



Escuela de Bio y Nanotecnologías EByN

“Modelos *in vitro* de infección por *Trypanosoma cruzi* para estudios de tropismo e infección placentaria”

Tesis para optar por el título de Licenciado en Biotecnología de la
Universidad Nacional de San Martín

Marco Di Salvatore

Director: Dr. Alejandro Schijman

Co Directora: Dra. Sofía Apodaca

Laboratorio de Biología Molecular de la Enfermedad de Chagas (LabMECh),
Instituto de Investigaciones en Ingeniería Genética y Biología Molecular,
INGEBI (CONICET), Buenos Aires, Argentina.



Instituto de Investigaciones en Ingeniería Genética y Biología Molecular “Dr. Héctor N. Torres”

Buenos Aires, 2024

“Ever tried. Ever failed. No matter. Try again.
Fail again. Fail better”

Samuel Beckett

Agradecimientos y dedicatoria

Toda familia tiene a alguien que se cae, que no pasa el corte, que se tropieza, al que la vida le pone la zancadilla. Lo realmente importante es levantarse siempre. Dicen que un triunfador es simplemente alguien que, a pesar de las derrotas, nunca se rindió y lo intentó una vez más.

Mi camino no fue sencillo. Primero, aposté por una carrera universitaria que no resultó ser la indicada, lo que me dejó con la desilusión de haber perdido tiempo y con la incertidumbre sobre qué hacer con mi vida. Ante el miedo paralizante de equivocarme otra vez y la presión constante de responder qué planeaba hacer, comencé a trabajar en un estudio contable.

Recuerdo las mañanas en las que viajaba en colectivo al trabajo, pensando que mientras mis amigos iban a clases, avanzando hacia sus metas, yo iba a un empleo que no me motivaba, pero que servía para colaborar en casa. Ese pensamiento me llenaba de angustia; deseaba con todas mis fuerzas estar nuevamente en esa situación: cursando, estudiando algo que despertara mi interés y compartiendo experiencias con personas en la misma etapa. El tiempo pasó, pero fue precisamente gracias a ese trabajo, al que odiaba ir cada mañana, que conocí la UNSAM y la carrera de biotecnología. Así son las vueltas de la vida. Al terminar el secundario, estudiar biología había sido una opción (lo que genera tener un profe apasionado), aunque finalmente opté por psicología. Por lo tanto, me pareció una idea razonable retomar esa vía que había descartado años atrás. Recuerdo la emoción al explorar las materias y el programa de biotecnología en la página de la facultad; su orientación y salida laboral me interesaron mucho. Lleno de nervios y entusiasmo, fui con mi hermano al departamento de alumnos a inscribirme. En ese momento, por primera vez en mucho tiempo, sentí la ilusión de un nuevo comienzo.

El camino, obviamente, no fue nada fácil. Retomar la rutina de estudio después de tanto tiempo fue un desafío enorme, especialmente enfrentando materias de un área completamente distinta y con temas muy complejos. Balancear el trabajo con el estudio exigió sacrificios inmensos, momentos que literalmente costaron sangre, sudor y lágrimas. Sin embargo, hoy, diez años después, puedo decir con orgullo que todo valió la pena. No puedo creer que esta etapa universitaria haya llegado finalmente a su fin. Este logro, tan grande y significativo en mi vida, no habría sido posible sin el apoyo de muchas muchas personas que estuvieron a mi lado en cada paso de este largo camino.

A mi mamá **Blanca** y a mi papá **José**, no existen palabras suficientes para expresar la gratitud que siento hacia ustedes por todo lo que han hecho (y siguen haciendo) por mí a lo largo de mi vida. Gracias por estar siempre, por apoyarme incondicionalmente y por enseñarme con el ejemplo que todo en la vida se logra con sacrificio y esfuerzo. Son un ejemplo de trabajo y

perseverancia. Gracias por aguantar mi mal genio en épocas de parciales o en los días de estrés por el laboratorio y la tesis. Este logro también es de ustedes, porque sin su apoyo, paciencia y amor nada de esto habría sido posible. Gracias por tanto, los amo.

A mi hermano **Pablo**, gracias por ser mi mejor amigo desde siempre, por todas las vivencias compartidas y los momentos inolvidables juntos. Sos uno de mis mayores ejemplos a seguir, dando todo por tus sueños y tu carrera profesional. Gracias por la ayuda con la tesis, por ofrecerte a leer las secciones y corregirme/ sugerirme cosas. Es estando en este punto, que puedo dimensionar lo groso que sos y lo que conseguiste. No podría estar más orgulloso de vos. Me encantaría que estuvieras aquí para compartir este momento conmigo, pero sé que estás presente en alma y pensamiento.

A mi cuñada **Cin**, no creo que exista alguien tan especial y compañera como vos. Siempre dispuesta a seguir a mi hermano hasta el fin del mundo (literalmente). Gracias por tu hospitalidad y el cariño inmenso que nos das cada vez que nos vemos y por tus mensajes alentadores. Mención especial a tu inmensa generosidad: gracias a ella estoy escribiendo esta tesis. Esa notebook fue mi salvación durante la pandemia, y mi salud mental estará eternamente agradecida.

A mi hermana **Melina**, gracias por ser tan compañera, por interesarte genuinamente en mis cosas, por esas tardes compartidas de estudio en verano y por las noches de joda en Apóstoles, tantas cosas compartidas. Sos un ejemplo de esfuerzo y perseverancia para mí. Nunca conocí a alguien que se rompa el lomo tanto como vos, con tanta dedicación, nobleza y responsabilidad hacia su carrera y sus múltiples trabajos. Gracias por estar siempre ahí, brindándome palabras de aliento y bancándome en los momentos difíciles, tanto facultativos como de la vida.

A mi cuñado **Ivo**, gracias por ser tan buena persona, por querer y cuidar tanto a mi hermana, y por estar siempre dispuesto a ayudar, ya sea con una simple acción o con una palabra amable. Tu atención y apoyo significan mucho para todos nosotros.

A **Juana y Cala**, gracias por la fiel compañía durante todos estos años de estudio, por su amor incondicional al llegar a casa y por ser miembros indispensables de nuestra familia multiracial. Las amamos.

A mis amigos del colegio: **Hora, Guada, Seve, Meni, Pili y Sofi**. Gracias por estos años de amistad incondicional, por compartir los buenos y los malos momentos de la vida. Por esas hermosas juntadas, las risas, los múltiples eventos de Hora, los perniles conflictivos y los miles de cumpleaños compartidos. Han pasado 15 años desde nuestro egreso, pero seguimos

unidos, algunos desde el exterior y otros desde acá, celebrando juntos cada logro. Gracias por ser parte de mi vida.

Al grupo maravilla, **Caro, Facu y Pau**. Gracias por ser la mejor compañía en todo esta etapa tan compleja y hermosa. Por tantas horas compartidas: de estudio, de cursada, de risas, de sufrimiento en épocas de parciales, de llanto. Gracias por apoyarme y ser incondicionales en esos momentos en donde realmente importan, sin su amor y su apoyo no hubiera podido con todo. Gracias por hacer que esas horas largas de cursada sean divertidas y llevaderas, por ser el mejor equipo de laboratorio o presentación. Por traer alegría a mi vida universitaria, por las miles de anécdotas, las juntadas y salidas. Me llevo una familia para toda la vida.

A mis amigos y compañeros de cursada, en especial a **Rama, Nehuen, Euge, Fede, Fede H, Lari, Aye, Tincho, Bruno, Tomy, Juan y Juli**. Gracias por cada almuerzo, juntada de estudio, mate lavado, almuerzos en la parri, zooms, among us, risas, tardes de “estudio” en el río, vacaciones y anécdotas juntos. Por ser más que compañeros de cursada para ser amigos, mis días en la facu no hubiesen sido lo mismo sin ustedes.

A **Silvina**, gracias por estos años de encuentros, charlas, llanto y paciencia infinita, soportándome mientras hablaba de la facultad y la bendita tesis. Nuestros caminos se cruzaron en un momento muy complicado de mi vida, y no tengo dudas de que sin tu ayuda me hubiese costado horrores seguir adelante. Durante este tiempo me demostraste no solo la increíble profesional que sos, sino también la excelente persona. Eternamente agradecido.

A mis compañeros de trabajo en el Colegio Dardo Rocha: **Rafa, Vani, Ana, Eli, Nico, Eze, Pablo, Roxi, Luis, Carlos y Juanpi**. Gracias, Rafa, por darme la oportunidad de comenzar en la docencia escolar, incluso sin tener experiencia previa, pero con mucha ilusión (y mucho miedo). Descubrí una nueva vocación y un mundo completamente desconocido en la docencia, algo que jamás había imaginado en mi vida. Sin embargo, cuando llegó la oportunidad, me anime a tomarla y me enamoré profundamente de esta profesión. La interacción con los chicos, escuchar sus intereses, entender sus inquietudes, acompañar sus quejas y celebrar sus logros y triunfos, hicieron de estos 6 años una experiencia increíble. Realmente me llevó a cuestionarme si quizá ya había encontrado algo que realmente me apasiona hacer. En este tiempo, siento que crecí y aprendí muchísimo, tanto como persona como docente pero lo más importante fue haber dado ese salto de fe hacia el vacío. Al defender mi tesis frente a una alumna que tuve en mi primer año en el colegio, siento que se cierra un círculo. Saber que ella, ahora estudiando biotecnología en la UNSAM, se interesó en esta carrera por su profesor de fisicoquímica del secundario, es un orgullo que nunca olvidaré.

Al glorioso **Beccar Flex**, gracias por ser el mejor equipo que integré en toda mi vida, un lugar donde todos podemos ser nosotros mismos sin miedo al rechazo y formar un grupo increíble, siempre tirando juntos hacia el mismo objetivo. Gracias por estar ahí en los momentos más difíciles, tanto en las victorias como en las derrotas, y no me refiero solo a los resultados. Gracias por ser mi cable a tierra, por compartir conmigo el amor por el básquet, por esos sábados a la noche viajando hasta la loma del... para jugar, por las cenas hasta el amanecer, por las juntadas pre partido a merendar, por bancar mi intensidad dentro de la cancha, por las partidas de monopoly y por haberse convertido en una parte esencial en mi vida.

A **Alejandro**, gracias por aceptarme y dejarme formar parte del grupo del laboratorio para llevar a cabo mi tesis de grado. Por la ayuda, los consejos brindados y haberme mostrado como es el funcionamiento en un laboratorio de investigación.

