{\text{number of amastigotes} \times \text{number of infected macrophages}}{\text{number of total macrophages}}$$

Results are expressed in graphs as the mean of three different and independent experiments.

## 2.6. Statistical analysis

The statistical analysis of promastigote and amastigote results was performed using the unpaired *t*-test in Graph Pad Prism software. The level of significance of tests (*p*-value) was set as 0.05.

## 3. Results and discussion

From biological samples obtained from positive dogs of the canine leishmaniasis outbreak of 2015,<sup>12</sup> we were able to obtain five different isolates from three different dogs (Table 1).

After species typing with hsp70-RFLP (ESI†), growth curves were determined including the reference strain LPC-RPV, and the five isolates. When seeded at  $5 \times 10^6$  parasites per mL, all strains showed equivalent exponential growth until approximately 140 hours of culture ( $1 \times 10^8$  cells per mL<sup>-1</sup>) when they entered the lag phase of growth (Fig. 1A). These parameters of exponential growth were used for further IC<sub>50</sub> experiments. Five drugs were tested *in vitro*: nifurtimox (1B), miltefosine (1C), glucantime (1D), AmB (1E) and mevinolin (1F). For each drug the IC<sub>50</sub> was determined and the values are shown in Table 2. Behavior in the drug response curves and IC<sub>50</sub> values for nifurtimox, miltefosine and glucantime are very similar, and no significant differences are found among the strains, the values are in the range of 6, 4 and 50 μM, respectively (Fig. 2).

On the other hand, when drugs such as AmB and mevinolin (Lovastatin) targeting the ergosterol pathway were used, significant differences among the values obtained for the reference strain and the isolates were observed. AmB increases membrane permeability by inducing pore formation in ergosterol-containing membranes, and mevinolin directly acts as an inhibitor of HMG-CoA reductase, a key enzyme of the sterol synthesis pathway. Results confirm that the isolates are less susceptible to these drugs than the reference strain: for AmB an IC<sub>50</sub> value of 6.5 μM is found, and for the isolates at least twice this value is needed to kill 50% of parasites, 12.7 μM for the mCO2 isolate and more than four times for the rest of the isolates (24 μM values). For mevinolin, something similar happens but the isolates are much more alike, the IC<sub>50</sub> of the isolates is around 25 μM, and for the reference strain 12 μM. The results obtained for AmB and mevinolin, both drugs targeting the ergosterol metabolism, suggest that a slight difference among these pathways may exist among the Uruguayan isolates and the reference strain; further experiments including the effect of these drugs in amastigote

replication are needed in order to evaluate if this *in vitro* differential susceptibility is translated *in vivo* and to go deeper into the cause.

Differential susceptibility and drug resistance in *Leishmania* isolates are frequent and explanations align behind increased expression of enzymes involved in the tripanothion pathway, antioxidant defense, ABC transporters<sup>17,18</sup> and loss of expression sterol biosynthesis related enzymes.<sup>19</sup> Nifurtimox is a nitroheterocyclic drug used for the treatment of Chagas disease, but there are also reports of *Leishmania* promastigotes being susceptible<sup>20</sup> and identification of nitroreductases capable of activating the prodrug has been made.<sup>21,22</sup> Although the mode of action of nifurtimox is pleiotropic, oxidative stress is involved, as suggested by the observation that parasites lacking iron-dependent superoxide dismutase *SodB2* expression are more sensitive to the drug.<sup>23</sup> The results obtained for nifurtimox against the Uruguayan isolates and the reference strain do not let us infer differential expression of detoxification enzymes among them.

Current treatment protocols for canine leishmaniasis include meglumine antimoniate, miltefosine and allopurinol,<sup>24</sup> and the WHO specifically discourages canine use of AmB to avoid the occurrence of resistant leishmanial strains affecting humans. On the other hand, there are reports of experimental success of AmB in canine leishmaniasis.<sup>25,26</sup> Since VL has been expanding its geographical distribution into previously free areas, from northeastern Argentina, Misiones, Corrientes and Entre Ríos,<sup>27,28</sup> it is not unlikely that the strains responsible for the first Uruguayan outbreak come from treated dogs, ignoring the recommendations of health authorities.

Our second focus was to test the infectivity and replication capability of the isolates in human derived cells. For this, we incubated human derived monocytes THP-1 with the isolates and reference strains. In order to compare invasion, replication and the infective capacity we obtained two parameters from infections, the % of infected cells (Fig. 1A) and parasites per infected cell (Fig. 1B). We also calculated the infection index (Fig. 1C) and significant differences were observed. The Uruguayan isolates showed increased invasion and replication capability when compared to the reference strain. Regarding the percentage of infection we observed heterogeneity in invasion since for the gPL8 isolate we observed 40% of cells infected against 25% for LPC-RPV, 30% for gCH2, 33% for bPL7 and bCH11 and 34% for mCO2. For replication inside the macrophages, we observed 3.6 amastigotes per infected cell for LPC-RV and 5.5 as the mean of the rest of the isolates. This is a slight difference between replication of the strains but still represents a statistically significant difference. Both parameters are summarised in



the infectivity index where the mean value of the isolates is around 400, almost three times lower than the reference strain (131).

Altogether, our results describe an isolation method in blood-free media of circulating *Leishmania infantum* from different organ sources. We characterized the isolated strains in terms of their growth under axenic conditions, drug susceptibility and human macrophages infectivity and replication. Highlights in terms of results are: the differential susceptibility to drugs that affect sterol biosynthesis to which Uruguayan isolates show differential resistance, and even though the molecular causes behind this phenotype should be explored, we cannot rule out AmB treatment at some point of the geographical expansion of the disease that may have contributed to the resistant phenotype.

## Conflicts of interest

The authors declare no conflict of interest.

## Acknowledgements

This work was supported by Comisión Sectorial de Investigación Científica (CSIC, Universidad de la República), Agencia Nacional de Investigación e Innovación Grant DCI-ALA/2011/023-502, “Contrato de apoyo a las políticas de innovación y cohesión territorial”; MRC-Global Challenges Research Fund-Neglected Tropical Diseases (Grant number: MR/P027989/1A) and Fondo para la Convergencia Estructural del Mercado Común del Sur (FOCEM) 03/11. Paula Faral-Tello is a doctoral student at the PEDECIBA program and was an ANII fellow (POS\_NAC\_2014\_1\_102555), and now Faral-Tello is a CAP (Comisión Académica de Posgrado, Universidad de la República) fellow. Paula Faral-Tello, Gonzalo Greif and Carlos Robello are researchers of Sistema Nacional de Investigadores (ANII). We thank Dr. Guzmán Alvarez for supplying the drugs used for the IC<sub>50</sub> experiments.

## References

- WHO, Leishmaniasis. Fact sheet, March 2019, Geneva: World Health Organization, 2019 [cited 2019 November 5], Available from: <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/leishmaniasis>.
- J. Alvar, *et al.*, Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence, *PLoS One*, 2012, 7(5), e35671.
- J. Alvar, S. Yactayo and C. Bern, Leishmaniasis and poverty, *Trends Parasitol.*, 2006, 22(12), 552–557.
- T. R. Abrantes, *et al.*, Identification of Canine Visceral Leishmaniasis in a Previously Unaffected Area by Conventional Diagnostic Techniques and Cell-Block Fixation, *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo*, 2016, 58, 3.
- Food security and Public Health, I.S.U., Leishmaniasis (cutánea y visceral), 2010.
- M. F. Madeira, *et al.*, Parasitological diagnosis of canine visceral leishmaniasis: is intact skin a good target?, *Res. Vet. Sci.*, 2009, 87(2), 260–262.
- A. S. Gavvani, *et al.*, Effect of insecticide-impregnated dog collars on incidence of zoonotic visceral leishmaniasis in Iranian children: a matched-cluster randomised trial, *Lancet*, 2002, 360(9330), 374–379.
- OMS, Control de las leishmaniasis: informe de una reunión del Comité de Expertos, 2010.
- OMS, Fact Sheet: Leishmaniasis, 2019.
- R. Durand, *et al.*, Leishmania infantum: lack of parasite resistance to amphotericin B in a clinically resistant visceral leishmaniasis, *Antimicrob. Agents Chemother.*, 1998, 42(8), 2141–2143.
- O. D. Salomon, *et al.*, Lutzomyia longipalpis in Uruguay: the first report and the potential of visceral leishmaniasis transmission, *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 2011, 106(3), 381–382.
- D. Satragno, *et al.*, Autochthonous Outbreak and Expansion of Canine Visceral Leishmaniasis, Uruguay, *Emerging Infect. Dis.*, 2017, 23(3), 536–538.
- MSP, Notificación leishmania primer caso autóctono, 2018, Available from: <https://www.gub.uy/ministerio-salud-publica/comunicacion/noticias/uruguay-registra-primer-caso-de-leishmaniasis-en-humanos-en-un-continente>.
- MSP, Notificación primer muerte por Leishmania infantum, 2019 [cited 2019 October 30], Available from: <https://www.gub.uy/ministerio-salud-publica/comunicacion/comunicados/confirmacion-de-segundo-caso-de-leishmaniasis-visceral>.
- A. M. Montalvo, *et al.*, Three new sensitive and specific heat-shock protein 70 PCRs for global Leishmania species identification, *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.*, 2012, 31(7), 1453–1461.
- M. Rolon, *et al.*, Development of resazurin microtiter assay for drug sensibility testing of Trypanosoma cruzi epimastigotes, *Parasitol. Res.*, 2006, 99(2), 103–107.
- V. Gomez Perez, *et al.*, Decreased antimony uptake and overexpression of genes of thiol metabolism are associated with drug resistance in a canine isolate of Leishmania infantum, *Int. J. Parasitol.: Drugs Drug Resist.*, 2016, 6(2), 133–139.
- B. Purkait, *et al.*, Mechanism of amphotericin B resistance in clinical isolates of Leishmania donovani, *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2012, 56(2), 1031–1041.
- A. W. Pountain, *et al.*, Genomic instability at the locus of sterol C24-methyltransferase promotes amphotericin B resistance in Leishmania parasites, *PLoS Neglected Trop. Dis.*, 2019, 13(2), e0007052.
- M. Kaiser, *et al.*, Antiprotozoal Activity Profiling of Approved Drugs: A Starting Point toward Drug Repositioning, *PLoS One*, 2015, 10(8), e0135556.
- S. Wyllie, *et al.*, Activation of Bicyclic Nitro-drugs by a Novel Nitroreductase (NTR2) in Leishmania, *PLoS Pathog.*, 2016, 12(11), e1005971.
- A. A. Voak, *et al.*, An essential type I nitroreductase from Leishmania major can be used to activate leishmanicidal prodrugs, *J. Biol. Chem.*, 2013, 288(40), 28466–28476.

- 23 S. R. Prathalingham, *et al.*, Deletion of the *Trypanosoma brucei* superoxide dismutase gene *sodb1* increases sensitivity to nifurtimox and benznidazole, *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2007, **51**(2), 755–758.
- 24 L. Solano-Gallego, *et al.*, LeishVet guidelines for the practical management of canine leishmaniosis, *Parasites Vectors*, 2011, **4**, 86.
- 25 O. Cortadellas, Initial and long-term efficacy of a lipid emulsion of amphotericin B desoxycholate in the management of canine leishmaniasis, *J. Vet. Intern. Med.*, 2003, **17**(6), 808–812.
- 26 J. Lamothe, Activity of amphotericin B in lipid emulsion in the initial treatment of canine leishmaniasis, *J. Small Anim. Pract.*, 2001, **42**(4), 170–175.
- 27 O. Salomon, *et al.*, First visceral leishmaniasis focus in Argentina, *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 2008, **103**(1), 109–111.
- 28 O. D. Salomon, *et al.*, [Distribution of vectors of visceral leishmaniasis in the Province of Corrientes, 2008], *Medicina*, 2009, **69**(6), 625–630.



# Trypanosoma cruzi Isolates Naturally Adapted to Congenital Transmission Display a Unique Strategy of Transplacental Passage

Paula Faral-Tello,<sup>a,\*</sup> Gonzalo Greif,<sup>a</sup> Selva Romero,<sup>b</sup> Andrés Cabrera,<sup>a,b,c</sup> Cristina Oviedo,<sup>b</sup> Telma González,<sup>b</sup> Gabriela Libisch,<sup>a</sup> Ana Paula Arévalo,<sup>d</sup> Belén Varela,<sup>e</sup> José Manuel Verdes,<sup>e</sup> Martina Crispo,<sup>d</sup> Yester Basmadjian,<sup>b</sup> Carlos Robello<sup>a,f</sup>

<sup>a</sup>Laboratorio de Interacciones Hospedero Patógeno/UBM, Institut Pasteur de Montevideo, Montevideo, Uruguay

<sup>b</sup>Departamento de Parasitología y Micología, Facultad de Medicina, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay

<sup>c</sup>Unidad de Microbiología, Instituto de Patobiología, Facultad de Veterinaria, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay

<sup>d</sup>Laboratory Animal Biotechnology Unit, Institut Pasteur de Montevideo, Montevideo, Uruguay

<sup>e</sup>Unidad de Patología, Departamento de Patobiología, Facultad de Veterinaria, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay

<sup>f</sup>Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay

**ABSTRACT** Chagas disease is mainly transmitted by vertical transmission (VT) in nonendemic areas and in endemic areas where vector control programs have been successful. For the present study, we isolated natural *Trypanosoma cruzi* strains vertically transmitted through three generations and proceeded to study their molecular mechanism of VT using mice. No parasitemia was detected in immunocompetent mice, but the parasites were able to induce an immune response and colonize different organs. VT experiments revealed that infection with different strains did not affect mating, pregnancy, or resorption, but despite low parasitemia, VT strains reached the placenta and resulted in higher vertical transmission rates than strains of either moderate or high virulence. While the virulent strain modulated more than 2,500 placental genes, VT strains modulated 150, and only 29 genes are shared between them. VT strains downregulated genes associated with cell division and replication and upregulated immunomodulatory genes, leading to anti-inflammatory responses and tolerance. The virulent strain stimulated a strong proinflammatory immune response, and this molecular footprint correlated with histopathological analyses. We describe a unique placental response regarding the passage of *T. cruzi* VT isolates across the maternal-fetal interphase, challenging the current knowledge derived mainly from studies of laboratory-adapted or highly virulent strains.

**IMPORTANCE** The main findings of this study are that we determined that there are *Trypanosoma cruzi* strains adapted to transplacental transmission and completely different from the commonly used laboratory reference strains. This implies a specific strategy for the vertical transmission of Chagas disease. It is impressive that the strains specialized for vertical transmission modify the gene expression of the placenta in a totally different way than the reference strains. In addition, we describe isolates of *T. cruzi* that cannot be transmitted transplacentally. Taken together, these results open up new insights into the molecular mechanisms of this insect vector-independent transmission form.