A **Sofia**, mi mentora, gracias por haberme enseñado todo lo que sé, por tu infinita paciencia al mostrarme las técnicas y guiarme en cada paso. Gracias por darme el espacio para equivocarme sin problemas y por ser siempre tan buena y empática conmigo. Agradezco también tu buena onda, que hizo que las interminables horas compartidas en el laboratorio fueran amenas y divertidas, ya sea hablando de Harry Potter, de comida o de series. Tu ayuda fue fundamental para llevar a cabo este trabajo, y siempre voy a estar profundamente agradecido por haberme acompañado a alcanzar esta meta tan importante en mi vida. Nuestros caminos se separan, pero no me queda más que desearte lo mejor en esta nueva etapa de tu vida y espero que todo vaya de maravilla en España.

A **Lady**, gracias chama por estar siempre ahí para ayudarme y apoyarme en este largo proceso, con esa alegría que te caracteriza y levanta cualquier ambiente. Por ser tan buena persona, real y transparente. Por escuchar (y aguantar) mis quejas, por los consejos en las PCRs y tomarte un tiempo de tu atareada jornada para siempre brindarme una mano. Sos una excelente persona que se merece siempre lo mejor en esta vida.

A **Ami, Nati, Silvia** y **Arturo**, gracias por las reuniones, por los hermosos parásitos fluorescentes, los consejos en los experimentos y también por sus palabras para enseñarme a lidiar con la frustración y hacerme entender que es una parte más de este largo proceso.

A los tripanosomátidos anónimos: **Karen, Fati, Alejo, Ceci, Juan, Joaco, Juanpi, Salo, Santi, Sofi, Ro** y **Ale**. Gracias por hacer que todas esas horas en el cuarto de cultivo fueran mucho más amenas y alegres hablando de anime, biología, calistenia, el lunfardo de los piropos, las

mascotas y demás. Por los consejos, la ayuda en momentos de duda (y crisis), los cambio de medio un finde lluvioso, un abrazo en el momento justo o simplemente preguntando como venía con la tesis.

A los integrantes del labo 222, **Tomy, Nacho, Lara, Flo, Clara, Indi, Caro, Rama, Javi, Lean, Karen, Mica y Fati**, gracias por aceptarme desde el primer día con la mejor onda, gracias por los mates y las cremonas de la tarde. Por los largos almuerzos para despejar la mala vibra de un resultado negativo. Sin duda eso ayudó a que el día a día sea más alegre y llevadero.

Al resto de Ingebianos, **Ceci, Ivan, Edgar, Juan, Mora y Nati** gracias por las meriendas de las siete de la tarde, los fulbitos, las charlas de Japón, las recomendaciones culinarias, las conversaciones relámpago de pasillo y los largos almuerzos.

A toda la **UNSAM** por brindar a lo largo de estos años una educación pública de excelente calidad. Gracias a todos los profesores, ayudantes, personal no docente y de maestranza por hacer todo esto posible. No podría estar más contento de haber elegido esta Universidad.

A los miembros de la **comisión de tesis de la UNSAM**, gracias por la buena predisposición frente a mis dudas, por la ayuda brindada, por los consejos y las correcciones. Por entender lo estresante que puede resultar defender una tesis y actuar empáticamente en consecuencia.

Finalmente, a **Giuli**. La UNSAM me ha dado innumerables cosas pero conocerte fue sin dudas la mejor de todas. Gracias por ser la mejor compañera de todas, por bancarme en este tiempo tan estresante y por entenderme mejor que nadie por lo que estaba pasando. Por soportarme cuando entraba en modo quejicus y todo me resultaba imposible (perdón por tanto drama). Por las infinitas muestras de amor, por ser incondicional, por las meriendas express, por la ayuda para corregir los exámenes del cole, por acompañarme al laboratorio a hacer los ensayos en horarios horribles de fin de semana, por entender mi amor por el básquet (y todo lo que eso conlleva), por las vueltas a casa juntos, por cortar semana en el cine, por las escapadas de finde, las vacaciones y todo el tiempo compartido. Gracias por ser una fuente de inspiración para mí, estar con vos me motiva a ser mejor persona y a dar lo mejor de mí siempre. Estoy tan orgulloso de vos, de tus logros, de tus metas conseguidas y en la tremenda profesional que te volviste. Es un privilegio tenerte a mi costado compartiendo camino. Tu sonrisa hizo que los días feos fueran lindos, haciendo que lo difícil sea fácil y distinto.

Te amo, infinitas gracias.

Resumen

La enfermedad de Chagas, causada por el parásito *Trypanosoma cruzi*, afecta a 7 millones de personas a nivel mundial. Entre sus vías de transmisión, la congénita se ha convertido en la principal causa de nuevos casos, debido al control de las demás vías de transmisión y a los movimientos migratorios, lo que convierte al Chagas congénito en un problema de salud pública a nivel mundial. Para que ocurra, es necesario que el parásito presente en la sangre materna atraviese la placenta. En este proceso, invade el trofoblasto, una estructura que forma parte de las vellosidades coriónicas y separa la sangre materna de la fetal. Se ha postulado que tanto factores parasitarios como del hospedero están implicados en la ocurrencia de transmisión vertical.

Las cepas de *T. cruzi* influyen en la respuesta placentaria a la infección y se clasifican en seis Unidades Discretas de Tipificación (UDTs) con distribución y ciclos de transmisión específicos. Los bebés infectados portan las cepas predominantes en las regiones donde sus madres adquirieron la infección.

Distintos modelos se utilizan para estudiar esta interacción parásito-hospedero: los modelos bidimensionales *in vitro*, tales como las líneas trofoblásticas, y los cultivos tridimensionales (3D), que son fisiológicamente relevantes y una buena alternativa porque imitan la microarquitectura de los tejidos y pueden proporcionar un entorno similar al de las infecciones naturales.

El objetivo general de este trabajo fue desarrollar y aplicar modelos *in vitro* para la infección por *T. cruzi*, enfocados en la transmisión congénita, que permitan estudiar mecanismos de invasión y tropismo placentario.

La infección se evaluó en cultivos en monocapa de la línea celular trofoblástica humana BeWo, utilizando como controles las líneas no placentarias HeLa y Vero, y dos cepas de parásitos. La cepa K98, perteneciente al UDT I, fue aislada de un paciente con Chagas crónico, mientras que VD, del UDT VI, se aisló de un caso de Chagas congénito. La cuantificación de la carga parasitaria se llevó a cabo por PCR cuantitativa en tiempo real, dirigida a los genes *EF1- α* de *T. cruzi* y *GAPDH* para BeWo y HeLa.

Además, se montó un modelo 3D con la línea BeWo utilizando el sistema MicroTissues® 3D Petri Dish®, desarrollando dos tipos de esferoides: *small* (12-256) y *large* (12-81), cuyos diámetros se midieron a través del análisis microscópico. Finalmente, se infectaron los esferoides con ambas cepas y se cuantificó la carga parasitaria por PCR en tiempo real.

En el modelo 2D, K98-GFP exhibió una infectividad significativamente mayor en células BeWo en comparación con HeLa y Vero. En contraste, VD-*wt* mostró una mayor infectividad en células Vero y menor en BeWo. Este mismo resultado se observó en la carga parasitaria, en donde K98-GFP presentó un mayor número de parásitos para ambas líneas celulares (BeWo y

HeLa) en comparación a VD-*wt*.

Se logró generar esferoides para ambos modelos, con diámetros teóricos de $341,30 \pm 24,52$ μm para los *large* (1000 células por micropocillo) y $163,28 \pm 6,98$ μm para los *small* (316 células). Los cultivos tridimensionales resultaron susceptibles a la infección por ambos clones de *T. cruzi*, VD mostró una distribución más generalizada de los parásitos en todo el esferoide, mientras que K98 se limitó principalmente a la superficie. Sin embargo, no se observaron diferencias significativas en la infectividad entre ambos clones en este sistema.

En el sistema 2D, K98-GFP presentó mayor infectividad y carga parasitaria en la línea trofoblástica en comparación con VD-*wt* que deriva de un caso congénito. En cambio, en el modelo 3D, VD aumentó su infectividad, lo que podría atribuirse a que los esferoides de células BeWo reproducen de manera más fiel las interacciones parásito-hospedero *in vivo*.

Esta diferencia resalta la importancia del modelo utilizado según el objeto de estudio y confirma que este modelo es una herramienta sencilla y eficaz para generar cultivos 3D susceptibles a la infección por *T. cruzi*, con un potencial para investigar el microambiente placentario y la transmisión transplacentaria.

Abstract

Chagas disease, caused by the parasite *Trypanosoma cruzi*, affects 7 million people worldwide. Among its transmission routes, congenital transmission has become the primary cause of new cases, due to the control of other transmission routes and migratory movements. This makes congenital Chagas a global public health problem. For this transmission to occur, the parasite present in maternal blood must cross the placenta. During this process, it invades the trophoblast barrier, a structure that is part of the chorionic villi and separates maternal blood from fetal blood. Both parasitic and host factors are thought to be involved in the occurrence of vertical transmission.

The strains of *T. cruzi* influence the placental response to infection and are classified into six Discrete Typing Units (DTUs) with specific distributions and transmission cycles. Infected infants carry the strains predominant in the regions where their mothers acquired the infection.

Different models are used to study this parasite-host interaction: *in vitro* two-dimensional (2D) models, such as trophoblastic cell lines, and three-dimensional (3D) cultures, which are physiologically relevant and a good alternative because they mimic the tissue microarchitecture and can provide an environment similar to natural infections.

The general objective of this work was to develop and apply *in vitro* models for *T. cruzi* infection, focusing on congenital transmission, to study mechanisms of transplacental invasion and tropism.

T. cruzi infection was evaluated in monolayer cultures of the human trophoblastic cell line BeWo, using non-placental cell lines HeLa and Vero as controls, and two parasite strains. The K98 strain, belonging to DTU I, was isolated from a patient with chronic Chagas disease, while VD, from DTU VI, was isolated from a congenital Chagas case. Parasite load quantification was performed using real-time quantitative PCR targeting *T. cruzi* EF1- α genes and GAPDH for BeWo and HeLa.

Additionally, a 3D model was established with the BeWo cell line using the MicroTissues® 3D Petri Dish® system, developing two types of spheroids: small (12-256) and large (12-81), whose diameters were measured through microscopic analysis. Finally, the spheroids were infected with both strains, and parasite load was quantified using real-time PCR.

In the 2D model, K98-GFP exhibited significantly higher infectivity in BeWo cells compared to HeLa and Vero. In contrast, VD-*wt* showed greater infectivity in Vero cells and lower infectivity in BeWo. This same result was observed in parasite load, where K98-GFP presented a higher number of parasites in both cell lines (BeWo and HeLa) compared to VD-*wt*.

Spheroids of both models were successfully generated, with theoretical diameters of $341,30 \pm$

24,52 μm for the large spheroids (1,000 cells per microwell) and $163,28 \pm 6,98 \mu\text{m}$ for the small ones (316 cells). The 3D cultures were susceptible to infection by both *T. cruzi* clones, VD exhibited a more generalized distribution of parasites throughout the spheroid, whereas K98 was mainly restricted to the surface. However, no significant differences in infectivity between K98 and VD were observed in this system.