**KEYWORDS** Chagas disease, *Trypanosoma cruzi*, transcriptomics, transplacental, placental tropism, vertical transmission

The acronym TORCH (toxoplasmosis, rubella, cytomegalovirus, and herpes simplex virus) refers to those pathogens that are transmitted in the human species from mother to offspring through transplacental passage. The acronym is more exclusive than inclusive, leaving out an expanding list of pathogens that are vertically transmitted and represent severe human health problems. In recent years, the relevance of this

**Editor** Denis Sereno, Institut de Recherche pour le Développement

**Ad Hoc Peer Reviewer** Ulrike Kemmerling, University of Chile, Faculty of Medicine

**Copyright** © 2023 Faral-Tello et al. This is an open-access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution 4.0 International license](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

Address correspondence to Carlos Robello, [robello@pasteur.edu.uy](mailto:robello@pasteur.edu.uy).

\*Present address: Paula Faral-Tello, Laboratory of Apicomplexan Biology, Institut Pasteur de Montevideo, Montevideo, Uruguay.

The authors declare no conflict of interest.

**Received** 13 July 2022

**Accepted** 12 January 2023

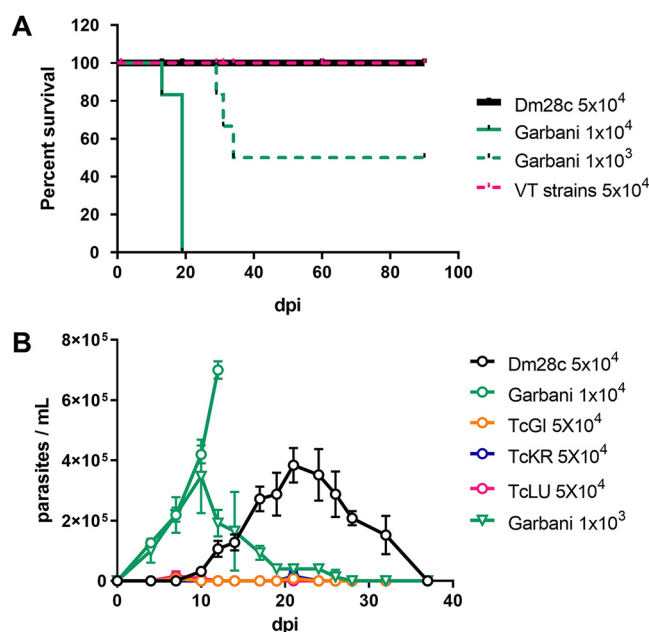


transmission mechanism has become clear, and Chagas disease (CD) is a paradigmatic case. In the absence of the vector, *Trypanosoma cruzi* can still be transmitted through blood transfusions, organ transplants, or congenitally. Hence, the migration of asymptomatic individuals from endemic to nonendemic areas due to poverty conditions in the context of globalization has led to its current consideration as a reemerging disease (1). Unlike vectorial transmission, all other forms of transmission are possible in any country (2). The World Health Organization estimates that at least one-quarter of the total burden of newly reported cases corresponds to congenital Chagas disease (CCD) (3), which includes endemic areas with successful vectorial control programs and nonendemic areas where vertical transmission (VT) is the only active route of transmission. Although CD is considered a vector-borne disease, these events have radically changed its epidemiological profile, turning it into a global urban disease and a worldwide health problem (4, 5). The rates of *T. cruzi* vertical transmission range from 1% to 12%, depending on the area (6), with an average rate of 5% (7). CCD often presents as an acute infection, and although 60% of infected babies are born asymptomatic, they usually exhibit detectable levels of parasitemia and display higher frequencies of low weight, prematurity and lower APGAR scores (aspect, pulse, grimace, activity, and respiration) than noninfected babies (8–10). Although rarely lethal, untreated CCD can lead to hepatosplenomegaly, meningoencephalitis, and myocarditis (11); however, when detected and treated early, parasitic clearance is more than 90% effective (12, 13). One important aspect of CCD is that most infected pregnant women are diagnosed for CD during routine control screenings, because they are usually asymptomatic (7). This observation led us to the hypothesis that there could be natural strains adapted to vertical transmission, capable of persisting in a “silent” state in the host and able to cross the placental barrier during pregnancy. In addition, these microorganisms would constitute a successful case of parasitism and are not accurately modeled by highly virulent and laboratory-adapted strains. To test the hypothesis, we identified familial cases of congenital Chagas disease in which *T. cruzi* strains have asymptomatically passed through generations: from great-grandmothers, to grandmothers, and then to mothers and their children. By xenodiagnoses of babies born to positive mothers, we isolated several strains, and then we investigated them in terms of virulence and tissue tropism, as well as through the development of a vertical-transmission murine model coupled to the transcriptomic placental response.

## RESULTS

**Molecular typing of isolates.** Xenodiagnostic tests were performed on three newborns whose mothers and grandmothers were seropositive for CD, and after 15 to 25 days, parasites were observed in insect feces. Insect intestinal homogenates were inoculated into BALB/cJ mice, and parasites were detected in blood samples after 30 to 45 days, although in all cases, they were observed after counts of at least 100 microscopic fields. Parasitemia peaks were obtained only after immunosuppression, and three isolates were obtained and named TcLu (case 1), TcKr (case 2), and TcGi (case 3). Thereafter, due to their very low virulence in immunocompetent mice, all of the isolates were maintained by passages in Nu/J mice, which do not control the infection. Molecular typing indicated that TcGi, TcKr, and TcLu belonged to the discrete typing unit (DTU) TcV or BCB lineage (Fig. S1 in the supplemental material) (14).

**Murine infection assays indicate that VT isolates reproduce their clinical features in the murine model.** To compare the infection course and virulence of the different strains, Kaplan-Meier and parasitemia curves with different parasite loads were performed on BALB/cJ mice. As shown in the survival curves (Fig. 1A), 100% survival was observed both for mice infected with strain Dm28c (DTU TcI strain with moderate virulence [MV]) and for mice infected with the VT strains when  $5 \times 10^4$  trypomastigotes were inoculated. On the other hand, when inoculated with  $1 \times 10^4$  parasites of the Garbani strain (DTU TcVI strain with high virulence [HV]), 100% of the mouse population reached the endpoint by approximately day 19 postinfection (p.i.), and with an inoculum of  $1 \times 10^3$  trypomastigotes, 50% of the mice reached the endpoint by day 29. As shown in Fig. 1B, an initial inoculum of  $5 \times 10^4$  parasites of the Dm28c strain

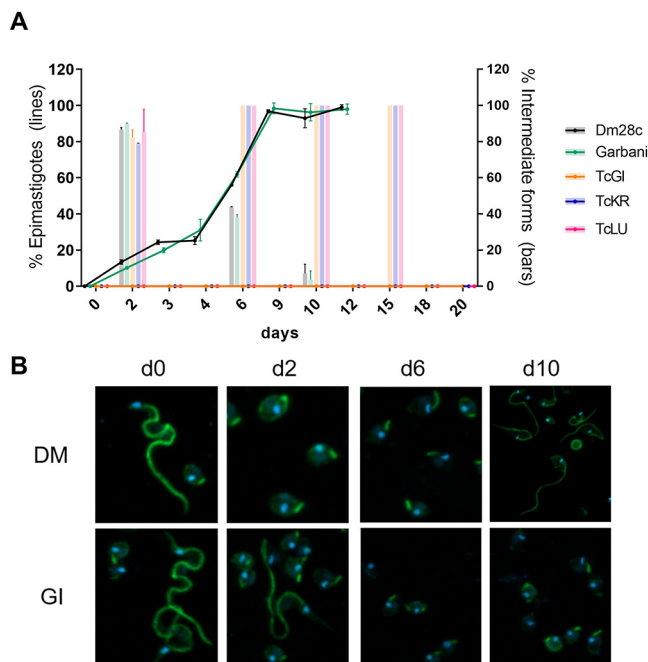


**FIG 1** (A) Survival curves of mice infected with Dm28c (MV), Garbani (HV), and VT strains with the indicated initial inoculums. (B) Parasitemia along the course of infection of the different strains with the indicated inoculums. Error bars show standard errors.

generated a peak of parasitemia of  $4 \times 10^5$  parasites per mL at day 20 p.i., and by the 36th day, no parasites were observed. Initial inoculums of  $1 \times 10^4$  of the Garbani strain exhibited a peak of parasitemia of  $7 \times 10^5$  parasites/mL on day 12 p.i., from which the animals did not recover (Fig. 1B). When the Garbani inoculum was reduced to  $1 \times 10^3$ , 50% of the surviving mice showed a parasitemia curve with a peak of  $4 \times 10^5$  parasites per mL on day 10 p.i., and parasite clearance from blood was observed on day 28. However, for the VT strains, parasitemia was almost undetectable (Fig. 1B) when  $5 \times 10^4$  parasites were inoculated. These results led us to the conclusion that the VT strains present low virulence and a silent phenotype in mice, whereas the Garbani and Dm28c clones exhibit high and moderate virulence, respectively, which is why they were used for comparative studies throughout this work.

**Blood trypomastigotes of congenital Chagas isolates are unable to perform epimastigogenesis *in vitro*.** Epimastigogenesis capacity was evaluated according to Kessler et al. (15). After stress, a day-to-day follow-up was conducted to count epimastigotes and intermediate forms according to flagellar form, length, and nucleus/kinetoplast position. As shown by the results in Fig. 2A and B, at the start of the experiment, mostly trypomastigotes were observed and no intermediate forms were counted. By the 6th day, approximately 60% of the populations of the Dm28c and Garbani strains corresponded to epimastigote forms and 40% to intermediate forms, while the total populations of parasites from VT isolates (TcGi, TcKr, and TcLu) corresponded to intermediate forms. Finally, stable 100%-replicating epimastigote populations were observed for the Dm28c and Garbani strains on the 10th day of incubation, but a different scenario of arrested intermediate forms was observed for the VT strains (Fig. 2A and B, TcGi, days 2, 6, and 10). It is important to mention that differentiated Dm28c and Garbani epimastigotes were able to replicate and maintain a stable replicating population, whereas the cultures of VT strains (intermediate forms exclusively) were not able to replicate and died around the 20th day. Attempts to maintain them in culture by changing the medium and adding supplements failed to induce replication or rescue the parasite population.

**VT isolates can colonize different organs and induce a systemic immune response similar to high and moderate virulence strains.** At day 30 p.i., parasite DNA was detected in all organs regardless of the strain, and no statistically significant differences were found (Fig. 3A). In gut tissues, similar loads were observed for all the strains, but

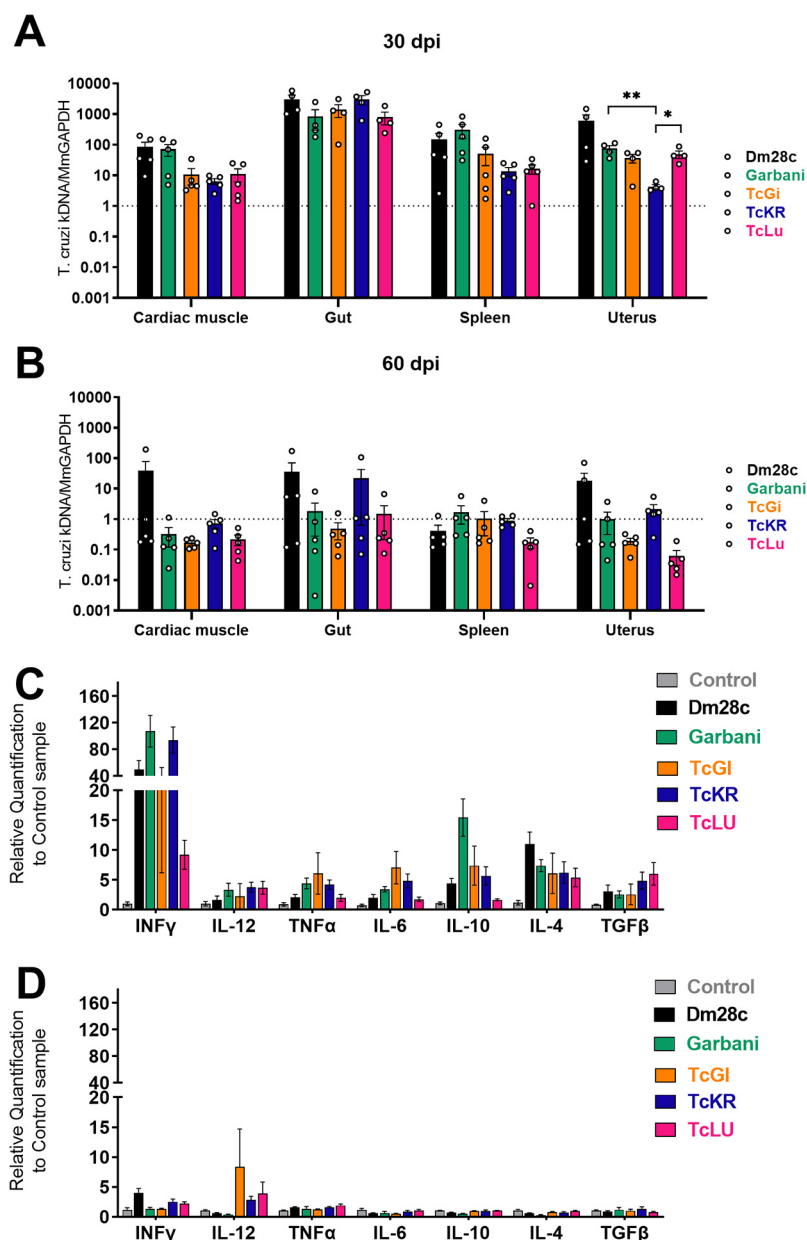


**FIG 2** (A) Proportions of epimastigotes (lines) and intermediate forms (bars) out of total population of trypomastigotes during the epimastigogenesis experiment that lasted 20 days. Error bars show standard errors. (B) Immunofluorescence analysis of the epimastigogenesis process of two strains, Dm28c and the VT strain TcGi, which did not differentiate over time.

with higher values than those recorded for the rest of the tissues, suggesting that all the strains used in this particular model shared a preferential tropism. As expected, when we observed mean values, parasite loads diminished almost to the noninfected-control level in all tissues and for all strains after day 60 p.i. (Fig. 3B, dotted line at a value of 1). Dm28c-infected organs like the cardiac muscle, gut, and uterus showed positive mean values, but differences from the results for the other strains were not significant. Notably, the parasite load of the TcKr strain in the uterus did not change within 30 or 60 days p.i.

The splenic response at day 30 p.i. measured by mRNA expression showed strong upregulation of different cytokines (gamma interferon [IFN- $\gamma$ ], interleukin-12 [IL-12], tumor necrosis factor alpha [TNF- $\alpha$ ], IL-6, IL-10, IL-4, and transforming growth factor- $\beta$  [TGF- $\beta$ ]) induced by infection with all parasite strains, as shown by the results in Fig. 3C. All the cytokines evaluated were overexpressed in infected mice compared to their expression in uninfected control animals (Fig. 3C, gray bars). It is noteworthy that the expression levels of each cytokine were comparable among all the strains, regardless of the differences in virulence described above. Garbani showed higher levels of expression for most genes than Dm28c, except for the anti-inflammatory cytokine IL-4. A strong and more likely proinflammatory response was observed for the TcGi and TcLU strains, whereas TcKr induced lower levels of expression, except for TGF- $\beta$ . These results indicate that despite their low virulence, the VT strains reached the different organs and induced an immune response similar to that of the high and moderate virulence strains. At 60 days p.i. (Fig. 3D), cytokine expression in infected groups fell to control levels, compatible with an ending of the acute phase, with the exception of the IL-12, which remained significantly upregulated in mice infected with the VT strains compared to the control group, suggesting a long-lasting protective response.

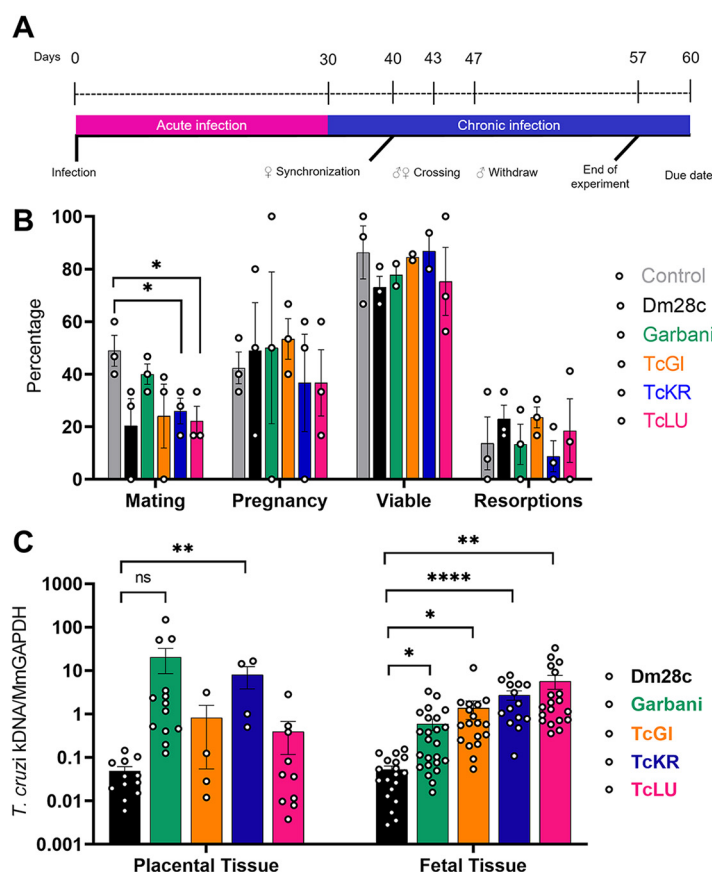
**Infections with the different strains do not significantly affect reproductive variables.** To address whether mating, pregnancy, and resorption rates were altered with infection and whether the strains were vertically transmitted to the offspring, a vertical transmission model was optimized (Fig. 4A). As shown by the results in Fig. 4B,



**FIG 3** (A, B) Parasite loads in different tissues of mice infected with the different strains of *Trypanosoma cruzi* at 30 dpi (A) and 60 dpi (B). Mm, *Mus musculus*. (C, D) Levels of expression of cytokines in splenic cells at 30 dpi (C) and 60 dpi (D). Error bars show standard errors. \*,  $P < 0.05$ ; \*\*,  $P < 0.01$ .

mating rates decreased with infection; while the mating rate of the control group was around 50%, infected groups had significantly lower rates, 40% for the group infected with the Garbani strain and 20% for those infected with Dm28c, TcGi, TcKr, and TcLu. Regarding pregnancy rates and resorption rates (measurement of implantation fate), no significant differences were observed for any of the groups compared to the control group. Altogether, these results indicate that under our conditions, neither infection nor the strain had a negative impact on fertility or fetus viability.

**VT strains are more efficient than reference strains in transplacental transmission.** After delivery, fetal, placental, uterine, and resorption tissues were processed to detect parasite DNA. For each sample, an equivalent amount of tissue from noninfected mice was processed to set up a negativity threshold, which was set at a value of 1 (Fig. 4C). A great heterogeneity was found among parasite loads in placental and fetal tissues, as shown by the results in Fig. 4C. In the groups infected with the VT

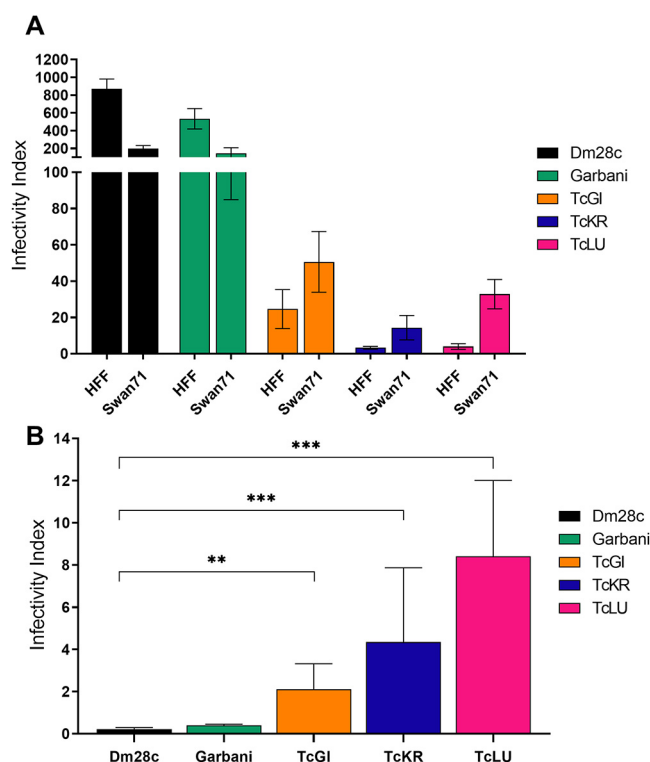


**FIG 4** (A) Vertical transmission experiment scheme. (B) Rates of mating, pregnancy, viable fetuses, and resorptions obtained from the vertical transmission experiment for the different experimental groups. (C) Parasite loads determined in placental and fetal tissue samples for the different experimental groups. Error bars show standard errors. \*,  $P < 0.05$ ; \*\*,  $P < 0.01$ ; \*\*\*\*,  $P < 0.0001$ ; ns, not significant.

strains, no parasite loads were found in the uterine tissue or the placenta (except for TcKr), and remarkably, all the groups infected with the VT strains showed significantly higher parasite loads in the fetal tissues, indicating that, regardless of low virulence and parasite absence in the placenta, parasites were able to pass through the organ into the fetus more efficiently than the other (more-virulent) strains, probably indicating transplacental passage early in gestation.

**VT strains are more infective in human trophoblast-derived cells than in fibroblasts.** After 2 h of incubation, all the strains were able to infect *in vitro* both human fibroblast and trophoblast cell lines. When using laboratory reference strains, the human foreskin fibroblast (HFF) line was more susceptible to infection by *T. cruzi* than the Swan 71 trophoblast cells, whereas the VT strains showed low infectivity in both cell lines; however, all of them infected Swan cells more efficiently (Fig. 5A). This could be better visualized by determining the Swan/HFF infection indexes: while the VT strains showed relative values of 4 and 10, the values for the Garbani and Dm28c strains showed an inverted tendency, with values below 1 (Fig. 5B).

**VT isolates induce a unique pattern of placental gene expression.** The effects of the different strains of *T. cruzi* on placentas were studied at the gene expression level by high throughput RNA sequencing. Taking into account the high variability of *in vivo* experiments, we carried out a principal component analysis (PCA), wherein three groups were clearly identified (Fig. 6A): (i) the Garbani strain, (ii) the Dm28c strain and noninfected mice, and (iii) VT isolates, with the strains corresponding to high, moderate, and low virulence, respectively. Their correlation in the hierarchical clustering of the differentially expressed genes (DEG) is shown in Fig. 6C. When a cutoff of  $-1.5 \geq \text{Log}_2\text{FC} \geq 1.5$

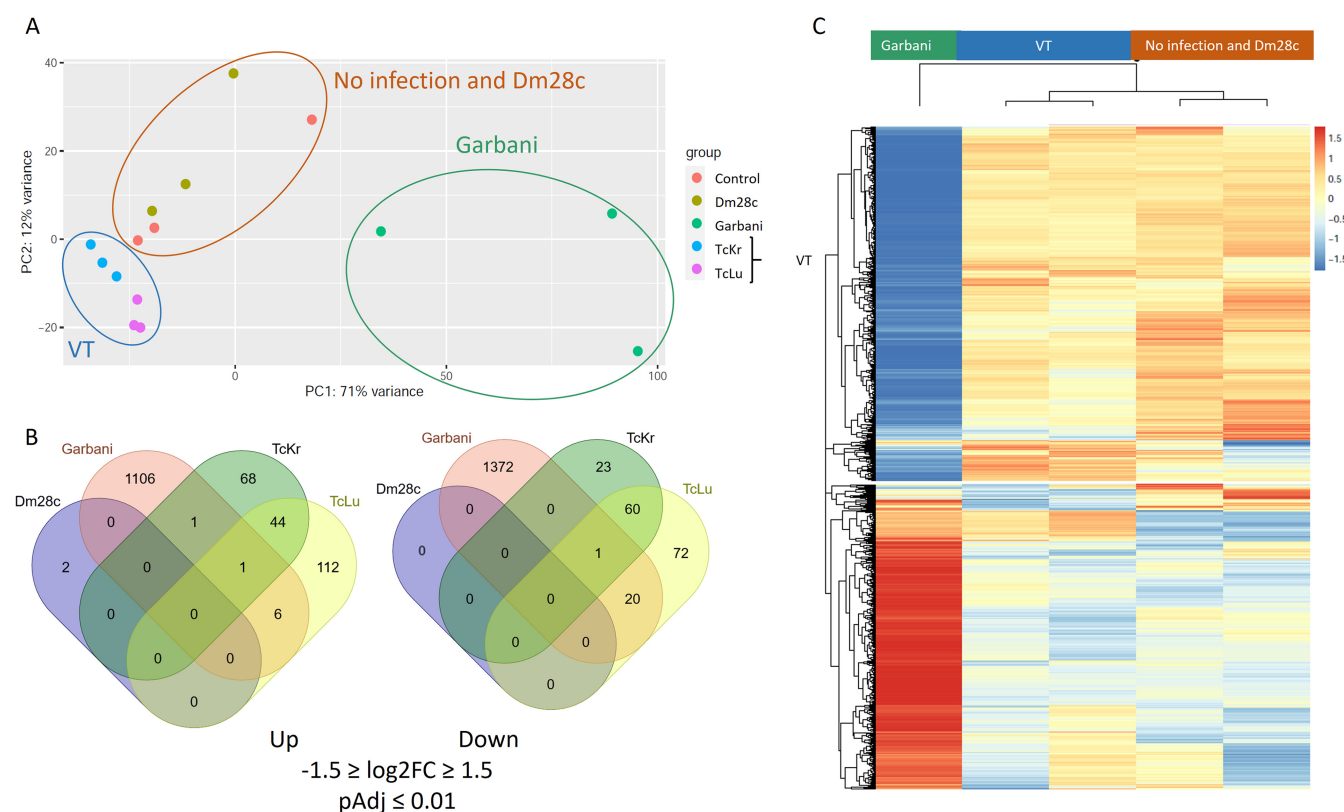


**FIG 5** (A) Infectivity index determined for each *T. cruzi* strain in two different human cell lines, HFF (fibroblasts) and Swan 71 (trophoblasts). (B) The relationships between the Swan 71 infection index and the HFF infection index determined for the different strains. Error bars show standard errors. \*\*,  $P < 0.01$ ; \*\*\*,  $P < 0.001$ .

(where FC is fold change) and an adjusted  $p$ -value of  $<0.01$  were considered, the highly virulent Garbani strain modulated the expression of 2,507 genes (1,114 up and 1,393 down compared to the uninfected control condition), the VT strains modulated 408 genes (232 up and 176 down), and only two overexpressed genes were found in placentas of mice infected with Dm28c (Fig. 6C and Table S3). The relationship between up- and downregulated genes was close to 1 for all conditions; none of the differentially expressed genes was shared by all the strains, and only 29 genes were shared by the Garbani and VT strains (8 up and 21 down) (Fig. 6B and Table S4). When the 30 most expressed genes (Fig. S2) or the most significant differentially expressed genes (Fig. S3) were compared between strains, their respective heatmaps were opposites; in other words, placental responses to high- and low-virulence vertically transmitted strains were diametrically opposed. The same opposite images were obtained when Gene Ontology (GO) was analyzed (Fig. 7). Notably, the most significant GO terms in response to the highly virulent strain were inflammation, cellular immune response, and ribosomal proteins, all of them at the expense of overexpressed genes, while the most significant terms in response to the VT strains (mitosis, meiosis, cell cycle, DNA replication, and response to DNA damage) consisted mainly of downregulated genes. In addition, the processes enriched in one condition were not affected in the other. When we dissected each term into its components, a surprising number of up- or downregulated genes were found as an exclusive response to each condition (Fig. S4). On the other hand, terms that were significantly downregulated in Garbani-infected mice were related to transport, lipid metabolism, cell morphology, and adherence, whereas the upregulated terms in mice infected with the VT strains were import- and secretion-related genes, which were downregulated in the placentas of mice infected with the highly virulent strain.