In the 2D system, K98-GFP showed higher infectivity and parasite load in the trophoblastic cell line compared to VD-wt, which derives from a congenital case. Conversely, in the 3D model, VD increased its infectivity, which could be attributed to BeWo cell spheroids more faithfully reproducing *in vivo* parasite-host interactions.

This difference highlights the importance of selecting the appropriate model depending on the study objective and confirms that this model is a simple and effective tool for generating 3D cultures susceptible to *T. cruzi* infection, with potential for investigating the placental microenvironment and transplacental transmission.

Índice

Abreviaturas y definiciones.....	13
Introducción.....	14
1. Tripanosomátidos.....	15
2. Trypanosoma cruzi.....	15
2.1. Ciclo de vida.....	16
2.2. Diversidad genética.....	18
3. Enfermedad de Chagas.....	19
3.1. Epidemiología.....	20
3.2.1. Fase aguda.....	22
3.2.2. Fase asintomática.....	23
3.2.3. Fase crónica.....	23
3.3. Diagnóstico.....	24
3.4. Tratamiento.....	25
3.5. Vías de transmisión.....	25
4. Transmisión Congénita.....	26
4.1. Enfermedad de Chagas congénito (EChc).....	26
4.2. Epidemiología.....	26
4.3. Aspectos clínicos.....	27
4.4. Diagnóstico.....	27
4.5. Tratamiento.....	28
4.6. Factores parasitarios y placentarios.....	29
5. La placenta humana.....	30
5.1. Funciones de la placenta humana.....	30
5.2. Estructura de la placenta humana.....	31
5.3. Clasificación de la placenta humana.....	33
6. Transmisión Transplacentaria.....	35
6.1. Hipótesis de transmisión transplacentaria.....	35
6.2. Infección en el tejido trofoblástico.....	36
7. Modelos para el estudio de la interacción parásito-hospedero.....	37
7.1. Modelos bidimensionales (2D).....	37
7.2. Tejido Placentario.....	37
7.3. Modelos tridimensionales (3D).....	37
Hipótesis y.....	39
objetivos.....	39

Materiales y	41
métodos	41
Cultivo de líneas celulares en monocapa.....	44
Cultivo de clones de T. cruzi.....	46
Diferenciación de clones de T. cruzi.....	47
Detección de micoplasma por PCR.....	48
Ensayos de infección en monocapa.....	51
Cuantificación de carga parasitaria por PCR cuantitativa en tiempo real.....	53
Curvas estándar para cuantificación.....	55
Cultivo de células BeWo en 3D.....	56
Infecciones de cultivos 3D de células BeWo.....	58
Resultados	59
Cultivo de líneas celulares en monocapa.....	59
Cultivo de clones de T. cruzi.....	60
Diferenciación de clones de T. cruzi.....	61
Detección de micoplasma por PCR.....	62
Ensayos de infección en monocapa.....	63
Cuantificación de carga parasitaria por PCR cuantitativa en tiempo real.....	65
Curvas estándar para cuantificación.....	67
Cultivo de células BeWo en 3D.....	69
Discusión	73
Conclusiones	88
Anexo	91
Bibliografía	96

Abreviaturas y definiciones

ADN: Ácido desoxirribonucleico

ADN pol: ADN polimerasa

ANOVA: Análisis de varianza

Ca²⁺: Calcio

DAPI: 4,6-diamidino-2-fenilindol

DMSO: Dimetilsulfóxido

dNTPs: Nucleótidos desoxirribonucleicos trifosfato

DMEM-F12: Medio de cultivo Eagle modificado de Dulbecco/mezcla de nutrientes F-12

EDTA: Ácido etilendiaminotetraacético

ECh: Enfermedad de Chagas

EChc: Enfermedad de Chagas congénita

Ef-1 α : Factor de elongación 1 α

EtBr: Bromuro de etidio

Fiji: Fiji Is Just ImageJ

GFP: Green Fluorescent Protein

LIT: Medio de infusión de hígado y triptona

mL: Mililitro

mM: Milimolar

MEM: Medio esencial mínimo

Mg²⁺: Magnesio

MOI: Multiplicidad de infección

nm: Nanómetros

NTC: Controles sin templado

PFA: Paraformaldehído

PBB: Buffer fosfato salino

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa

pb: Pares de bases

RFP: Red Fluorescent Protein

rpm: Revoluciones por minuto

SFB: Suero fetal bovino

TAE: Tris-Acetato-EDTA

TAU: Triatomine Artificial Urine

T. cruzi: *Trypanosoma cruzi*

UV: Ultravioleta

UDTs: Unidades Discretas de Tipificación

U/ μ L: Unidades por microlitros

wt: *Wild Type*

% p/v: Porcentaje peso/volumen

% v/v: Porcentaje volumen/volumen

g: Fuerza gravitacional relativa

g: Gramos

kg: Kilogramos

μ L: Microlitros

μ m: Micrómetros

2D: Dos dimensiones, referido al cultivo de células en monocapa o bidimensional.

3D: Tres dimensiones, referido al cultivo tridimensional de células, también nombrado como esferoide.

Introducción

1. Tripanosomátidos

Los tripanosomátidos son protozoarios flagelados unicelulares que pertenecen al orden *Kinetoplastida* y a la familia *Trypanosomatidae*. Se distinguen por la presencia de una gran mitocondria con ADN circular conocido como kinetoplasto. Dentro de esta familia, se encuentran los géneros *Trypanosoma*, *Leishmania*, *Phytomonas*, *Crithidia*, *Herpetomonas*, *Leptomonas*, *Endotrypanum*, *Angomonas*, *Strigomonas*, *Wallaceina* y *Novymonas*.

Trypanosoma y *Leishmania* son de gran importancia en la región debido a su endemicidad y al impacto que generan en la población local. Ambos géneros son dixénicos, lo que significa que su ciclo de vida requiere la participación de dos hospedadores. Además, estos tripanosomátidos tienen la capacidad de infectar a la mayoría de las clases de vertebrados por medio de vectores invertebrados como triatominos, moscas, mosquitos y otros insectos hematófagos (1).

2. *Trypanosoma cruzi*

Es un protozoo flagelado perteneciente al Imperio *Eukaryota*, Reino *Protozoa*, Subreino *Eozoa*, Infrarreino *Euglenozoa*, Filo *Euglenophyta*, Subfilo *Glycomonada*, Clase *Kinetoplastea*, Subclase *Metakinoplastina*, Orden *Trypanosomatida*, Familia *Trypanosomatidae* y Género *Trypanosoma* (2).

Este parásito se distingue por varias características (3):

- Se reproduce asexualmente mediante fisión binaria, en la que una célula madre genera dos células hijas idénticas, proceso que ocurre tanto en el insecto vector como en células del hospedador mamífero durante su estadio intracelular.
- El flagelo le permite moverse de manera controlada y eficiente, efectuando un desplazamiento simétrico y ondulatorio. Esta característica facilita su invasión a las células del huésped, su desplazamiento a través del torrente sanguíneo en busca de establecer nuevos focos de infección, y la evasión del sistema inmune, lo que incrementa su capacidad de supervivencia y eficacia infectiva.
- Presentan una fina capa de carbohidratos, compuesta por glicoproteínas y glicolípidos, que recubre la superficie de la membrana plasmática. Esta cumple funciones importantes en la interacción entre el parásito y sus hospedadores: facilita el contacto y adhesión a la superficie de las células del hospedador y participa en las etapas iniciales de la penetración celular. Además, contribuye a la evasión del sistema inmune del hospedador al actuar como una barrera física que protege al parásito.

- Poseen una mitocondria diferenciada llamada kinetoplasto, que contiene hasta el 25% del ADN del parásito (ADNk). Esta tiene la forma de una red compuesta de miles de moléculas de ADN circular concatenadas en una gran red. La red contiene dos tipos de círculos de ADN: minicírculos (1.4 kilobases) y maxicírculos (de 20 a 37 kb, dependiendo de la UDT) que están presentes en algunas docenas de copias, y se asemejan en estructura y función genética al ADN mitocondrial en otros eucariontes. Los maxicírculos codifican genes esenciales para la respiración mitocondrial, mientras que los minicírculos contienen secuencias involucradas en la edición del ARN, un proceso necesario para la expresión funcional de los genes mitocondriales. Esta organización particular del ADNk permite la regulación y expresión de genes mitocondriales en *T. cruzi* y otros tripanosomátidos, adaptándose a sus necesidades metabólicas y a las distintas condiciones del hospedador.

2.1. Ciclo de vida

Trypanosoma cruzi es un parásito dixénico, ya que su ciclo biológico se lleva a cabo en dos hospederos: insectos triatomíneos de la familia *Reduviidae*, subfamilia *Triatominae* (hospedadores intermediarios) y mamíferos como hospedadores definitivos (4).

En los diversos hospederos mamíferos, en el insecto vector y en los medios de cultivo, *T. cruzi* presenta tres estadios con diferentes características morfológicas nombradas de acuerdo con la posición del kinetoplasto con relación al núcleo y la región de aparición del flagelo (3). Estas formas son:

Epimastigote: Estadio no infectivo y replicativo del parásito en el intestino del insecto vector y los medios de cultivo. Posee aspecto fusiforme (20 x 2 μm) con un kinetoplasto localizado a nivel del núcleo, del cual emerge el flagelo brindándole gran movilidad.

Tripomastigote: Estadio infectivo y no replicativo, también de aspecto fusiforme (20-25 x 2 μm). Tiene un kinetoplasto subterminal, ubicado en la parte posterior del parásito, detrás del núcleo. Desde el bolsillo flagelar, una estructura cercana al kinetoplasto, emerge el flagelo, que le proporciona movilidad en su estadio de tripomastigote. La proximidad del kinetoplasto al bolsillo flagelar está relacionada con su función en la producción de ATP, ya que el ciclo respiratorio de la mitocondria es fundamental para generar la energía necesaria para el movimiento del flagelo. Este está conectado a la membrana plasmática formando la membrana ondulante, lo que le proporciona movilidad en el torrente sanguíneo del hospedador. En su base se encuentra el disco flagelar, una estructura citoplasmática en forma de anillo compuesta por microtúbulos que rodean el cuerpo basal del flagelo. Se cree que el disco flagelar desempeña un papel en el anclaje y regulación del movimiento del

flagelo, facilitando la propulsión del parásito en distintos ambientes.

que recorre al parásito brindando gran movilidad. Se le encuentra en la sangre de los vertebrados y en el intestino posterior de los vectores (tripomastigote sanguíneo y metacíclico, respectivamente). Es la forma de diseminación de la infección en los mamíferos y la forma infectiva vectorial.

Amastigote: Estadio no infectivo y replicativo, de forma esférica u ovalada (2-4 μm), sin movilidad y con un pequeño flagelo intracelular. Es la forma responsable de la acción patógena y de reproducción intracelular en los hospederos mamíferos (3).

Este parásito presenta un ciclo de vida complejo (**Figura 1**), con su forma infectiva presente en el intestino posterior del insecto vector. Al picar a un mamífero, el vector infectado defeca cerca del sitio de alimentación, excretando heces que contienen tripomastigotes metacíclicos (**Figura 1-9**). Estos parásitos pueden ingresar al nuevo hospedador a través de lesiones en la piel o mucosas como las nasal, bucal u ocular, ya sea por el rascado o al transportar inconscientemente las deyecciones del insecto (**Figura 1-1**) (5). Una vez que ingresan al cuerpo, los parásitos tienen la capacidad de infectar diversas células nucleadas, incluyendo fibroblastos, células musculares, epiteliales y endoteliales (**Figura 1-2**). Al adherirse a una célula, los tripomastigotes metacíclicos son envueltos en una vacuola parasitófora, que posteriormente se fusiona con vesículas lisosomales. En esta instancia, los parásitos logran evadir la acción de las enzimas digestivas mediante mecanismos especializados. Una vez en el interior de la célula, pierden su flagelo y membrana ondulante, transformándose en amastigotes, que se replican por fisión binaria (**Figura 1-3**). Finalmente, las células infectadas se lisan, liberando tripomastigotes sanguíneos que infectan células vecinas o acceden al torrente sanguíneo, pudiendo alcanzar otros órganos o tejidos (**Figura 1-4**). Los tripomastigotes sanguíneos pueden ser ingeridos nuevamente por un insecto vector no infectado al succionar la sangre del mamífero hospedador infectado (**Figura 1-5**). En el intestino medio del vector, los parásitos se alargan y se transforman en epimastigotes, donde se replican (**Figura 1-6,7**). Al llegar al recto, los epimastigotes se diferencian nuevamente en tripomastigotes metacíclicos, completando así su ciclo de transmisión (**Figura 1-8**) (3,6,7,8).

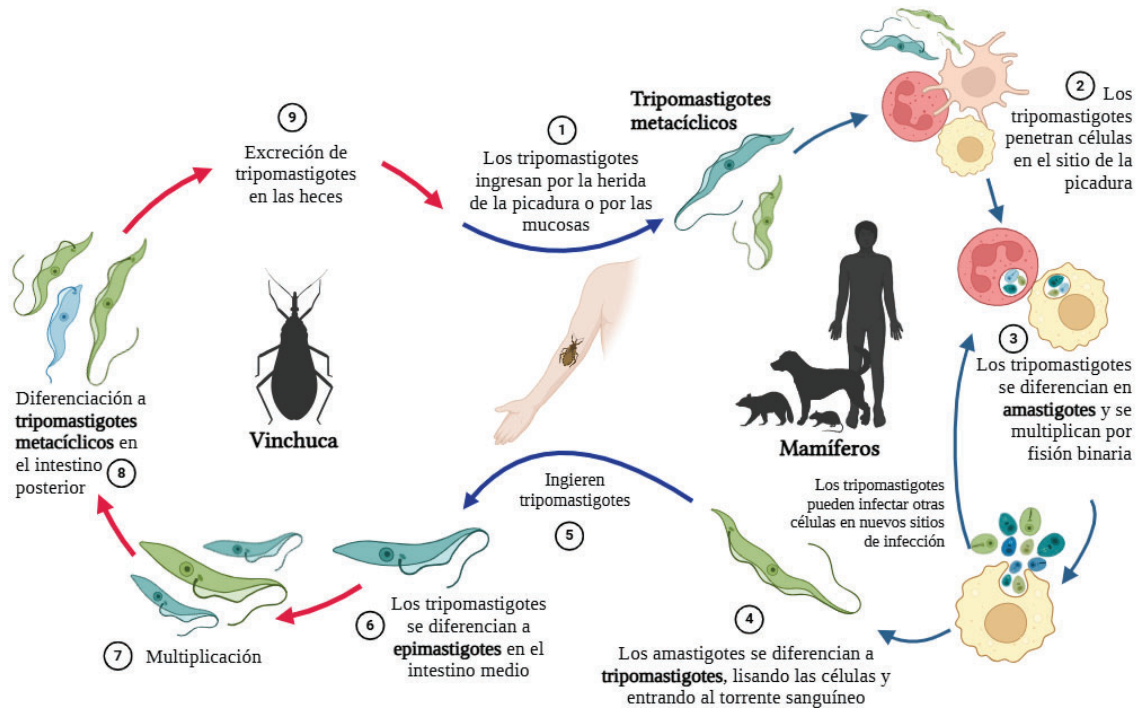


Figura 1. Ciclo de vida de *Trypanosoma cruzi*.

2.2. Diversidad genética

T. cruzi presenta una notable diversidad genética y fenotípica intraespecífica. Estudios iniciales mostraron diferencias de hasta el 40% en el contenido de ADN entre cepas, atribuibles principalmente al ADN nuclear. Un análisis posterior de clones derivados de aislados *wild type* (forma natural o no mutada de un organismo que se encuentra en la naturaleza o en poblaciones no modificadas. Se considera la versión de referencia con la que se comparan mutantes o variantes genéticas) confirmó que el tamaño del genoma puede variar hasta un 48%. Este organismo es diploide, con un genoma distribuido en pares homólogos de cromosomas que varían en número y tamaño entre cepas. Estas características indican una alta plasticidad del genoma, lo que podría contribuir a la diversidad genotípica y fenotípica de la especie. La comprensión de la estructura de la población de este parásito es relevante, debido a los vínculos con los ciclos de transmisión y enfermedad (9).

En la actualidad, las poblaciones naturales de *T. cruzi* han sido clasificadas en siete Unidades Discretas de Tipificación (UDTs), TcI a TcVI y TcBat, con distintas distribuciones geográficas y ciclos de transmisión. Cada UDT agrupa poblaciones parasitarias genéticamente cercanas, que comparten marcadores moleculares y bioquímicos (10,11).

Dejando de lado los orígenes evolutivos de las UDTs, se observan características geográficas y

biológicas divergentes, comprender estos factores y analizar sus diferencias puede ayudar a entender la epidemiología de la enfermedad de Chagas (ECh). Los ciclos doméstico y silvestre de *T. cruzi* están relacionados con las UDTs, ya que ciertas unidades tienden a presentarse más con un ciclo que con otro. Por ejemplo, TcIII se encuentra principalmente en el ciclo silvestre, infectando animales en hábitats naturales, mientras que TcV y TcVI están más presentes en el ciclo doméstico, donde predominan en áreas urbanas y periurbanas y se asocian con infecciones en humanos y animales domésticos (**Figura 2**) (11).

En cuanto a su distribución, se observa que en el cono sur predominan TcII, TcV y TcVI (y en menor proporción TcI), especialmente en el Gran Chaco y el extremo sur de Brasil. En América del Sur y América Central, TcI es más común y se distribuye ampliamente en ambas áreas, extendiéndose incluso hasta Norteamérica. Sudamérica es el área de distribución de TcIII, aunque es raro en humanos. Por otro lado, TcIV está presente tanto en América del Norte como en América del Sur, con una mayor incidencia en Venezuela, aunque es esporádico en otras zonas del continente sudamericano (**Figura 2**). Finalmente, TcBat se encuentra en Brasil, Panamá y Colombia. De igual manera, las poblaciones parasitarias halladas en diferentes reservorios y vectores son variables a lo largo del continente (11).

En cuanto a la infección en humanos, todas las UDTs han mostrado capacidad infectiva presentando prevalencias diferentes, a diferencia de TcBat que se encuentra principalmente en murciélagos. Según sus asociaciones con formas clínicas de la ECh, pueden agruparse de la siguiente manera: TcI se encuentra en pacientes con cardiopatías. Por otro lado, TcII está asociada con cardiopatías, mega síndromes e infecciones congénitas. TcIII, en cambio, es escasa en humanos y no está vinculada a una forma clínica específica. En cuanto a TcIV, se observa principalmente en infecciones humanas en Venezuela, sin asociación a formas clínicas particulares. TcV es el grupo más común en infecciones humanas en Argentina y el sur de América del Sur, y se presenta en pacientes con cardiopatías, mega síndromes e infecciones congénitas. Finalmente, TcVI también se asocia con cardiopatías, mega síndromes e infecciones congénitas (12).

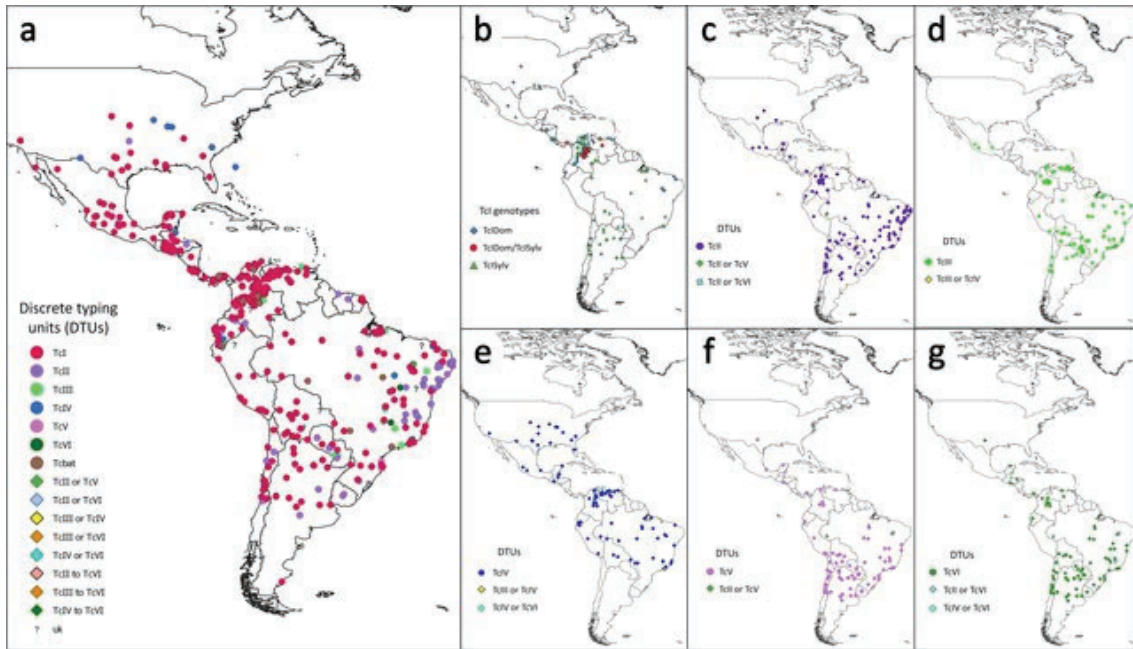


Figura 2. Distribución de los DTUs de *T. cruzi* en las Américas. (a) Mapa de consenso que abarca las 15 categorías (mostradas en la leyenda), (b) Distribución de TcI y sus genotipos, (c) TcII, (d) TcIII, (e) TcIV, (f) TcV y (g) TcVI. Extraído de: (11).