Specific gene families exhibiting inverse regulation in the Garbani- and VT strain-infected mouse placentas are shown in Fig. 8. Among these groups, those worth mentioning are the



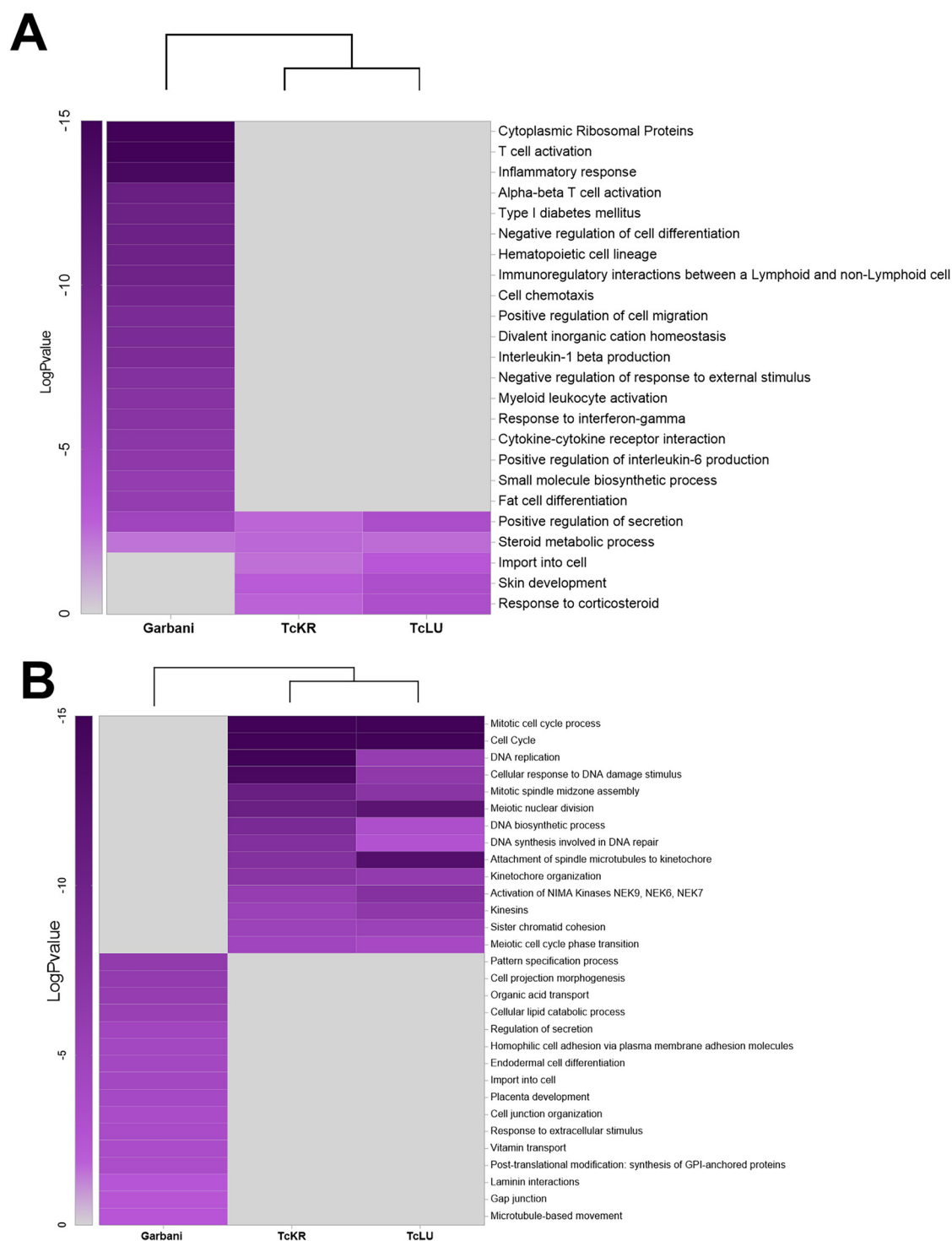


**FIG 6** (A) Principal component analysis (PCA) of RNA-seq data of the different biological replicates of placentas. (B) Venn diagrams of differentially expressed genes (DEGs) ( $1.5 \geq \log_2FC \geq 1.5$  and  $P_{adj} \leq 0.01$  [Benjamini-Hochberg-adjusted  $P$  value]) in infected placentas compared to control placentas. (C) Hierarchical cluster analysis of normalized read counts of DEGs. No infection, control mouse placentas; Garbani, high virulence (HV) strain; Dm28c, medium virulence (MV) strain; TcKr and TcLu, VT strains.

ones playing important roles in the maternal-fetal interphase: immunomodulators, such as genes encoding pregnancy-specific glycoproteins (*psg*), carcinoembryonic antigen cell adhesion molecules (*ceacam*), and prolactins (*prl*), in addition to those related to cell permeability and cell adhesion, such as solute carriers (*slc*), sodium channels (*scn*), desmogleins (*dsg*), and claudins (*cln*). Differential regulation among the Garbani and VT isolates also involved matrix metalloproteinases (*mmp*) and the adamalysin family (*adam*) and their intracellular (*timp*) and secreted (*sfpr*) inhibitors. Gene families involved in defense mechanisms showed opposite modulation under the different conditions; for instance, metallothioneins (*mt*), proteins that sequester metals, were upregulated in the Garbani group, while signaling lymphocyte activation molecules (*slam*) were inflammasome-related factors.

In summary, the three groups found concerning *T. cruzi* strain and placental relation/tropism also had differential placental responses evidenced in the RNA-seq experiment: while placentas of the group infected with the moderate-virulence strain resembled control placentas (and in fact, transmission did not occur), the high- and low-virulence groups exhibited completely different and opposite responses.

**The molecular footprint of placentas correlates with histopathological alterations.** Results from the analysis of placental sections stained with hematoxylin and eosin (H&E) indicated that the placentas of the Garbani group were the most affected, showing high scores of edema, inflammation, necrosis, and tissue degeneration. As shown by the images in Fig. 9, pathological alterations were found in both the maternal decidua basalis and the labyrinth zone of placentas of mice infected with the Garbani strain. Regarding edema and inflammation scores, the Garbani strain topped the ranking, followed by Dm28c, and last, TcLu, with mild inflammation. TcKr placentas did not show inflammation, degeneration, or necrosis. It is important to mention that no amastigote nests were identified in any of the samples using this staining method.

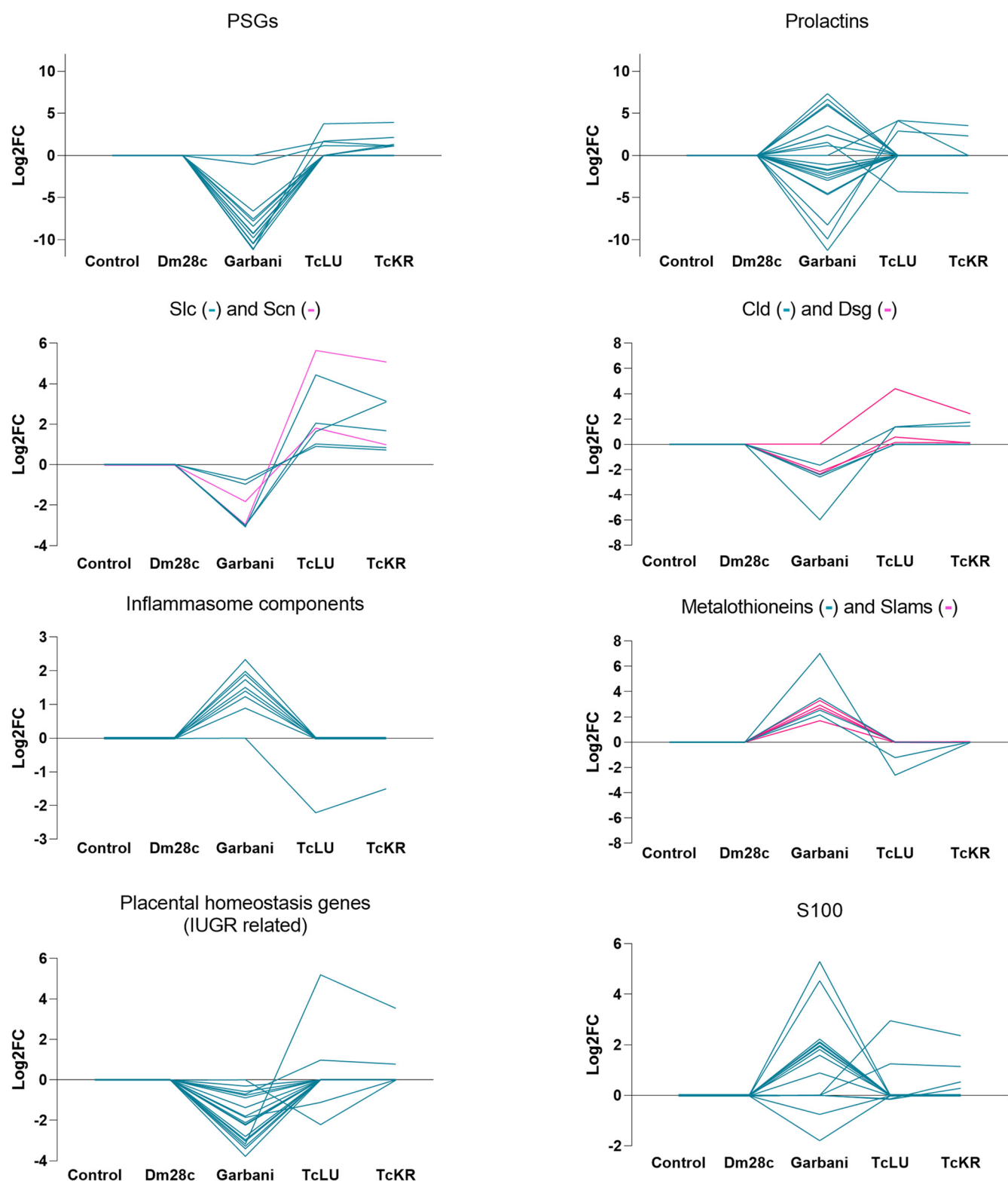


**FIG 7** Heatmaps showing enriched GO terms among the upregulated DEGs (A) and downregulated DEGs (B) in placentas derived from mice infected with HV strain Garbani or VT strain TcKr or TcLU.

## DISCUSSION

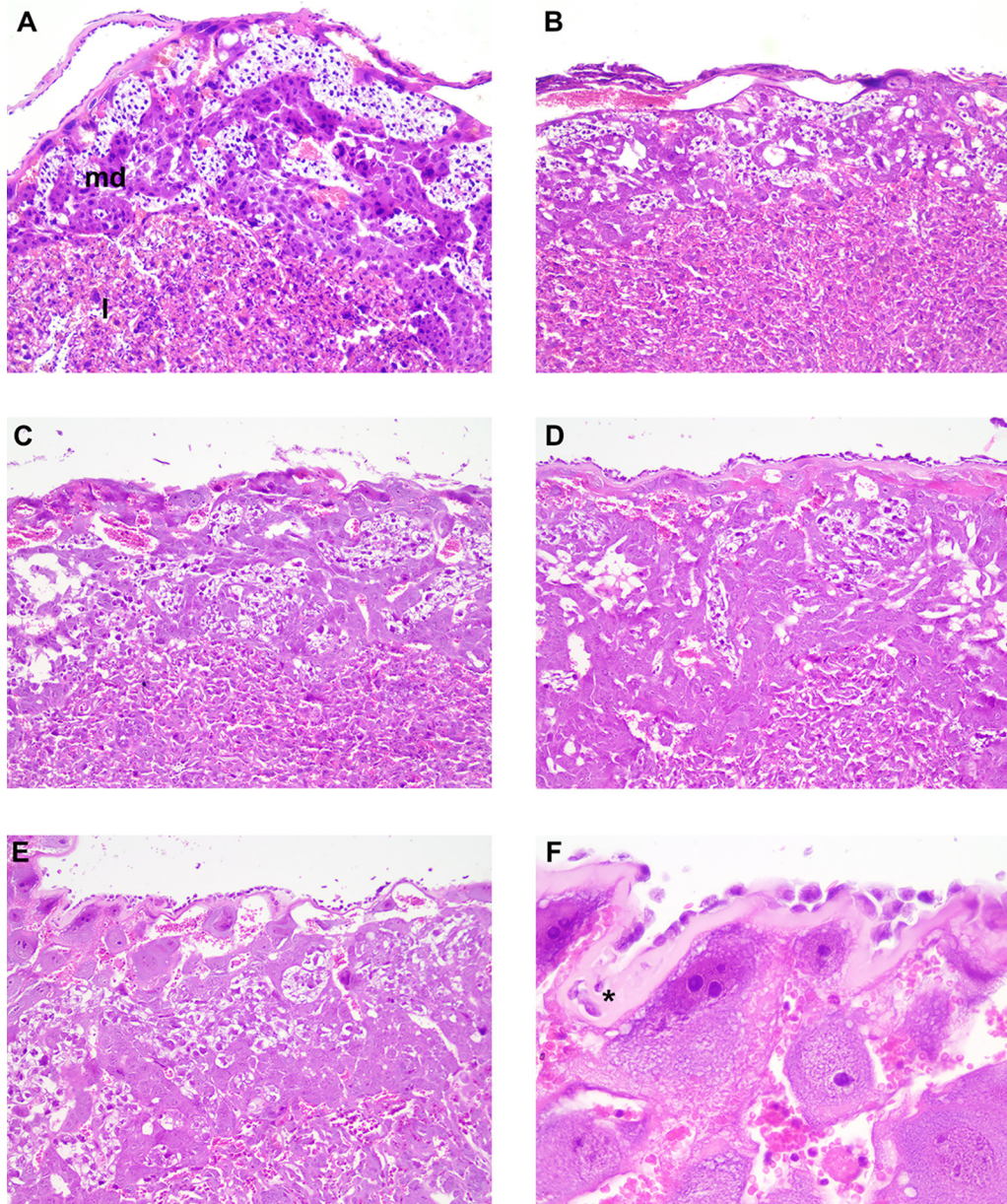
This work began with clinical observation. In the majority of congenital Chagas disease cases, the mothers are diagnosed during pregnancy at routine control screenings, due to the absence of symptoms, and familial clustering (several cases of congenital Chagas disease among one family cluster) is frequently observed (7, 12, 16). In this context, our working hypothesis was that there were *T. cruzi* strains adapted and specialized





**FIG 8** Differential expression (log<sub>2</sub>FC) found in groups of genes of interest compared between the different experimental groups.

to vertical transmission that probably differed substantially from commonly used laboratory strains. We selected the particular scenario of a formerly endemic region where vectorial transmission has been uninterrupted for at least 25 years (17). We focused on babies born under the following conditions: (i) Chagas disease detected in the mother



**FIG 9** Histopathological analysis of placentas. Note that in all images, the maternal side is at the top and the fetal side is at the bottom. (A) Maternal decidua basalis (md) and fetal labyrinth (l) are shown (control, H&E,  $\times 10$  magnification). (B) Mild edema of decidua basalis (Dm28c, H&E,  $\times 10$  magnification). (C) Mild edema of decidua basalis (TcLu, H&E,  $\times 10$  magnification). (D) Moderate edema of decidua basalis and labyrinth (TcKr, H&E,  $\times 10$  magnification). (E) Moderate edema of decidua basalis and labyrinth (TcGa, H&E,  $\times 10$  magnification). (F) Detail of moderate edema of decidua basalis (asterisk) (TcGa, H&E,  $\times 40$  magnification).

during routine pregnancy studies, (ii) asymptomatic mother, (iii) familial clustering, and (iv) *T. cruzi* vertically transmitted to the baby, from which we obtained isolates. Throughout this work, these isolates are generically termed VT isolates (for vertical transmission), whereas the reference strains of high (Garbani) and moderate (Dm28c) virulence are referred to below as HV and MV strains, respectively.