3. Enfermedad de Chagas

La ECh, también conocida como tripanosomiasis americana, es una enfermedad infecciosa causada por el parásito protozoario *Trypanosoma cruzi*, que infecta a mamíferos y es transmitido por triatominos. Es una zoonosis metaxénica transmitida principalmente por insectos hemípteros, como los triatominos, comúnmente conocidos como vinchucas en algunos países de América del Sur. Estas atraviesan varios estadios de desarrollo, desde ninfa hasta adulto, con un tamaño que varía entre 2 mm en las primeras fases y hasta 2 cm en la adultez. Las diferentes especies de vinchucas pueden presentar una variedad de colores, incluyendo negro, marrón oscuro, marrón rojizo, amarillo, anaranjado y blanco, además de patrones con franjas o manchas en tonos rojizos, naranjas o amarillos, dependiendo de la especie y su hábitat. Su cabeza es estrecha y cuenta con dos pequeñas protuberancias a modo de ojos; posee seis patas, un par de antenas y un par de alas. Su cuerpo es plano, pero al alimentarse, su abdomen puede expandirse hasta cuatro veces su tamaño original (**Figura 3**) (13). Pertenecen a la familia *Reduviidae* y subfamilia *Triatominae*, dentro de esta subfamilia de insectos hematófagos, la mayoría de los casos de ECh se atribuyen a las siguientes especies de hábitos domiciliarios: *Rhodnius prolixus*, *Triatoma dimidiata* y *Triatoma infestans* siendo esta última el principal vector en la Argentina y sur de Brasil (14).

Esta enfermedad puede ser adquirida o congénita, posee y compromete diversos órganos y

sistemas, en especial el corazón y el tubo digestivo (15), recibe su nombre en honor a Carlos Justiniano Ribeiro das Chagas, médico e investigador brasileño que el 14 de abril de 1909 diagnosticó la enfermedad en una persona por primera vez (16).



Figura 3. De izquierda a derecha: Imagen de una vinchuca adulta de la especie *Triatoma infestans*, *Triatoma dimidiata* y *Rhodnius prolixus* en la que se pueden observar sus seis patas, par de antenas y alas. Extraído de: (13, 17, 18).

3.1. Epidemiología

La ECh representa, junto a las geohelmintiasis, la enfermedad desatendida con mayor cantidad de años de vida saludable perdidos por discapacidad en América Latina (19). El área endémica comprende 21 países de América Latina continental y se extiende desde el sur de los Estados Unidos de América hasta el sur de la Argentina y Chile. Según datos de la Organización Mundial de la Salud, se estima que entre 6 y 7 millones de personas en todo el mundo están infectadas con *T. cruzi*, lo que provoca aproximadamente 12.000 muertes al año, mientras que alrededor de 75 millones de personas se consideran actualmente en riesgo de infección (16,20).

Por otro lado, la globalización ha fomentado los flujos migratorios convirtiéndolo a la ECh en un problema de salud mundial debido a la movilidad de la población desde países endémicos de América Latina hacia regiones no endémicas como Europa, Estados Unidos, Canadá, Japón, y Australia (**Figura 4**) (21,22). La mayoría de los migrantes en Europa se concentran en España, Italia, Francia, Reino Unido y Suiza, donde los estudios de seroprevalencia indican que un 4,2% de los inmigrantes latinoamericanos portan la infección (21). En América del Norte, se estima que en 2011 había unas 300.000 personas afectadas en Estados Unidos y alrededor de 6.000 en Canadá (23,24). En Asia y Oceanía, Australia ha registrado más de 3.000 casos entre habitantes procedentes de América Latina, y Japón ha reportado 1.510 casos de infección por *T. cruzi* (24).

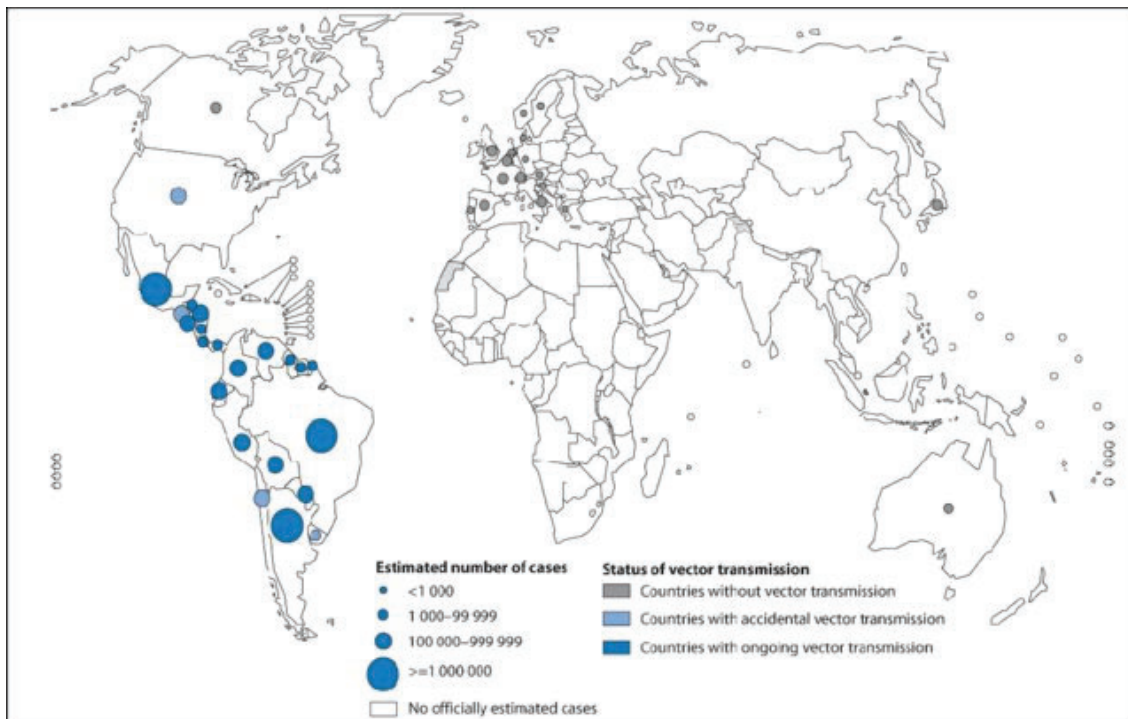


Figura 4. Distribución mundial de los casos de ECh. Extraído de: (25).

En Argentina, se estima que alrededor de 7 millones de personas están en riesgo de contraer la ECh, de las cuales aproximadamente 1.5 millones ya se encuentran infectadas. De estas, entre 350.000 y 500.000 han desarrollado cardiopatías como consecuencia de la progresión de la enfermedad (26, 27).

Las zonas cercanas al Gran Chaco presentan un mayor riesgo de Chagas debido a su proximidad geográfica y la migración fronteriza. Por otro lado, aunque la Patagonia está libre de Chagas, provincias como Santa Cruz, Río Negro, Tierra del Fuego, Chubut y Neuquén presentan riesgos potenciales debido a las migraciones (28).

Según el Ministerio de Salud de la Nación, actualmente el vector se encuentra en 10 provincias argentinas: Catamarca, Chaco, Córdoba, Formosa, Jujuy, La Rioja, Mendoza, Salta, San Juan y Santiago del Estero (**Figura 5**). Por otro lado, se ha certificado la interrupción de la transmisión vectorial de la enfermedad de Chagas en las provincias de Corrientes, Entre Ríos, La Pampa, Misiones, Neuquén, Río Negro, Santa Fe, San Luis y Tucumán (29).

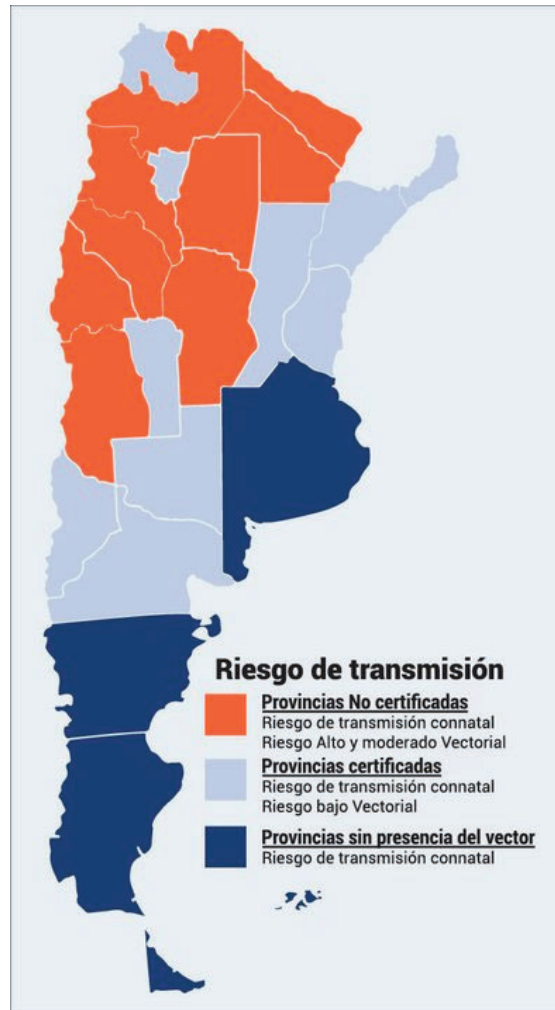


Figura 5. Distribución geográfica de riesgo de transmisión de la ECh en Argentina. Fuente: (30).

3.2. Aspectos clínicos de la ECh: fases de la infección

La Enfermedad de Chagas tiene dos fases clínicas principales: una fase aguda, seguida de una fase asintomática o indeterminada, y finalmente una fase crónica sintomática. Cada fase presenta características y manifestaciones específicas, lo cual determina el método de diagnóstico adecuado para cada una.

3.2.1. Fase aguda

La fase aguda comienza con el ingreso del parásito al hospedador, teniendo una duración de entre 4 a 8 semanas. Se caracteriza por una parasitemia elevada que va disminuyendo con el transcurso de la infección. En esta etapa pueden presentarse síntomas clínicos relativamente inespecíficos como fiebre, dolor de cabeza, agrandamiento de ganglios linfáticos, dolor

muscular o dificultad para respirar (31,32). Además se puede presentar inflamación y lesiones cutáneas en el sitio de inoculación (chagoma) y la aparición del complejo oftalmoganglionar (signo de Romaña) cuando el parásito ingresa al organismo a través de una herida cerca del ojo (**Figura 6**) (33).

Esta fase afecta del 1 al 5% de los pacientes y se caracteriza principalmente por manifestaciones como miocarditis chagásica aguda, derrame pericárdico o meningoencefalitis, condiciones que presentan un bajo riesgo de mortalidad, estimado entre el 0,2 y el 0,5% (34).



Figura 6. Síntomas clínicos de la fase aguda de la ECh. **A:** Complejo oftalmoganglionar (signo de Romaña), **B:** Placas inflamatorias en la región del muslo y gemelo y **C:** Chagoma localizado en el brazo (círculo). Extraído de: (35, 36, 37).

3.2.2. Fase asintomática

De no ser tratado a tiempo el paciente evoluciona hacia la fase crónica donde suelen permanecer en una forma clínica indeterminada, que es asintomática por varios años y representa un excelente ejemplo de equilibrio entre el parásito y su hospedador (38).

3.2.3. Fase crónica

Muchos pacientes con infección crónica de Chagas permanecen asintomáticos durante toda su vida; sin embargo, entre el 30 y 40% de ellos desarrollan, tras varios años o incluso décadas, patologías características de la ECh, lo que marca el inicio de la fase sintomática. Los órganos más afectados son el corazón y el intestino, dando lugar a cardiomegalia, megaesófago y megacolon (**Figura 7**). También se han registrado casos de agrandamiento de intestino, uretra y vejiga y afecciones del sistema nervioso central con meningoencefalitis (34).

En nuestro país, la afección predominante es la cardíaca, que impacta al 30% de los casos. Esta condición puede llevar a bloqueos auriculoventriculares, bloqueos intraventriculares, bradicardia sinusal y contracciones ventriculares prematuras, lo que incrementa el riesgo de muerte súbita (33). En etapas avanzadas, algunos pacientes desarrollan arritmias cada vez más graves, progresando hacia insuficiencia cardíaca y, eventualmente, su muerte (39).



A. Megaesófago

B. Megacolon

C. Cardiomegalia

Figura 7. Síntomas clínicos de la fase crónica de la ECh. **A:** Radiografía de tórax en la que se observa una masa mediastinal que se extiende hacia la derecha, posterior al mediastino, debido a una dilatación anormal del esófago. **B:** Radiografía abdominal en la que se observa una dilatación anormal del colon, visible como una expansión de la zona intestinal. **C:** Radiografía de tórax con un índice cardior torácico de 0,52, indicando que el diámetro del corazón ocupa el 52% del ancho total del tórax, lo que sugiere un agrandamiento moderado del lado izquierdo. Extraído de: (40, 41).

3.3. Diagnóstico

En la actualidad existen diversas técnicas (parasitológicas, serológicas y moleculares) para el diagnóstico de la ECh, en donde la utilización de cada método depende de la etapa de la infección y la carga parasitaria. Es recomendable combinar estas pruebas, aplicando dos ensayos con principios diferentes para que el diagnóstico sea certero en un 95% o tres ensayos para que lo sea en un 98% (42).

El diagnóstico de la infección en etapa aguda se basa principalmente en métodos de detección directa del parásito en sangre mediante microscopía en técnicas de hemocultivo, strout, microhematocrito y xenodiagnóstico. Por otro lado, los métodos de detección de sus componentes moleculares resultan los de mejor performance diagnóstica. Estas técnicas, basadas en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), son altamente sensibles y específicas. Sin embargo, su implementación requiere personal especializado y bien capacitado, así como una infraestructura adecuada, que a menudo no está disponible en centros de salud de zonas endémicas. Todo esto, junto con los altos costos asociados, dificulta la transición de las técnicas de detección molecular de un ámbito experimental a su

uso clínico masivo (43). Frente a esta problemática surgen los métodos moleculares *point of care* (POC), estos permiten llevar a cabo el diagnóstico directamente en el lugar donde se encuentra el paciente, como clínicas, hospitales rurales o en áreas con recursos limitados, sin necesidad de enviar las muestras a laboratorios especializados. Además, están diseñados para ser rápidos, fáciles de usar y requerir mínimos insumos técnicos. Un ejemplo de ello es la técnica LAMP (*Loop-mediated Isothermal Amplification*), desarrollada para detectar el ADN de *T. cruzi* en muestras de sangre del paciente. Esta técnica amplifica la secuencia satélite altamente repetitiva del parásito y se realiza en microtubos con reactivos secos dentro de las tapas. La reacción ocurre a una temperatura constante, lo que elimina la necesidad de equipos costosos como la termocicladora. La detección de los productos amplificados se realiza de manera directa y visual utilizando calceína (44, 45).

En la etapa crónica, el serodiagnóstico es hasta el momento el método de diagnóstico por excelencia debido a que, los pacientes experimentan seroconversión producto de una fuerte respuesta inmune adaptativa generando altos títulos de anticuerpos específicos contra antígenos del parásito (46). Los mismos, pueden ser detectados por técnicas como el ensayo inmunoenzimático (ELISA), la hemaglutinación indirecta (IHA) y la inmunofluorescencia indirecta (IFA) (47).

3.4. Tratamiento

El tratamiento se basa en un enfoque etiológico, y actualmente solo existen dos medicamentos aprobados para este fin: benznidazol y nifurtimox. Ambas tienen efecto tripanocida, y resultan muy efectivas en pacientes en fase aguda o recién nacidos con infección congénita. En pacientes cursando la fase crónica de la enfermedad, sin embargo, estas drogas sólo tienen eficacia parcial y, además, pueden generar serios efectos colaterales como hipersensibilidad, dermatitis, fiebre, dolor muscular y neuropatías periféricas en tratamientos prolongados. Esto resulta en la interrupción prematura del tratamiento en el 10-20% de los casos (48, 49). Hay que mencionar, además, que ninguna de ellas ha sido aprobada para su administración en mujeres embarazadas ya que se desconocen sus posibles efectos teratogénicos (50).

3.5. Vías de transmisión

Existen diferentes vías de transmisión de la infección por *T. cruzi* siendo la principal la transmisión vectorial (descrita en la sección 3.0). Esta vía se distribuye a lo largo del continente Americano, con una incidencia concentrada principalmente en zonas rurales.

Esto se debe a su capacidad para adaptarse a viviendas precarias, construidas con materiales rudimentarios que proporcionan un nicho ecológico (paredes agrietadas y techos de paja) ideal para los vectores (51). En los últimos años, el perfil de transmisión ha cambiado debido a que el control vectorial ha interrumpido la transmisión por triatomíneos en áreas domiciliarias, lo que ha dado mayor relevancia a otras vías de transmisión, como la transfusional, por trasplante de órganos, oral, accidentes de laboratorio y congénita (4, 51).

La transmisión transfusional ocurre cuando un paciente recibe sangre con tripomastigotes circulantes de *T. cruzi* provenientes de un donante infectado, y depende del cribado realizado en los bancos de sangre del país en el que se efectúa la transfusión (52). Durante un trasplante de órganos, los nidos de amastigotes contenidos en el tejido del donante infectado pueden evolucionar a tripomastigotes en los pacientes receptores inmunosuprimidos (53). En la vía oral, los tripomastigotes metacíclicos pueden sobrevivir durante largos periodos en jugos de frutas o leche, y así infectar a un huésped vertebrado que consuma estos alimentos (54, 55). Es posible que ocurran accidentes en el laboratorio durante la manipulación de cultivos de tripomastigotes, triatomíneos o material biológico, lo cual puede llevar a la contaminación del operador (56).

4. Transmisión Congénita

En ausencia de tratamiento, las mujeres infectadas por *T. cruzi* pueden transmitir la infección a su descendencia durante su edad fértil, lo que resulta en la infección del feto generando Chagas congénito (EChc). La transmisión puede ocurrir si la madre infectada se encuentra en fase aguda o crónica (la mayoría se encuentra en fase crónica) y puede ocurrir por vía transplacentaria o transmembranaria (57,58,59).

4.1. Enfermedad de Chagas congénito (EChc)

Esta se define por la detección del parásito en la sangre del cordón umbilical, o en la sangre periférica, al momento del nacimiento, en sus primeras semanas de vida o frente a la detección de anticuerpos anti-*T. cruzi* luego de ocho meses de su nacimiento (en un contexto en el que no se haya podido infectar por vía vectorial o transfusional (57, 58, 59, 60).

4.2. Epidemiología

La transmisión congénita puede repetirse en cada embarazo, fenómeno conocido como agrupamiento familiar de la transmisión vertical, por lo cual existen mujeres infectadas que

transmiten la infección a todos o la mayoría de su descendencia y otras que no lo hacen (61). Además existe el riesgo de mantener los ciclos de transmisión vertical (madre-hijo) a través de generaciones sucesivas, ya que, si estas nuevas generaciones también son mujeres y tienen hijos, podrían continuar transmitiendo la infección, manteniendo así la enfermedad activa tanto en áreas endémicas como no endémicas (62). Debido a esto, el control de esta vía es una prioridad en salud pública mundial. Es la ruta de transmisión más frecuente, tanto en regiones endémicas, debido al éxito en el control vectorial y de bancos de sangre, como en países no endémicos, debido a los movimientos migratorios (63). Se estima que a nivel mundial más de dos millones de mujeres en edad reproductiva están afectadas por la infección por *T. cruzi*, y entre el 3 y el 11% de los bebés de madres infectadas nacen con ECh generando unos 15.000 casos nuevos cada año (64). En nuestro país, la seroprevalencia en embarazadas es de alrededor del 6% en regiones endémicas y el riesgo de transmisión congénita del 7% al 11% (65). Dado que un alto porcentaje de los casos congénitos son asintomáticos, la prevención y el control requieren el tamizaje de los niños y de mujeres en edad reproductiva y su tratamiento.

4.3. Aspectos clínicos

Los recién nacidos con enfermedad de Chagas no presentan un cuadro clínico definido pero se han observado diversos signos, entre ellos: prematuridad y bajo peso al nacer, hipotonía muscular, hepatomegalia, esplenomegalia, alteraciones cardíacas y meningoencefálicas, hemorragias cutáneas, edema generalizado, megaesófago y megacolon (66, 67).

Por otro lado, se observa un porcentaje considerable de neonatos completamente asintomáticos, que puede variar entre el 31 % y el 72 % (68, 69). Este aspecto vuelve trascendental emplear un método de diagnóstico que no se base en los aspectos clínicos, para evaluar a todo niño nacido de una madre seropositiva con el fin de la detección temprana para poder brindar el tratamiento correspondiente (70).

4.4. Diagnóstico

El diagnóstico de EChc se fundamenta en tres estrategias: la detección parasitológica directa, el diagnóstico serológico y el diagnóstico molecular (**Figura 8**).