The first question was whether mice infected with VT isolates would mimic human-like clinical behavior and outcome, i.e., low virulence, undetectable parasitemias, and classical *T. cruzi* persistence strategies. Both the survival curves and the persistence tests confirmed that they had very low virulence. Likewise, we determined in the *in vivo* assays that Garbani and Dm28c were strains of high and moderate virulence,

which made them suitable controls (Fig. 1). VT strains, however, showed a capacity for persistence, since they were able to infect all organs studied (heart, gut, spleen, and uterus) (Fig. 3) and induce a systemic immune response comparable to that observed during infection with the HV and MV strains. *T. cruzi* infection in BALB/cJ mice induced a Th1 response (18), and we found that in all cases, IFN- $\gamma$ , IL-12, TNF- $\alpha$ , and IL-6 were upregulated, as well as the anti-inflammatory cytokines like IL-10 and IL-4, without significant differences between strains. Both parasite clearance from organs and control levels of cytokine expression were reached by day 60 p.i. in mice belonging to all infected experimental groups (Fig. 3). These results clearly show that VT parasites harbor intrinsic characteristics that allow them to disseminate and induce a competent immune response but are virtually nondetectable in blood. We can assert that the murine model reproduces the characteristics of low virulence observed in humans and that we have two adequate controls (moderate- and high-virulence strains) for subsequent comparative studies.

The second question was to evaluate the impact of VT strain infection on reproductive and vertical transmission parameters (Fig. 4). We developed a murine model of mating and pregnancy in mice and found that *T. cruzi* infection affected mating in all cases, regardless of the responsible strain, although not due to virulence, since the HV strain showed the highest mating percentage. On the other hand, the infection did not affect pregnancy or spontaneous abortion rates, since the differences observed in these parameters were not significant. It is worth mentioning that time of infection is an important factor for pregnancy outcome in female mice, since going through the acute phase shortly after embryo implantation induces unhealthy pregnancy outcomes (19, 20). Despite the effect on mating, we did not observe any impact on pregnancy rates in our model, and our results are in accord with other reports (21, 22). The finding that parasitic loads were higher in fetal tissues of VT strain-infected groups than in fetal tissues of reference infected groups indicated that VT strains were specialized in vertical transmission (Fig. 4C). Moreover, VT strains exhibited a more efficient persistence strategy, since they colonized different organs and induced an immune response without generating major damage in the host (this was demonstrated in our murine model, and clinical data indicates that this is also valid in humans). The VT strain transmission mode constitutes an example of highly successful parasitism which additionally dispenses of the insect vector. Concerning the reference strains, there were two completely different situations: (i) the MV strain-infected group showed the highest parasitic load in the uterus and the lowest signal in the placenta and the parasites were not transmitted vertically at all, while (ii) parasites in the HV strain-infected group were vertically transmitted, although with lower efficiency (low signal in fetal tissue and fewer infected individuals among the offspring) than the VT strains, and showed a low parasitic load in the uterus and a positive signal in the placenta. The inability of the MV strain to transmit vertically is a phenomenon that requires attention. Although it is beyond the scope of this work, we want to point out that this finding opens a question for future investigation: what is present or missing in the Dm28c strain that prevents it from being vertically transmitted? On the other hand, the HV strain's capacity for vertical transmission leads us to postulate that it is due to high virulence at the cost of infecting almost any tissue and organ, which does not imply a specialized mechanism or placental tropism. In addition to being an example of inefficient parasitism, this type of strain, widely used in laboratories, does not seem to resemble the behavior expected for circulating strains in humans. Moreover, the observed placental tropism of VT strains has a correlation in an *in vitro* human model: a comparison of the Swan (trophoblast-derived) index versus the HFF index can be used to show that this relationship was inverted in VT strains. The Swan/HFF infection index was higher in the VT strains than in the MV and HV strains (Fig. 5). Although there is a difference between mouse and human placentas regarding the depth of trophoblast invasion into the decidual tissue, both are hemochorial placentas in which the fetal trophoblast is in direct contact with maternal blood. Finally, to further explore *T. cruzi*'s capacity for adaptation to the mammal side of the cell cycle (and why not the human side), we assayed *in vitro* epimastigogenesis. As



suspected, whereas the reference strains shifted toward epimastigotes in the expected period, VT strains remained in intermediate form and never replicated (Fig. 2). This process, which occurs naturally in the digestive tract of triatomine vectors, can be reproduced both *in vivo* (23) and *in vitro* (15, 24). Given that *in vivo* epimastigogenesis is only partially modeled by the *in vitro* process and that VT strains were able to replicate in the triatomines from which they were isolated, our results suggest that parasite plasticity allows specialization and adaptation to nonvectorial transmission. Similar observations were made in other trypanosomatids, such as in African trypanosomes that were mechanically transmitted between cattle during their introduction to America (in the absence of their natural vector, the tsetse fly) and had selection occur toward parasites specialized in the mammalian cycle, including the loss of guide RNAs necessary for complete mitochondrial-gene editing (25). Future analysis of comparative genomics and gene profiling of VT strains is needed to dissect the parasite molecular mechanisms involved in the adaptation to human infection through vertical transmission.

Our next question was, are there changes at the placental gene expression level that could explain the specialization of VT strains for vertical transmission? We performed RNA-seq on the placentas of mice in groups infected with the different strains, and the main results can be observed in a PCA graph, showing the presence of three groups (Fig. 6A). Hierarchical clustering of differentially expressed genes (Fig. 6C) confirmed that HV and VT strains induced totally different placental responses. First, out of approximately 3,000 differentially expressed genes, most of them (~87%) corresponded to placentas of the HV strain-infected group and ~13% to placentas of VT strain-infected groups, and only 2 genes were found upregulated in the Dm28c (MV) strain-infected group. Remarkably, none of the differentially expressed genes was shared by all strains, and only 29 genes were shared by the HV and VT strains. On one hand, the MV strain was unable to vertically transmit at all. Among those strains that were transmitted, there were two scenarios: while the HV strain induced dramatic changes in placental gene expression, mainly involving upregulation of genes related to inflammation, the VT strains did not affect immune response-related genes but did downregulate genes belonging to mitosis, meiosis, and cell cycle processes, probably inducing an arrested state in trophoblasts and other cell types present in the placenta. The HV strain-infected group's most significant changes involved gene induction and GO terms related to immune response, inflammatory processes, and ribosomal proteins (see below). A gene-by-gene heat map overview showed that the placental responses resembled opposite images, where genes upregulated in the placentas of Garbani (HV) strain-infected mice were downregulated or unchanged in the placentas of VT strain-infected mice and vice versa.

As mentioned, one of the main differences among placental responses to infection with the highly virulent strain and VT strains was in the immune and inflammatory processes (Fig. S4). In addition, analysis of upregulated genes belonging to the immune response GO term in VT strains showed that all were related to tolerance and anti-inflammatory processes, being unchanged or downregulated in HV strain-infected placentas (Fig. S4, blue frame). Among them, it is worth mentioning *s100a14*, a gene that was found to be downregulated in the placentas of Chagas-seropositive mothers (26). The protein encoded by this gene is known to induce the *mmp2* gene (matrix metalloproteinase 2) (27, 28), which we found did not change under any conditions and which is capable of inducing macrophage migration (29). Its upregulation has also been linked to a condition of placental tissue inflammation called histologic chorioamnionitis (30). Some of the S100 proteins function via the "nutritional immunity" mechanism by sequestration of essential metals required for intracellular parasites to thrive (31). Remarkably, eight other *s100* genes that react to damage-associated molecular patterns (DAMPs) (*s100a1*, *s100a3*, *s100a4*, *s100a6*, *s100a7*, *s100a9*, *s100a10*, and *s100a11*) were upregulated in HV strain-infected placentas and not in VT strain-infected placentas. The fact that these eight genes are receptor for advanced glycation end products (RAGE) dependent is a fundamental difference from *s100a14* (downregulated in HV strain infection), whose activation is RAGE

independent. Since RAGE is a proinflammatory pathway, the activation of RAGE-independent defense mechanisms may be attenuated in an anti-inflammatory environment like that found in VT strain-infected placentas.

Metallothionein genes *mt1*, *mt2*, *mt3*, and *mt4* were upregulated in the HV group and downregulated or unchanged in VT groups (Fig. 8). Their gene products are cytosolic proteins that mitigate metal poisoning and alleviate superoxide stress (32). Inflammasome-associated cytokines have recently been described to be constitutively released from placentas in healthy pregnancies. This state is considered an immunological signature of health, which is far from the past belief of an immunosuppressive state (33). We found that major inflammasome components were differentially regulated in the HV strain-infected placentas, which suggested an unhealthy state that did not occur in VT strain-infected placentas. Inflammasome components *nlrp1*, *nlrp3*, *pycard*, *gsdmd*, *casp1*, *casp4*, and *casp12* were upregulated in the placentas of the HV strain-infected group and unchanged in the VT strain-infected group (Fig. 8). Upregulation of inflammasome genes during placental infection with *Listeria monocytogenes* (a bacterium associated with poor pregnancy outcomes) has been described (34), similar to what we found for the HV strain but not in VT strain-infected placentas.

The pregnancy-related genes (pregnancy-specific glycoproteins [PSGs]) with important roles in the maternal-fetal interphase were found to be differentially modulated between the two transplacental-passage models. PSGs are the most abundant trophoblastic proteins in maternal blood during pregnancy. They have immunomodulatory, proangiogenic and antiplatelet functions and regulate maternal-fetal interactions (35). Low levels of PSGs (observed in HV but not in VT strain-infected placentas) are associated with fetal growth restrictions (35). The fact that 16 PSGs were downregulated in placentas infected with the HV strain and unchanged in VT strain-infected placentas (Fig. 8) correlates with the healthier state of VT strain-infected placentas, the impairment of HV strain-infected placentas for control of immune responses, and the fact that low birth weight is observed for some babies born with congenital Chagas disease (36). Moreover, some of these pregnancy-related genes have been directly implicated in the regulation of microbial infections. Prolactin for instance, mainly modulated in placentas of the HV group, has been proposed as an immunomodulatory molecule that enhances *Toxocara canis* migration to the uterus and mammary glands, allowing vertical transmission (37). High prolactin serum levels have been associated with seronegativity to *Toxoplasma gondii* (62), which is capable of directly binding to the parasite and restricting intracellular growth and competent infection (reviewed in reference 38). Another pregnancy-related protein is pregnancy zone protein (PZP), an alpha macroglobulin that is highly expressed during late pregnancy and has the capacity to inhibit proteinases. PZP levels increase during the course of acute Chagas disease in children and reportedly interact with *T. cruzi*'s cruzipain, the parasite's main proteinase, inhibiting proteolytic capacity in order to minimize harm (39). In our experiments, PZP was downregulated in HV strain-infected placentas and unchanged in VT strain-infected placentas. The regulation patterns of these pregnancy-related genes obtained in this work support the differential modulation of our models, evidencing that the passage of VT strains does not interfere with healthy placental function, therefore allowing silent transplacental passage without major impact on pregnancy outcome.

It is worth mentioning that a group of genes related to membrane permeability and trafficking, encoding sodium channels and solute carriers, were upregulated in placentas of the VT strain-infected group but downregulated or unchanged in the HV group: these were *Scn9a*, *Slc22a13*, *Slc9b2*, *Slc6a1*, and *Slc17a2* (Fig. 8). Some of these genes have been previously associated with HIV infection and immunodeficiency and were modulated by hepatitis C virus (HCV) in favor of viral propagation and establishment of chronic infection (40). Specifically for *T. cruzi* placental infection, several other solute carriers were found to be upregulated in experimental infections (41). Parasites are known to regulate cell-cell adhesions as part of their pathogenic mechanisms, specifically by inhibiting gene expression and weakening unions (reviewed in reference 42).

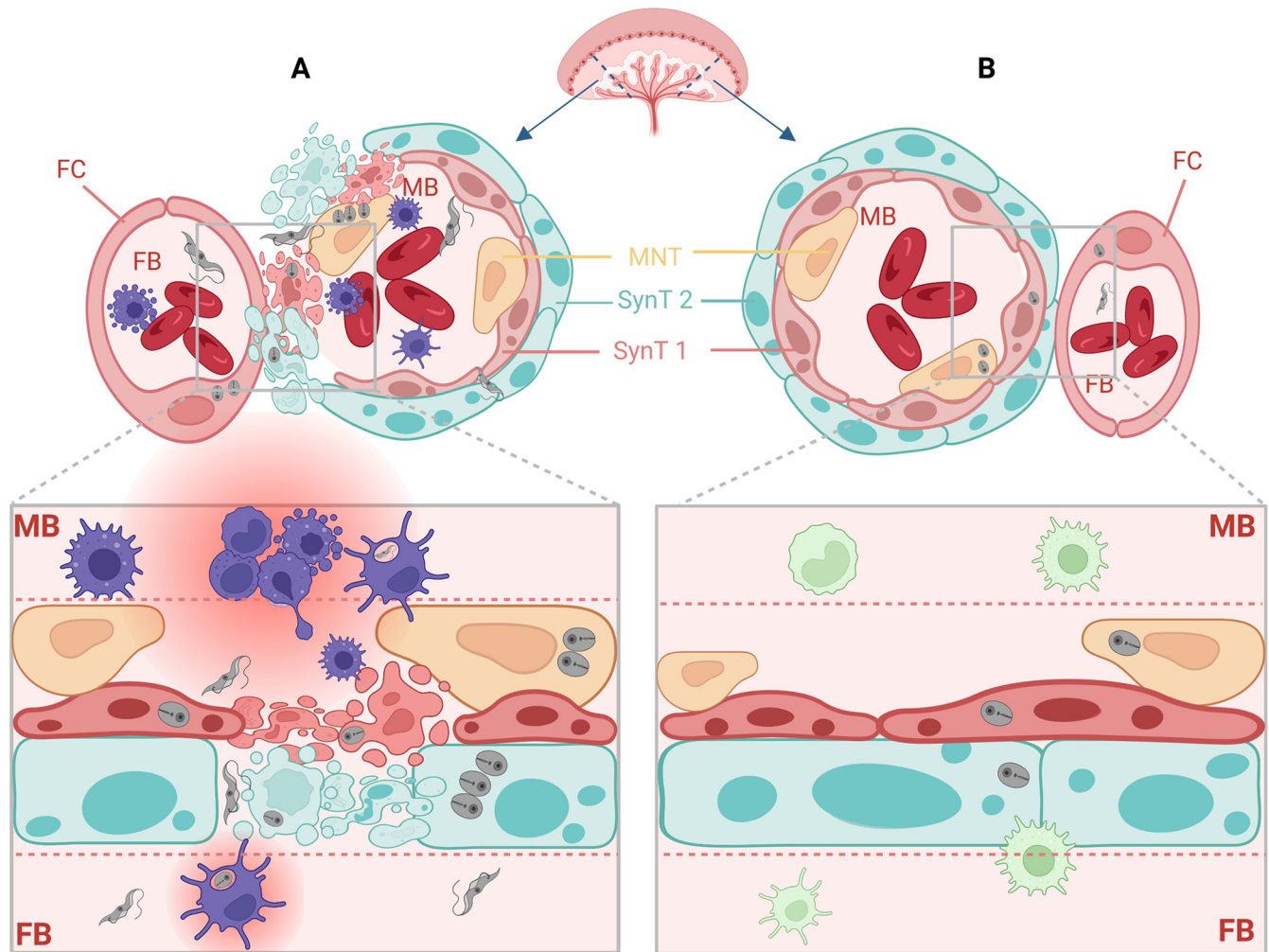
A set of genes encoding key components of cell-cell and cell-matrix unions that confer tissue stability and prevent paracellular passage of pathogens (43) were upregulated in the VT strain-infected placentas and downregulated or unchanged in HV strain-infected placentas. In particular, *Cldn* and *Dsg* genes are noteworthy, since they are components of tight junctions and desmosomes respectively, both related to paracellular metabolite passage and conductance (Fig. 8). Additionally, *Ocln*, another component of tight junctions, was upregulated with TcKr transplacental passage. Taken together, these results indicate that in addition to an inflammatory response, the HV strain induces changes that favor paracellular passage, already described for several pathogens (42), including *T. cruzi* (44). In opposition, the VT strains induced junction-related genes, which should favor intracellular placental passage, contributing to immune escape. This type of strategy has been described for *Plasmodium*, where through a lysis-free mechanism of cell-to-cell passage called cell traversal, the parasite migrates through the tissue until it finds the proper microenvironment to settle and replicate (45). Transcriptomic results indicating tissue damage in placentas infected with the HV strains and, more importantly, maintenance of tissue integrity in placentas of the VT strain-infected groups are supported by the histopathological analysis summarized in Fig. 9. Finally, the results obtained for VT strains, involving low replication and high placental tropism coupled with immunological silence without tissue damage, suggest that this strategic mechanism is exploited by specialized *T. cruzi* isolates and should be further studied. Generally, transcriptomic analysis found in the literature describes placental responses that resemble our results regarding the HV strain, leading to the conclusion that parasite passage is more likely to be due to tissue damage and inflammation, which may lower the parasite load but also allow passage.

In summary, we identified the following two different vertical transmission strategies, which are represented schematically in Fig. 10.

1. Unspecific or nonpreferential tropism toward the placenta. These strains (HV) are vertically transmitted, inducing damage due to high virulence, evidenced by the proinflammatory placental response to infection. We think that this kind of virulence pattern does not necessarily correspond to what is seen in clinical cases of congenital Chagas disease, except for acute infection acquired during pregnancy, which presents higher vertical transmission frequencies (46, 47).
2. Specific or placentotropic. This is the case for VT isolates, which present mild immune response modulation and a characteristic profile or regulation involving small changes. The mechanism used by these strains constitutes a specialization to human infection and nonvectorial transmission of *T. cruzi*. It evidences an adaptative strategy to achieve vertical transmission without causing damage or illness that may jeopardize an individual host's health. We postulate that this is the most common strategy in congenital Chagas disease, supported by the observation that in most of these cases, the disease is diagnosed by screening during pregnancy, since no signs or symptoms present. In addition, previous results regarding exacerbated immune responses, like the ones we observed for the Garbani (HV) strain, are typical of virulent laboratory strains and biased because *in vitro* models fail to reproduce what happens in the maternal-fetal interphase.

## MATERIALS AND METHODS

**Clinical cases and diagnosis.** Case 1 (2013) was an asymptomatic 12-month-old baby born and living in a nonendemic area (Montevideo, Uruguay), with a positive mother (24 years old) who also lived in a nonendemic area and a positive grandmother and great grandmother living in a nonendemic area (Montevideo) and an endemic area (Salto, Uruguay), respectively. The weight and gestational age at birth were 3.400 kg and 38 weeks. Case 2 (2015) was an asymptomatic 1-month-old baby born in a nonendemic area (Montevideo, Uruguay) to a positive mother, also born and living in Montevideo, who had two other positive children. The weight and gestational age at birth were 3.910 kg and 39 weeks. Case 3 (2017) was a 3-month-old baby born asymptomatic in a nonendemic area who developed an atrioventricular blockage at 3 months of age; the mother was positive. The weight and gestational age at birth were 3.320 kg and 41 weeks.



**FIG 10** Two vertical transmission strategies at the murine maternal-fetal interphase. (A) As observed for the highly virulent strain Garbani, *T. cruzi* is vertically transmitted, unspecifically and without preferential tropism toward the placenta, inducing tissue damage and a strong proinflammatory placental response. (B) As observed for VT isolates, *T. cruzi* is vertically transmitted, specifically and with a placental trophic strategy, in a silent manner, without causing damage and without inducing a proinflammatory response. Figure created with [biorender.com](https://biorender.com).

All of the mothers and babies were born in nonendemic areas. Xenodiagnosis (5 inbred stage IV nymphs of *Triatoma infestans*) was performed in babies, and after bites, nymphs' feces were monitored at 20, 40, and 60 days postdiagnosis. The procedure was repeated every 6 months until the baby was either positive or 18 months old. Xenodiagnosis was considered positive when *T. cruzi*-compatible trypomastigotes were observed in at least one nymph; positive patients were started on benznidazole treatment. Congenital infection was inferred due to patients residing in nonendemic areas and never having traveled or received blood transfusions. A summary of the characteristics of each clinical case is given in Table 1.

**Animals.** Inbred BALB/cJ and Nu/J 8-week-old female mice (Jackson Laboratory, Bar Harbor, USA) were housed under specific-pathogen-free conditions in individually ventilated cages (IVCs; Tecniplast, Milan, Italy) at the Animal Facility of the Unit of Biotechnology of Laboratory Animals. During infection, mice were assigned to groups of no more than six and housed in a biosafety level 2 (BSL2) ventilated rack with HEPA filters (IsoCage N; Tecniplast). All infection procedures were performed under a BSL2 laminar flow hood to comply with biosafety institutional rules. Animals received autoclaved fresh water and a standard autoclaved mouse diet *ad libitum* (Labdiet 5K67; PMI Nutrition, USA).

**Strain isolation and maintenance.** Feces of positive nymphs were resuspended in salinated water and inoculated into BALB/cJ mice (Jax strain No. 000651) via the intraperitoneal (i.p.) route. Parasitemia was assessed by microscopic observation of blood samples obtained by submandibular puncture every 3 days. When parasitemia was detected, an immunosuppression protocol with cyclophosphamide (Filaxis) was applied at 40 mg/kg of body weight/day for 5 days via the i.p. route. Afterwards, complete blood was used to inoculate three Nu/J mice (Jax strain no. 002019) to amplify the parasite load and create parasite stocks for further use in the experiments. Nu/J mice were infected through the i.p. route with  $2 \times 10^5$  parasites, and parasitemia was monitored 2 to 3 times a week by blood parasite counting obtained by puncture of the submandibular vein until a parasitemia peak of  $5 \times 10^6$  parasites/mL was reached. Thereafter, mice were deeply anesthetized via the i.p. route with a mixture of ketamine



**TABLE 1** Summary of characteristics of the clinical cases from which VT strains were isolated

| Datum for <sup>a</sup> : |      |     |            |         |         |        |     |            |          |             |     |            |                   |     |            |                   |
|--------------------------|------|-----|------------|---------|---------|--------|-----|------------|----------|-------------|-----|------------|-------------------|-----|------------|-------------------|
| Case                     | Baby |     |            |         |         | Mother |     |            |          | Grandmother |     |            | Great grandmother |     |            | Infected siblings |
|                          | D    | S/A | Birthplace | Wt (kg) | GA (wk) | D      | S/A | Birthplace | Age (yr) | D           | S/A | Birthplace | D                 | S/A | Birthplace |                   |
| 1 (TcLu)                 | +    | A   | NE         | 3.4     | 38      | +      | A   | NE         | 24       | +           | U   | NE         | +                 | U   | E          | No                |
| 2 (TcGi)                 | +    | A   | NE         | 3.9     | 39      | +      | A   | NE         | U        | U           | U   | U          | U                 | U   | U          | Yes               |
| 3 (TcKr)                 | +    | S   | NE         | 3.3     | 41      | +      | A   | U          | U        | U           | U   | U          | U                 | U   | U          | No                |

<sup>a</sup>D, diagnosis, via positive or negative xenodiagnosis of *T. cruzi* infection in the case of the babies and serology in the case of the adults; S, symptomatic; A, asymptomatic; NE, nonendemic area; E, endemic area; GA, gestational age at birth; Age, age of mother at baby's birth; U, unknown.

(100 mg/kg, vetanarcol; König, Buenos Aires, Argentina) and xylazine (10 mg/kg, seton; Calier, Barcelona, Spain) for final bleeding. Blood was collected by cardiac puncture, and mice were immediately euthanized by cervical dislocation. Total parasites were purified by differential centrifugation in a Percoll gradient as described elsewhere (48) and counted to be used in further experiments. The first parasitemia peak in nude mice was considered passage 1 (P1), and experiments were always performed with P1 to P5 parasites to conserve biological features. P1 to P5 *T. cruzi* VT isolates from case 1 (TcLu), case 2 (TcGi), and case 3 (TcKr) and trypomastigotes from the Dm28c (DTU TcI) and Garbani (DTU TcVI) strains were purified every time from nude mouse blood. Fresh parasites were used in all the experiments conducted in this study.

**Molecular typing.** Purified DNA from all strains was obtained from trypomastigotes and was used to identify the discrete typing unit (DTU) based on specific PCR products, including the intergenic region of spliced leader genes (SL-IR), the 24Sα ribosomal DNA subunit (rDNA 24Sα), and the A10 fragment previously described (49). PCR products were seeded in 5% MetaPhor agarose gels, and amplification products were compared to reference strains. PCR products were purified and verified by Sanger sequencing. DTU determination was afterwards confirmed by Alejandro Shijman (Instituto de Investigaciones en Ingeniería Genética y Biología Molecular Dr. Héctor N. Torres INGEBI-CONICET, Buenos Aires, Argentina) using a multiplex real-time PCR developed by that group (50).

**Epimastigogenesis.** Trypomastigotes purified from mouse blood were incubated in phosphate-buffered saline (PBS; pH 6) at 37°C for 4 h before epimastigogenesis in liver infusion tryptose (LIT) as previously described (15). Different time points were set for collection to count epimastigote forms and for immunofluorescence staining. Epimastigotes were quantified with the following equation: % epimastigotes = (number of epimastigotes/total number of parasites) × 100.

**Cell culture.** HFF-1 cells (human foreskin fibroblasts; SCRC-1041) were purchased from ATCC, and Swan 71 cells (51) were kindly donated by Gil Mor (C. S. Mott Center for Human Growth and Development, Department of Obstetrics and Gynecology, Wayne State University). Both cell lines were grown in Dulbecco's modified Eagle's Medium (DMEM) (Life Technologies, Grand Island, NY, USA) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS) at 37°C in a 5% CO<sub>2</sub> humidified atmosphere. The epimastigote forms used were grown in LIT supplemented with 10% FBS at 28°C.

**Determination of infectivity index in mammalian cells.** Nude mouse trypomastigotes derived from all strains were purified, counted, and incubated with HFF-1 and Swan 71 semiconfluent cell monolayers for 2 h at a multiplicity of infection of 5 parasites to 1 host cell. Afterwards, noninternalized trypomastigotes were washed 5 times with PBS and cells were incubated for another 48 h before immunofluorescence microscopy. After 48 h, coverslips were washed with PBS, fixed with 95% (vol/vol) ethanol, and stained with Fluoroshield with DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole; Sigma, USA). Infectivity was evaluated considering invasion and replication capacity by counting infected cells and parasites per infected cell in the infection photos obtained from each experimental condition. For each replicate, a total of at least 500 cells were counted and the results are expressed in graphs as the mean values and standard errors (SE) of 3 independent experiments. The infection index was calculated as follows: infection index = (number of amastigotes × number of infected cells)/total number of cells.

**Indirect immunofluorescence.** Infected cells plated on coverslips or parasite pellets were washed with PBS and fixed with PBS–4% paraformaldehyde, permeabilized for 5 min with 0.1% Triton X-100, and blocked for 30 min with 5% bovine serum albumin (BSA) (all reagents purchased from Sigma). Cells from infectivity and replications assays were incubated for 1 h at room temperature with anti-cytosolic trypanoxin peroxidase (cTXNPx) primary antibody (52) and for 30 min with Alexa Fluor 488 anti-rabbit IgG secondary antibody (Invitrogen, Eugene, OR). Parasites from the epimastigogenesis experiment were attached to poly-L-lysine-coated slides and treated as monolayers, except for those incubated with a monoclonal primary antibody (MAB25, kindly provided by Sergio Schenkman; 1:1,000 dilution) that binds to the *T. cruzi* flagellar calcium-binding protein (53). All antibodies were diluted in 1% BSA/PBS, and coverslips and parasites were mounted with ProLong antifade reagent.