Para la detección parasitológica en el recién nacido, se recomienda emplear el micrométodo en tubo capilar como prueba para concentrar los parásitos (71, 72). Este método consiste en recolectar una pequeña muestra de sangre (de cordón umbilical, capilar o venosa) en un tubo capilar, que luego se centrifuga para separar sus componentes. Posteriormente, se examina

el tubo bajo el microscopio para buscar parásitos en la capa de leucocitos (*buffy coat*) o en el plasma. Un resultado negativo al momento del nacimiento no descarta una infección congénita; es recomendable que la prueba vuelva a realizarse alrededor de los 30 días de vida, ya que la parasitemia puede ser baja al nacer o haberse producido la infección durante el parto (72). Es de bajo costo, rápido y requiere solo un volumen mínimo de sangre, por lo que resulta especialmente útil en poblaciones neonatales o en áreas con recursos limitados.

El diagnóstico serológico se basa en la detección de anticuerpos IgG anti-*T. cruzi* después de los 10 meses de vida. Esta prueba no se lleva a cabo en el recién nacido debido a la transmisión pasiva de anticuerpos de la madre al feto (73). De esta manera, un resultado positivo confirma el diagnóstico de infección por *T. cruzi* ya que su presencia indica que el sistema inmunológico del niño fue estimulado por el parásito (71).

Para el diagnóstico molecular, en la actualidad en algunos países, entre ellos la Argentina, se emplea la PCR en tiempo real como alternativa sensible para el diagnóstico temprano especialmente en casos con baja parasitemia o resultados dudosos de los métodos directos. Este método complementa las estrategias mencionadas, ofreciendo mayor sensibilidad y especificidad. Un resultado detectable es indicativo de diagnóstico de infección y por lo tanto mandatorio de dar tratamiento etiológico (74).

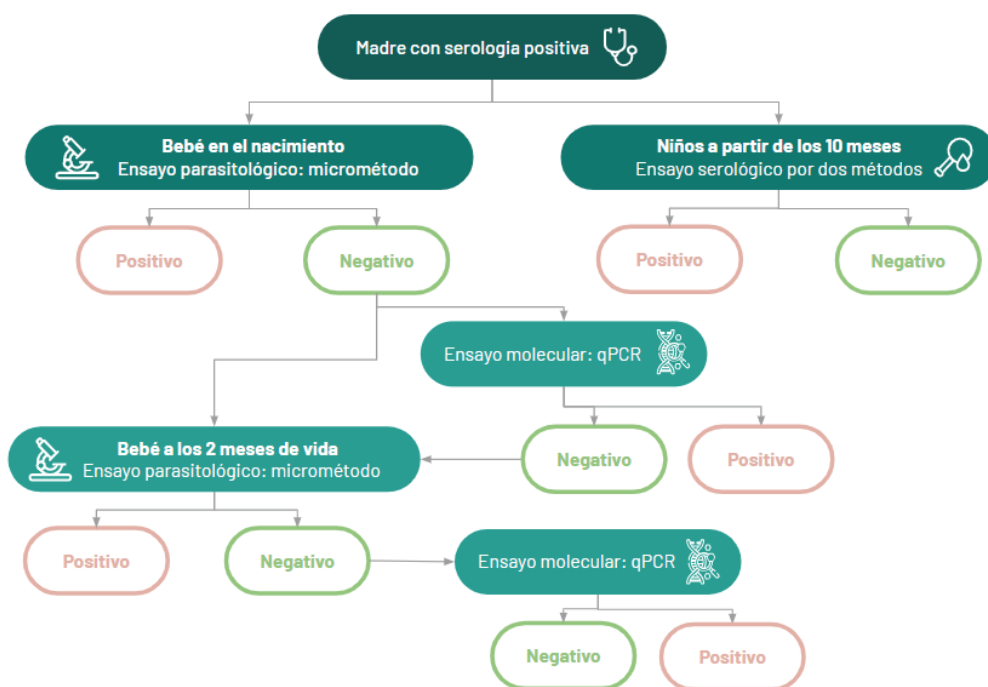


Figura 8. Algoritmo para el diagnóstico de Chagas congénito.

4.5. Tratamiento

Como se explicó en la sección 1.8, los dos medicamentos disponibles para el tratamiento de la enfermedad de Chagas son el benznidazol y el nifurtimox. Actualmente, existen formulaciones pediátricas de nifurtimox diseñadas específicamente para infantes y niños pequeños. Estas formulaciones están adaptadas para garantizar seguridad, eficacia y facilidad de uso, ajustándose a las necesidades particulares de los pacientes pediátricos. Por ejemplo, para aquellos que no pueden tragar comprimidos, la presentación pediátrica de nifurtimox incluye comprimidos de 30 mg y 120 mg que son divisibles y dispersables, facilitando su administración. Mientras que, para los recién nacidos se administran triturando los comprimidos y disolviéndose en agua o leche para facilitar su ingesta. (75).

Estas formulaciones pediátricas están indicadas en pacientes, desde su nacimiento hasta los 18 años, siempre que tengan un peso mínimo de 2,5 kg. Su administración se realiza durante un período de 60 días, con un régimen ajustado según la edad y el peso del paciente, asegurando así una dosificación adecuada y segura para cada etapa de su desarrollo. El seguimiento realizado durante 4 años ha demostrado la eficacia y seguridad de este régimen terapéutico, sin que se hayan registrado eventos adversos asociados directamente al tratamiento (75).

El tiempo entre el diagnóstico y el inicio del tratamiento es fundamental, ya que se ha observado una seronegatividad cercana al 100% luego de 12 meses en los niños tratados al nacimiento, mientras que este porcentaje disminuye si el tratamiento se inicia en niños de mayor edad (57, 68).

4.6. Factores parasitarios y placentarios

La infección materno-fetal surge de una interacción compleja entre características del parásito y factores placentarios (76). Se ha observado una correlación positiva entre la carga parasitaria materna durante el embarazo y el riesgo de transmisión (77, 78, 79, 80).

La cepa de *T. cruzi* también cumple un rol en la respuesta placentaria a la infección. Excepto por TcIV, todas las demás UDTs se han asociado con casos de infección congénita. En particular, TcV se ha identificado en el 80-100% de los casos congénitos en Argentina, Bolivia, sur de Brasil, Chile y Paraguay. La prevalencia de UDTs específicos en casos congénitos parece estar en concordancia con su presencia en la población infectada (81). Esto se pudo observar en estudios donde demostraron que los bebés infectados portaban las mismas cepas que prevalecían en las regiones geográficas donde sus madres fueron infectadas (65, 76). Sin

embargo, las poblaciones naturales de *T. cruzi* son policlonales; los pacientes pueden estar infectados por cepas pertenecientes a UDTs distintos o a una misma, pero con tropismos diferentes (64). Diferentes clones de *T. cruzi* exhiben variabilidad en su tropismo tisular y virulencia (82, 83), y ciertas variantes genéticas se han asociado con la transmisión congénita de la enfermedad de Chagas (84, 85). Además, se ha descrito el tropismo tisular de diferentes cepas de *T. cruzi* hacia la placenta en modelo murino. Por ejemplo, la cepa Colombiana (TcI) presenta una alta incidencia de parasitismo placentario (98%), mientras que la cepa Y (TcII) infecta solo el 17% de las placentas (86). Asimismo, se identificaron diferencias en la respuesta del microambiente placentario tras la infección crónica con las cepas K98 y VD (esta última aislada de un caso congénito), que pertenecen a diferentes UDTs y presentan tropismo placentario diferencial en ratones (87). Por otro lado, en un ensayo donde se realizaron infecciones en explantes *ex vivo* de vellosidades coriónicas con la cepa VD, se observó mayor carga parasitaria en tejido placentario, en relación a una cepa no congénita (88). Por otro lado, madres que han transmitido la infección a uno de sus hijos tienen mayor riesgo de volver a transmitirla en una segunda oportunidad, además se han reportado casos de Chagas congénito de segunda generación en madres nacidas en zonas no endémicas, o expuestas a ninguna otra vía posible de infección (51). Estas observaciones llevan a proponer la existencia de factores genéticos del hospedador involucrados en la transmisión congénita.

5. La placenta humana

Para comprender la transmisión transplacentaria, es esencial definir las funciones, estructura y clasificación de la placenta humana, que constituye la principal barrera entre los compartimentos materno y fetal a lo largo del embarazo.

5.1. Funciones de la placenta humana

La placenta es un órgano transitorio que se forma durante el embarazo, conecta al feto con la madre y cumple numerosas funciones indispensables para la sobrevivencia del feto, entre las cuales se encuentran (89):

Transporte de sustancias: A través de la placenta, el feto recibe oxígeno, glucosa, aminoácidos y hierro, provenientes de la sangre materna. A su vez, la placenta transfiere a la sangre materna los materiales de desecho fetal, como dióxido de carbono, urea y amoníaco.

Transporte de anticuerpos: La IgG atraviesa la placenta para brindar inmunidad pasiva al feto, manteniéndolo protegido mientras su sistema inmunológico aún no está maduro.

Endocrina: A nivel endocrino, la placenta produce dos tipos de hormonas: las polipeptídicas,

como la gonadotropina coriónica humana (HCG) y el lactógeno placentario humano (HPL), y las esteroideas, como los estrógenos y la progesterona. Estas hormonas ayudan al desarrollo del feto, preparan el cuerpo materno para el parto y la lactancia, y mantienen un ambiente uterino saludable durante todo el embarazo.

Barrera placentaria: Actúa como una barrera que protege al feto de células maternas y patógenos, aunque en algunos casos, como en la transmisión de *T. cruzi*, uno de los mecanismos es por la invasión del parásito al epitelio trofoblástico, seguido de su proliferación hasta llegar a los capilares fetales y producir la infección.

5.2. Estructura de la placenta humana

En el tercer trimestre, la placenta está compuesta por dos partes principales: la placa coriónica, que constituye el componente fetal, y la placa decidual o placa basal, que es el componente materno. Entre ambas placas se encuentra el espacio intervelloso, una cavidad llena de sangre materna (**Figura 9**). Al analizar los componentes de cada placa, observamos que la placa coriónica se compone de varias capas: el amnios, el mesodermo extraembrionario, el citotrofoblasto y el sincitiotrofoblasto, este último en contacto directo con la sangre materna. Por su parte, la placa basal está formada por el sincitiotrofoblasto, citotrofoblasto de la coraza y decidua basal, que proviene del tejido materno y contribuye al anclaje y la función de la placenta (89).