**Mouse infection, monitoring, survival, and parasitemia curves.** For mouse survival and parasitemia curves, groups of six 6- to 8-week-old BALB/cJ females were inoculated with Nu/J-derived trypomastigotes and parasitemia was monitored as described above. An uninfected control group was included in every experiment. The initial trypomastigote dosages were  $5 \times 10^4$  and  $1 \times 10^4$  for the survival and parasitemia curves, except for the Garbani strain, for which the dosages were  $10^4$  and  $10^3$  due to its virulence. On postinfection (p.i.) day 35, when parasites were not visually detected in blood, mice were anesthetized by intraperitoneal inoculation of a mixture of ketamine (100 mg/kg) and xylazine (10 mg/kg). Blood was collected by cardiac puncture, and mice were euthanized by cervical dislocation. Blood was



placed into dry or heparinized tubes for serum collection or molecular testing, respectively. Organs (heart, gut, spleen, and uterus) were perfused with ice-cold PBS, and except for a piece of the spleen that was dissected and immediately stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  in TRIzol reagent (Invitrogen) until RNA extraction, the rest of the spleen and organs were dry-frozen at  $-80^{\circ}\text{C}$  for further DNA extraction.

**Evaluation of mating, pregnancy, implantation, and vertical transmission.** For vertical transmission experiments, 8-week-old BALB/cJ female mice were randomly separated into six groups (six mice per group) and infected with the different strains. An uninfected control group was also included. The initial inoculums were  $5 \times 10^4$  for VT strains,  $1 \times 10^4$  for Dm28c, and  $1 \times 10^3$  for Garbani. Injection and monitoring were performed as described above. To evaluate the reproductive parameters and vertical transmission, 30 days after infection, infected females were placed for 2 days in cages with dirty bedding from males (Whitten effect) to synchronize their estrous cycles. Afterwards, mating was performed by adding one proven male in a cage with 3 females for 5 days. Females were checked every day for the presence of a vaginal plug (VP), and the average of VP-positive females registered during those 5 days was used to calculate mating percentage as described below. All females were anesthetized and euthanized on day 20 of gestation, and viable fetuses and resorptions were recorded to measure pregnancy and implantation rates. Maternal blood, heart, gut, spleen, and uterus and fetal, placental, and resorption tissues were collected and processed according to the experiment procedure for each case. Rates were quantified with the following equations: % mating = (number of females with VP/total number of females)  $\times 100$ ; % pregnancy = (number of pregnant females/total number of females)  $\times 100$ ; % embryo resorption = (number of resorptions/total number of viable fetuses and resorptions)  $\times 100$ ; and vertical transmission rate = (number of positive viable fetuses/total number of pregnant females)  $\times 100$ .

**T. cruzi DNA detection by qPCR.** Blood DNA was extracted using the Quick-DNA miniprep plus kit (catalog number D4069; Zymo Research), and organ DNA using the Quick-DNA tissue/insect plus kit (catalog number D6016; Zymo Research) according to the manufacturer's recommendations. Tissue disruption was achieved using the Bullet Blender tissue homogenizer (Next Advanced) and the bead kit. Total DNA was quantified and diluted to  $100 \text{ ng}/\mu\text{L}$ , and  $1 \mu\text{L}$  of the sample was amplified using a kinetoplast DNA (kDNA) TaqMan probe (54) with an Integrated Data Technologies (IDT) mixture in a final volume of  $10 \mu\text{L}$ , and the relative expression was calculated by the cycle threshold ( $\Delta\Delta C_T$ ) method and normalized against the mouse *gapdh* (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase) housekeeping gene. Samples were analyzed in duplicate using the QuantStudio 3 thermocycler (Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific). Primers and probe sequences are detailed in Table S1. On the plates, reaction controls with water, positive controls with *T. cruzi* genomic DNA (gDNA), and negative controls with DNA from uninfected mice were included. The latter was used to set up a negative-cutoff line for PCR results in infected organs.

**Cytokine expression.** Mice infected with *T. cruzi* were euthanized at 30 and 60 dpi, and the spleens were removed and subjected to RNA extraction with TRI Reagent (Invitrogen) and the Direct-zol RNA miniprep plus kit (catalog number R2072; Zymo Research) according to the manufacturer's instructions. cDNA was synthesized from 500 ng of RNA using SuperScript II reverse transcriptase (Invitrogen) using oligo(dT). Reactions were performed in a final volume of  $10 \mu\text{L}$  using SYBR green (KAPA SYBR fast universal  $2\times$  quantitative reverse transcription-PCR [qRT-PCR] master mix), a final primer concentration of 200 nM, and  $1 \mu\text{L}$  of a 1/5 dilution of the cDNA. Each reaction was performed in duplicate in the QuantStudio 3 thermocycler (Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific). Melt curves were generated to check specific amplification products, and the  $C_T$  values obtained for each gene were normalized against the expression of the *Mus musculus gapdh* gene. The  $\Delta C_T$  was determined to calculate the relative expression for each gene in every sample by the  $\Delta\Delta C_T$  method. The primer sequences used to amplify the different cytokines are listed in Table S1.

**Transcriptomics.** For the RNA-seq experiment, three placentas for each condition (biological replicates) were selected and processed to extract total RNA. Briefly, placentas stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  were disrupted in TRI Reagent (Thermo Fisher) in a Bullet Blender (Next Advance) with 1.6-mm stainless steel beads (SKU SSB16; Next Advance) for 10 min at maximum velocity. Once the tissue was disrupted,  $200 \mu\text{L}$  of chloroform for 1 mL of TRI Reagent was added and the mixture homogenized and centrifuged for 15 min at 15,000 relative centrifugal force (rcf). The aqueous phase was recovered and processed with a Direct-zol RNA kit (Zymo Research, USA) according to the manufacturer's instructions. RNA quality was determined using the Bioanalyzer RNA 6000 nanokit (Agilent, USA) in a Bioanalyzer 2100 (Agilent, USA). An RNA integrity number (RIN) higher than 8 was considered acceptable to continue to library construction and sequencing. Library construction and sequencing were performed by Macrogen (Korea). For library construction, TruSeq stranded total RNA with Ribo-Zero Gold (Illumina, USA) was used. Sequencing was performed on the Illumina NovaSeq6000 platform. Paired-end reads of 100 bp were obtained. More than 60 million reads were obtained for each sample (Table S2). Raw data were deposited in NCBI (SRA) under accession number [PRJNA820598](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/sra/PRJNA820598). The sequences obtained were quality checked using FastQC (55). Reads were mapped against Mouse Genome version 39 (GRCm39.primary\_assembly genome download from Ensembl) with a STAR package (56) using annotation file M26 released by the GenCode project. Reads counts were performed using FeatureCounts (57), and mapping statistics and STAR and FeatureCounts parameters are included in Table S2. FeatureCounts output was processed in RStudio using the DESeq2 package (58) to obtain differentially expressed genes (DEG) using  $|\log_2\text{FC}| > 1.5$  and a Benjamini-Hochberg-adjusted  $P$  value of  $<0.05$  (or  $<0.01$  when indicated) to perform downstream analysis. A table of DEGs was generated for each condition compared to the control group (uninfected animals) (Table S3). DEG cluster analysis was performed using the pheatmap package in RStudio software or Graph Prism version 9.0. Gene Ontology analyses were performed in Metascape (59).

**Histopathology.** Immediately after the autopsy, whole placentas were fixed in 10% neutral buffered formalin (pH 7.4) for further processing. After 5 days of fixation, all the placentas were transversally

hemisected and processed simultaneously in an automatic tissue processor (SLEE MTP carousel tissue processor; SLEE medical, Germany), embedded in paraffin (SLEE MPS/P1 dispensing module; Germany), sectioned at 5  $\mu$ m (Leitz 512 rotatory microtome, Germany), deparaffined, rehydrated, stained with hematoxylin and eosin (H&E) (SLEE MSM Carousel slide stainer, Germany), rinsed, dehydrated, cleared, and mounted according to the method of Sala et al. (60). For histological evaluation, the specimens were examined under a light microscope (Olympus BX41) at 10 $\times$  magnification, considering the selected regions of the maternal decidua basalis, trophoblastic giant cell zone, spongiotrophoblast zone, and labyrinth zone, according to Georgiades et al. (61). Each specimen was evaluated by two different pathologists (B.V. and J.M.V.) to establish a histopathological score in each case.

**Ethical statement.** For all samples, we obtained informed consent from the patients and informed permission for the child, and we adhered to ethical standards in study design and execution. The isolation experiments were done following protocols preapproved by the institutional ethics committee (CEUA protocols 018–22 and 019–22) at the Institut Pasteur de Montevideo and in accordance with National Law 18.611 (<https://www.imo.com.uy/bases/leyes/18611-2009/5>).

**Data availability.** Raw data were deposited in NCBI (SRA) under accession number PRJNA820598.

## SUPPLEMENTAL MATERIAL

Supplemental material is available online only.

**SUPPLEMENTAL FILE 1**, PDF file, 3.5 MB.

## ACKNOWLEDGMENTS

We thank Estela Bevilacqua for critical reading of the manuscript, Alejandro Schijman for confirming our DTU results, Gil Mor for kindly sharing the Swan 71 cell line, Miriam Postan for kindly providing the Garbani strain, Guzmán Álvarez for benznidazol and nifurtimox drugs, Sergio Schenkman for Mab25 antibody, and Grazia Rey for helpful advice.

This work was supported by ERANET-LAC project ERANet17/HLH0142 (to C.R.). P.F.-T. was a PEDECIBA student and received grants from Agencia Nacional de Investigación e Innovación (ANII, Uruguay) and Comisión Académica de Posgrado (Universidad de la República, Uruguay). P.F.-T., G.G., G.L., A.C., J.M.V., and C.R. are members of the Sistema Nacional de Investigadores (SNI, ANII). G.G., M.C., P.F.T., and C.R. are PEDECIBA researchers.

## REFERENCES

- Guarner J. 2019. Chagas disease as example of a reemerging parasite. *Semin Diagn Pathol* 36:164–169. <https://doi.org/10.1053/j.semdp.2019.04.008>.
- Gascon J, Bern C, Pinazo MJ. 2010. Chagas disease in Spain, the United States and other non-endemic countries. *Acta Trop* 115:22–27. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2009.07.019>.
- WHO. 2015. Chagas disease in Latin America: an epidemiological update based on 2010 estimates = *Maladie de Chagas en Amérique latine: le point épidémiologique basé sur les estimations de 2010*. WHO. <https://apps.who.int/iris/handle/10665/242316>. Retrieved 3 April 2022.
- Oliveira I, Torrico F, Munoz J, Gascon J. 2010. Congenital transmission of Chagas disease: a clinical approach. *Expert Rev Anti Infect Ther* 8:945–956. <https://doi.org/10.1586/eri.10.74>.
- Lidani KCF, Andrade FA, Bavia L, Damasceno FS, Beltrame MH, Messias-Reason IJ, Sandri TL. 2019. Chagas disease: from discovery to a worldwide health problem. *Front Public Health* 7:166. <https://doi.org/10.3389/fpubh.2019.00166>.
- Bustos PL, Milduberger N, Volta BJ, Perrone AE, Laucella SA, Bua J. 2019. *Trypanosoma cruzi* infection at the maternal-fetal interface: implications of parasite load in the congenital transmission and challenges in the diagnosis of infected newborns. *Front Microbiol* 10:1250. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01250>.
- Howard EJ, Xiong X, Carlier Y, Sosa-Estani S, Buekens P. 2014. Frequency of the congenital transmission of *Trypanosoma cruzi*: a systematic review and meta-analysis. *BJOG* 121:22–33. <https://doi.org/10.1111/1471-0528.12396>.
- Carlier Y, Truysens C. 2015. Congenital Chagas disease as an ecological model of interactions between *Trypanosoma cruzi* parasites, pregnant women, placenta and fetuses. *Acta Trop* 151:103–115. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2015.07.016>.
- Antinori S, Corbellino M. 2018. Chagas disease in Europe: a long way to go. *Eur J Intern Med* 48:e29–e30. <https://doi.org/10.1016/j.ejim.2017.09.022>.
- Amorín B, Pérez L. 2016. Chagas congénito de segunda generación en Uruguay. Primer caso sintomático descrito en el país. *Arch Pediatr Urug* 87:245–252.
- Bittencourt AL, Sadigursky M, Barbosa HS. 1975. Congenital Chagas' disease. Study of 29 cases. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 17:146–159.
- Altcheh J, Biancardi M, Lapena A, Ballering G, Freilij H. 2005. Congenital Chagas disease: experience in the Hospital de Niños, Ricardo Gutiérrez, Buenos Aires, Argentina. *Rev Soc Bras Med Trop* 38(Suppl 2):41–45.
- Schijman AG, Altcheh J, Burgos JM, Biancardi M, Bisio M, Levin MJ, Freilij H. 2003. Aetiological treatment of congenital Chagas' disease diagnosed and monitored by the polymerase chain reaction. *J Antimicrob Chemother* 52:441–449. <https://doi.org/10.1093/jac/dkg338>.
- Berna L, Greif G, Pita S, Faral-Tello P, Diaz-Viraque F, Souza RCM, Vallejo GA, Alvarez-Valin F, Robello C. 2021. Maxicircle architecture and evolutionary insights into *Trypanosoma cruzi* complex. *PLoS Negl Trop Dis* 15:e0009719. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0009719>.
- Kessler RL, Contreras VT, Marliere NP, Aparecida Guarneri A, Villamizar Silva LH, Mazzarotto G, Batista M, Soccol VT, Krieger MA, Probst CM. 2017. Recently differentiated epimastigotes from *Trypanosoma cruzi* are infective to the mammalian host. *Mol Microbiol* 104:712–736. <https://doi.org/10.1111/mmi.13653>.
- Muñoz J, Coll O, Juncosa T, Vergés M, del Pino M, Fumado V, Bosch J, Posada EJ, Hernandez S, Fisa R, Boguñá JMGM, Sanz S, Portús M, Gascó J, Muñoz J. 2009. Prevalence and vertical transmission of *Trypanosoma cruzi* infection among pregnant Latin American women attending 2 maternity clinics in Barcelona, Spain. *Clin Infect Dis* 48:1736–1740. <https://doi.org/10.1086/599223>.
- Salvatella R. 2016. Chagas en Uruguay, 1937–2016. Información básica para su prevención, control y atención. *Arch Pediatr Urug* 87:49–52.
- Ferreira BL, Ferreira ER, de Brito MV, Salu BR, Oliva MLV, Mortara RA, Orikaza CM. 2018. BALB/c and C57BL/6 mice cytokine responses to *Trypanosoma cruzi* infection are independent of parasite strain infectivity. *Front Microbiol* 9:553. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00553>.
- Cencig S, Coltel N, Truysens C, Carlier Y. 2013. Fertility, gestation outcome and parasite congenital transmissibility in mice infected with TcI, TcII and TcVI genotypes of *Trypanosoma cruzi*. *PLoS Negl Trop Dis* 7:e2271. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002271>.

20. Leon CM, Montilla M, Vanegas R, Castillo M, Parra E, Ramirez JD. 2017. Murine models susceptibility to distinct *Trypanosoma cruzi* I genotypes infection. *Parasitology* 144:512–519. <https://doi.org/10.1017/S0031182016001980>.
21. Cabeza Meckert P, Chambo GJ, Laguens RP. 1980. Enfermedad congénita secundaria a la infección crónica del ratón con *Trypanosoma cruzi*. *Medicina (B Aires)* 40:40–44.
22. Solana ME, Celentano AM, Tekiel V, Jones M, Gonzalez Cappa SM. 2002. *Trypanosoma cruzi*: effect of parasite subpopulation on murine pregnancy outcome. *J Parasitol* 88:102–106. [https://doi.org/10.1645/0022-3395\(2002\)088\[0102:TCEOPS\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1645/0022-3395(2002)088[0102:TCEOPS]2.0.CO;2).
23. Navarro MC, Córdova A, Fernández KN, Arteaga RY, Graterol DI, Domínguez MI, De Lima AR, Pineda WA, Contreras VT. 2012. Epimastigogenesis of *Trypanosoma cruzi*: método para estudiar in vivo la transformación de tripomastigota en epimastigota. *Kasmera (Maracaibo)* 40:122–133.
24. Rondinelli E, Silva R, Carvalho JF, de Almeida Soares CM, de Carvalho EF, de Castro FT. 1988. *Trypanosoma cruzi*: an in vitro cycle of cell differentiation in axenic culture. *Exp Parasitol* 66:197–204. [https://doi.org/10.1016/0014-4894\(88\)90091-4](https://doi.org/10.1016/0014-4894(88)90091-4).
25. Greif G, Rodriguez M, Reyna-Bello A, Robello C, Alvarez-Valin F. 2015. Kinetoplast adaptations in American strains from *Trypanosoma vivax*. *Mutat Res* 773:69–82. <https://doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2015.01.008>.
26. Juiz NA, Torrejon I, Burgos M, Torres AMF, Duffy T, Cayo NM, Tabasco A, Salvo M, Longhi SA, Schijman AG. 2018. Alterations in placental gene expression of pregnant women with chronic Chagas disease. *Am J Pathol* 188:1345–1353. <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2018.02.011>.
27. Chen H, Yuan Y, Zhang C, Luo A, Ding F, Ma J, Yang S, Tian Y, Tong T, Zhan Q, Liu Z. 2012. Involvement of S100A14 protein in cell invasion by affecting expression and function of matrix metalloproteinase (MMP)-2 via p53-dependent transcriptional regulation. *J Biol Chem* 287:17109–17119. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.326975>.
28. Qian J, Ding F, Luo A, Liu Z, Cui Z. 2016. Overexpression of S100A14 in human serous ovarian carcinoma. *Oncol Lett* 11:1113–1119. <https://doi.org/10.3892/ol.2015.3984>.
29. Chen B, Miller AL, Rebelatto M, Brewah Y, Rowe DC, Clarke L, Czapiga M, Rosenthal K, Imamichi T, Chen Y, Chang CS, Chowdhury PS, Naiman B, Wang Y, Yang D, Humbles AA, Herbst R, Sims GP. 2015. S100A9 induced inflammatory responses are mediated by distinct damage associated molecular patterns (DAMP) receptors in vitro and in vivo. *PLoS One* 10:e0115828. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0115828>.
30. Kim MA, Lee YS, Lee CW, Seo K. 2014. Expression of S100A14 in placenta and its potential role in chorioamniotitis. *Placenta* 35:A89. <https://doi.org/10.1016/j.placenta.2014.06.288>.
31. Kozlyuk N, Monteith AJ, Garcia V, Damo SM, Skaar EP, Chazin WJ. 2019. S100 proteins in the innate immune response to pathogens. *Methods Mol Biol* 1929:275–290. [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9030-6\\_18](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9030-6_18).
32. Subramanian Vignesh K, Deepe GS, Jr. 2017. Metallothioneins: emerging modulators in immunity and infection. *Int J Mol Sci* 18:2197. <https://doi.org/10.3390/ijms18102197>.
33. Megli CJ, Coyne CB. 2021. Infections at the maternal-fetal interface: an overview of pathogenesis and defence. *Nat Rev Microbiol* <https://doi.org/10.1038/s41579-021-00610-y>.
34. Megli C, Morosky S, Rajasundaram D, Coyne CB. 2021. Inflammasome signaling in human placental trophoblasts regulates immune defense against *Listeria monocytogenes* infection. *J Exp Med* 218:e20200649. <https://doi.org/10.1084/jem.20200649>.
35. Moore T, Dveksler GS. 2014. Pregnancy-specific glycoproteins: complex gene families regulating maternal-fetal interactions. *Int J Dev Biol* 58:273–280. <https://doi.org/10.1387/ijdb.130329gd>.
36. Torrico F, Alonso-Vega C, Suarez E, Rodriguez P, Torrico MC, Dramaix M, Truysen C, Carlier Y. 2004. Maternal *Trypanosoma cruzi* infection, pregnancy outcome, morbidity, and mortality of congenitally infected and non-infected newborns in Bolivia. *Am J Trop Med Hyg* 70:201–209. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.2004.70.201>.
37. Del Rio-Araiza VH, Nava-Castro KE, Alba-Hurtado F, Quintanar-Stephano A, Aguilar-Diaz H, Munoz-Guzman MA, Ostoa-Salama P, Ponce-Regalado MD, Morales-Montor J. 2018. Prolactin as immune cell regulator in *Toxocara canis* somatic larvae chronic infection. *Biosci Rep* 38:BSR20180305. <https://doi.org/10.1042/BSR20180305>.
38. Galván-Ramírez MDLL, Gutiérrez-Maldonado AF, Verdúzco-Grijalva F, Dueñas Jiménez JM. 2014. The role of hormones on *Toxoplasma gondii* infection: a systematic review. *Front Microbiol* 5:503. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00503>.
39. Ramos AM, Duschak VG, Gerez de Burgos NM, Barboza M, Remedi MS, Vides MA, Chiabrando GA. 2002. *Trypanosoma cruzi*: cruzipain and membrane-bound cysteine proteinase isoform(s) interacts with human alpha(2)-macroglobulin and pregnancy zone protein. *Exp Parasitol* 100:121–130. [https://doi.org/10.1016/S0014-4894\(02\)00007-3](https://doi.org/10.1016/S0014-4894(02)00007-3).
40. Nguyen NNT, Lim YS, Nguyen LP, Tran SC, Luong TTD, Nguyen TTT, Pham HT, Mai HN, Choi JW, Han SS, Hwang SB. 2018. Hepatitis C virus modulates solute carrier family 3 member 2 for viral propagation. *Sci Rep* 8:15486. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-33861-6>.
41. Castillo C, Carrillo I, Libisch G, Juiz N, Schijman A, Robello C, Kemmerling U. 2018. Host-parasite interaction: changes in human placental gene expression induced by *Trypanosoma cruzi*. *Parasit Vectors* 11:479. <https://doi.org/10.1186/s13071-018-2988-0>.
42. Guttman JA, Finlay BB. 2009. Tight junctions as targets of infectious agents. *Biochim Biophys Acta* 1788:832–841. <https://doi.org/10.1016/j.bbame.2008.10.028>.
43. Jimenez-Pelayo L, Garcia-Sanchez M, Regidor-Cerrillo J, Horcajo P, Collantes-Fernandez E, Gomez-Bautista M, Hambrich N, Pfarrer C, Ortega-Mora LM. 2017. Differential susceptibility of bovine caruncular and trophoblast cell lines to infection with high and low virulence isolates of *Neospora caninum*. *Parasit Vectors* 10:463. <https://doi.org/10.1186/s13071-017-2409-9>.
44. Rodriguez ME, Rizzi M, Caeiro LD, Masip YE, Perrone A, Sanchez DO, Bua J, Tekiel V. 2020. Transmigration of *Trypanosoma cruzi* trypomastigotes through 3D cultures resembling a physiological environment. *Cell Microbiol* 22:e13207. <https://doi.org/10.1111/cmi.13207>.
45. Yang ASP, O'Neill MT, Jennison C, Lopatnicki S, Allison CC, Armistead JS, Erickson SM, Rogers KL, Ellisdson AM, Whisstock JC, Tweedell RE, Dinglasan RR, Douglas DN, Kneteman NM, Boddey JA. 2017. Cell traversal activity is important for *Plasmodium falciparum* liver infection in humanized mice. *Cell Rep* 18:3105–3116. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.03.017>.
46. Hermann E, Truysen C, Alonso-Vega C, Rodriguez P, Berthe A, Torrico F, Carlier Y. 2004. Congenital transmission of *Trypanosoma cruzi* is associated with maternal enhanced parasitemia and decreased production of interferon-gamma in response to parasite antigens. *J Infect Dis* 189:1274–1281. <https://doi.org/10.1086/382511>.
47. Moretti E, Basso B, Castro I, Carrizo Paez M, Chaul M, Barbieri G, Canal Feijoo D, Sartori MJ, Carrizo Paez R. 2005. Chagas' disease: study of congenital transmission in cases of acute maternal infection. *Rev Soc Bras Med Trop* 38:53–55. <https://doi.org/10.1590/s0037-86822005000100010>.
48. Grab DJ, Bwayo JJ. 1982. Isopycnic isolation of African trypanosomes on Percoll gradients formed in situ. *Acta Trop* 39:363–366.
49. Burgos JM, Altcheh J, Bisio M, Duffy T, Valadares HM, Seidenstein ME, Piccinini R, Freitas JM, Levin MJ, Macchi L, Macedo AM, Freilij H, Schijman AG. 2007. Direct molecular profiling of minicircle signatures and lineages of *Trypanosoma cruzi* bloodstream populations causing congenital Chagas disease. *Int J Parasitol* 37:1319–1327. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2007.04.015>.
50. Cura CI, Duffy T, Lucero RH, Bisio M, Peneau J, Jimenez-Coello M, Calabuig E, Gimenez MJ, Valencia Ayala E, Kjos SA, Santalla J, Mahaney SM, Cayo NM, Nagel C, Barcan L, Malaga Machaca ES, Acosta Viana KY, Brutus L, Ocampo SB, Aznar C, Cuba Cuba CA, Gurtler RE, Ramsey JM, Ribeiro I, VandeBerg JL, Yadon ZE, Osuna A, Schijman AG. 2015. Multiplex real-time PCR assay using TaqMan probes for the identification of *Trypanosoma cruzi* DTUs in biological and clinical samples. *PLoS Negl Trop Dis* 9:e0003765. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0003765>.
51. Straszewski-Chavez SL, Abrahams VM, Alvero AB, Aldo PB, Ma Y, Guller S, Romero R, Mor G. 2009. The isolation and characterization of a novel telomerase immortalized first trimester trophoblast cell line, Swan 71. *Placenta* 30:939–948. <https://doi.org/10.1016/j.placenta.2009.08.007>.
52. Pineyro MD, Parodi-Talice A, Arcari T, Robello C. 2008. Peroxiredoxins from *Trypanosoma cruzi*: virulence factors and drug targets for treatment of Chagas disease? *Gene* 408:45–50. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2007.10.014>.
53. Schenkmann S, Robbins ES, Nussenzweig V. 1991. Attachment of *Trypanosoma cruzi* to mammalian cells requires parasite energy, and invasion can be independent of the target cell cytoskeleton. *Infect Immun* 59:645–654. <https://doi.org/10.1128/iai.59.2.645-654.1991>.
54. Ramirez JC, Cura CI, da Cruz Moreira O, Lages-Silva E, Juiz N, Velazquez E, Ramirez JD, Alberti A, Pavia P, Flores-Chavez MD, Munoz-Calderon A, Perez-Morales D, Santalla J, Marcos da Matta Guedes P, Peneau J, Marcet P, Padilla C, Cruz-Robles D, Valencia E, Crisante GE, Greif G, Zulantay I, Costales JA, Alvarez-Martinez M, Martinez NE, Villarroel R, Villarroel S, Sanchez Z, Bisio M, Parrado R, Maria da Cunha Galvao L, Lacomme da Camara AC, Espinoza B, Alarcon de Noya B, Puerta C, Riarte A, Diosque P, Sosa-Estani S, Guhl F, Ribeiro I, Aznar C, Britto C, Yadon ZE, Schijman AG. 2015. Analytical validation of quantitative real-time PCR methods for quantification of *Trypanosoma cruzi* DNA in blood samples from Chagas

- disease patients. *J Mol Diagn* 17:605–615. <https://doi.org/10.1016/j.jmoldx.2015.04.010>.
55. Andrews S. 2010. FastQC—a quality control tool for high throughput sequence data. Babraham Bioinformatics, Cambridge, UK.
56. Dobin A, Davis CA, Schlesinger F, Drenkow J, Zaleski C, Jha S, Batut P, Chaisson M, Gingeras TR. 2013. STAR: ultrafast universal RNA-seq aligner. *Bioinformatics* 29:15–21. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bts635>.
57. Liao Y, Smyth GK, Shi W. 2014. featureCounts: an efficient general purpose program for assigning sequence reads to genomic features. *Bioinformatics* 30:923–930. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btt656>.
58. Love MI, Huber W, Anders S. 2014. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biol* 15:550. <https://doi.org/10.1186/s13059-014-0550-8>.
59. Zhou Y, Zhou B, Pache L, Chang M, Khodabakhshi AH, Tanaseichuk O, Benner C, Chanda SK. 2019. Metascape provides a biologist-oriented resource for the analysis of systems-level datasets. *Nat Commun* 10:1523. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-09234-6>.
60. Sala MA, Menguete C, Carraro Abrahao AA, de Albuquerque S, Lopes A, Domingues Ribeiro R. 2012. Alteraciones histopatológicas de placentas de ratones infectadas con diferentes cepas de *Trypanosoma cruzi*. *Bol Malariol Salud Ambient* 52:223–232.
61. Georgiades P, Ferguson-Smith AC, Burton GJ. 2002. Comparative developmental anatomy of the murine and human definitive placenta. *Placenta* 23:3–19. <https://doi.org/10.1053/plac.2001.0738>.
62. Mohammadpour A, Keshavarz H, Mohebbali M, Salimi M, Teimouri A, Shojae S. 2018. The relation of serum prolactin levels and Toxoplasma infection in humans. *Int J Gen Med* 12:7–12. <https://doi.org/10.2147/IJGM.S188525>.