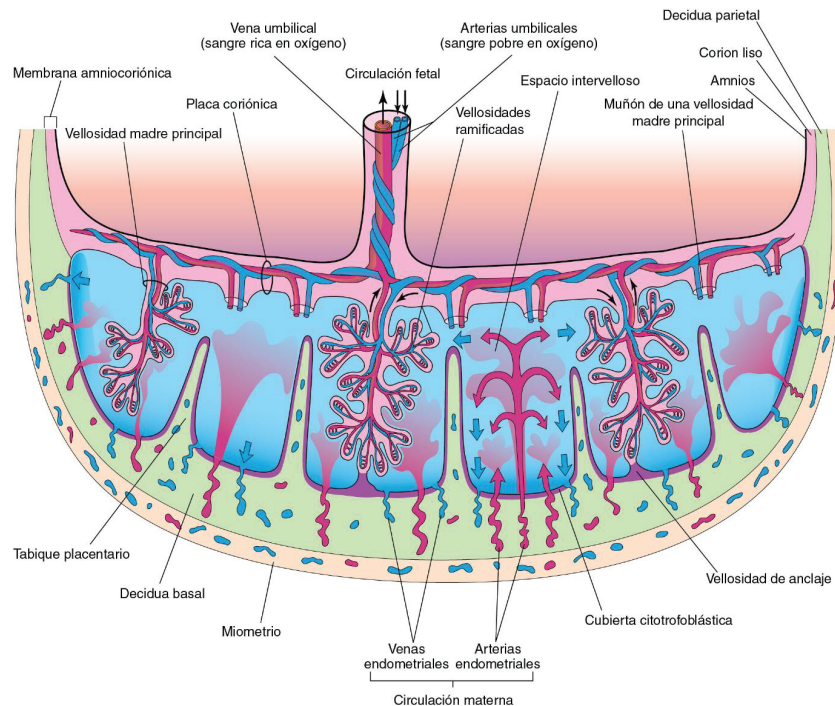


Figura 9: Representación esquemática de una sección transversal a través de una placenta, con

demostración de: 1) la relación entre el corion veloso (parte fetal de la placenta) y la decidua basal (parte materna de la placenta); 2) la circulación placentaria fetal, y 3) la circulación placentaria materna. Se puede observar que las arterias umbilicales transportan sangre fetal escasamente oxigenada (en azul en la ilustración) hasta la placenta y que la vena umbilical transporta sangre oxigenada (en rojo en la ilustración) hacia el feto. Cada cotiledón lo constituyen dos o más vellosidades madre principales y numerosas vellosidades ramificadas. Fuente: (89).

El trofoblasto es una capa de células que rodea al embrión en sus primeras etapas de desarrollo, desde la fertilización hasta la formación de la placenta. Desempeña un papel crucial en la implantación del embrión en el útero materno, protección del embrión y en la creación de la placenta (90). A través de sus capas, el citotrofoblasto y el sincitiotrofoblasto, el trofoblasto compone las vellosidades coriónicas, estructuras clave que permiten el intercambio materno-fetal (90, 91). El citotrofoblasto está conformado por células mononucleadas que forman la capa interna del trofoblasto, tienen la capacidad de dividirse y diferenciarse, generando otros tipos celulares necesarios para el desarrollo placentario. Además, actúan como una barrera adicional que limita el paso de patógenos hacia las capas internas de las vellosidades coriónicas, contribuyendo a la protección del feto (**Figura 10 - B**). Por otro lado, el sincitiotrofoblasto constituye la capa externa del trofoblasto y está formado por la fusión de células del citotrofoblasto, lo que genera células multinucleadas. Estas células invaden el tejido materno y facilitan el intercambio de nutrientes entre la madre y el embrión. El sincitiotrofoblasto también es el responsable de la producción de hormonas esenciales durante el embarazo. Por su parte, los trofoblastos extravelosos, que derivan del trofoblasto, son los encargados de anclar el embrión a la pared uterina. Como componentes de la capa externa de las vellosidades coriónicas, ambos tipos de trofoblasto están en contacto directo con la sangre materna y funcionan como una barrera física y funcional (**Figura 10 - B**) (89, 90, 91, 92).

Las vellosidades coriónicas constituyen las unidades funcionales principales de la placenta, están inmersas en la sangre materna dentro de los espacios intervillosos y contienen en su interior vasos sanguíneos fetales, lo que permite que en ellas ocurra el intercambio de nutrientes y gases entre la madre y el feto (**Figura 10 - A**) (89, 90). Se dividen en dos tipos según su función y ubicación, vellosidades de anclaje y flotantes. Las de anclaje establecen una conexión entre tejido fetal y materno, dado que se encuentran firmemente unidas a la decidua basal asegurando la fijación de la placenta a la pared uterina. Por otro lado, permiten que los trofoblastos extravelosos (células trofoblásticas muy invasivas derivadas del citotrofoblasto) migren hacia la decidua materna invadiendo el tejido materno. Donde remodelan las arterias espirales uterinas (vasos sanguíneos en el endometrio) para asegurar un suministro adecuado de sangre a la placenta, lo cual garantiza el flujo necesario de nutrientes y oxígeno hacia el feto. Mientras que, las flotantes surgen de las vellosidades de

anclaje y se proyectan hacia el espacio intervelloso, donde están rodeadas por la sangre materna. Constan de una capa interna de citotrofbastos recubierta por una capa externa de sincitiotrofbastos. En su parte fetal, están conectadas a la placa coriónica formando una conexión entre la madre y el feto para el intercambio materno-fetal (89, 90).

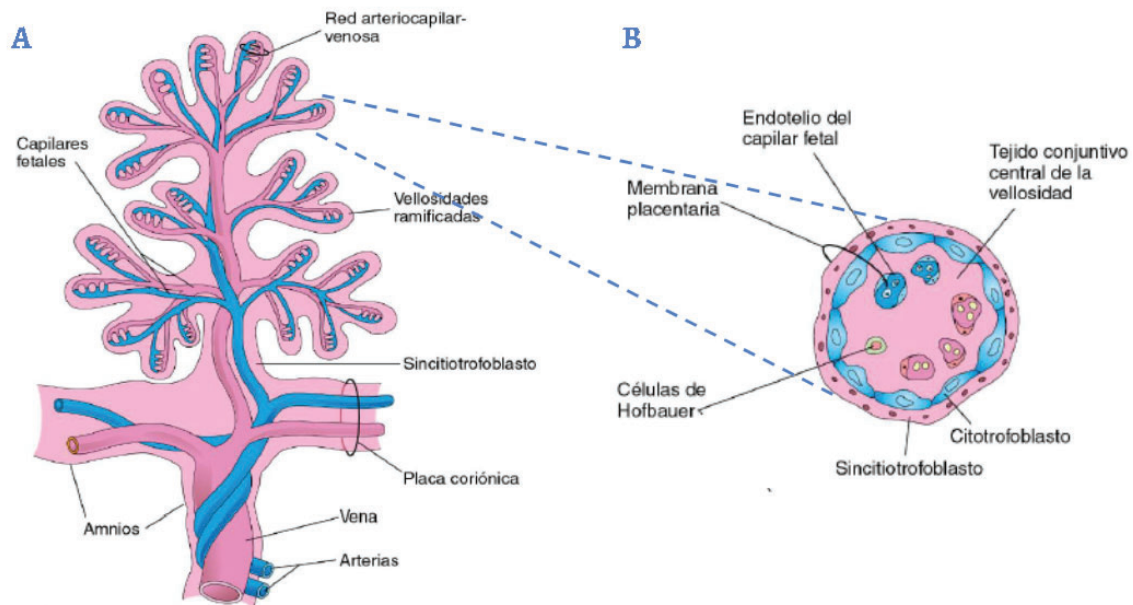


Figura 10. A: Esquema correspondiente a una vellosidad coriónica. Las arterias transportan sangre fetal escasamente oxigenada y productos de desecho procedentes del feto, mientras que la vena transporta sangre oxigenada y nutrientes para el feto. **B:** Esquema correspondiente a sección transversal de vellosidad coriónica en donde podemos apreciar la membrana placentaria, constituida por citotrofblasto y sincitiotrofblasto, que separa la sangre materna en el espacio intervelloso de la sangre fetal en los capilares de las vellosidades. Extraída de: (89).

5.3. Clasificación de la placenta humana

La placenta humana puede clasificarse de dos maneras: una según su apariencia morfológica y otra en función de su estructura histológica (93, 94).

La clasificación morfológica de la placenta determina si el contacto materno-fetal ocurre en toda la superficie del saco coriónico o se concentra en áreas específicas. Así, existen cuatro tipos: en la placenta difusa, las vellosidades cubren todo el corion (caballos); en la cotiledónea, se agrupan en zonas pequeñas (ovejas, vacas); en la zonal, se distribuyen en una franja específica (perros); y en la discoidal o bidiscoide, se concentran en un área circular u ovalada (humanos, ratones y ratas) (**Figura 11**) (93, 95, 96).

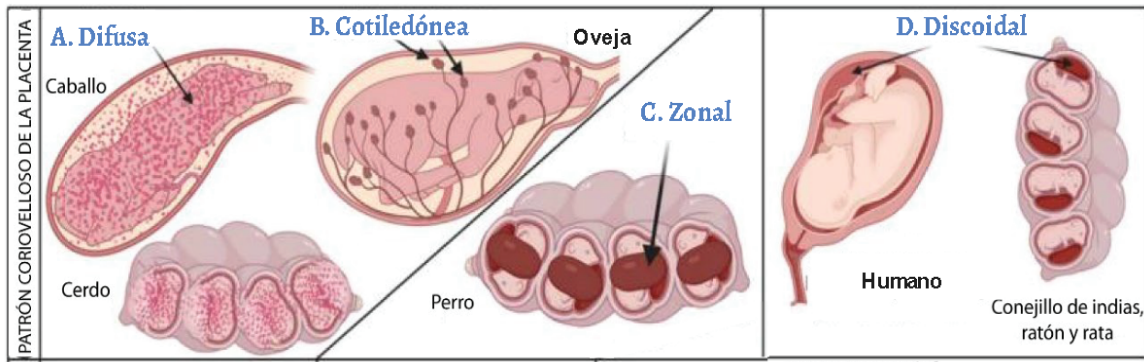


Figura 11. Clasificación morfológica de la placenta. A: Placenta difusa en caballos, B: Placenta cotiledónea en ovejas, C: Placenta zonal en perros y D: Placenta discooidal en humanos, ratón y rata. Adaptado de: (96).

Por otro lado, la clasificación histológica de la placenta se basa en la relación entre el corion y la pared uterina, describiendo qué tan íntimo es el contacto entre la sangre materna y la fetal, por lo que resulta más adecuada para describir la función placentaria. En esta clasificación, se distinguen tres tipos principales: **epiteliocorial**, donde el corion fetal, cubierto de trofoblasto, se adhiere a una mucosa uterina sin invasión (caballos); **endoteliocorial**, en la que el trofoblasto entra en contacto directo con el endotelio materno (perros); y **hemocorial**, donde la superficie coriónica queda expuesta a la sangre materna. En humanos, una capa de trofoblasto (**hemomonocorial**) separa la sangre materna de la fetal, mientras que en ratones y ratas hay tres capas (**hemotricorial**) (Figura 12) (94, 95, 96).

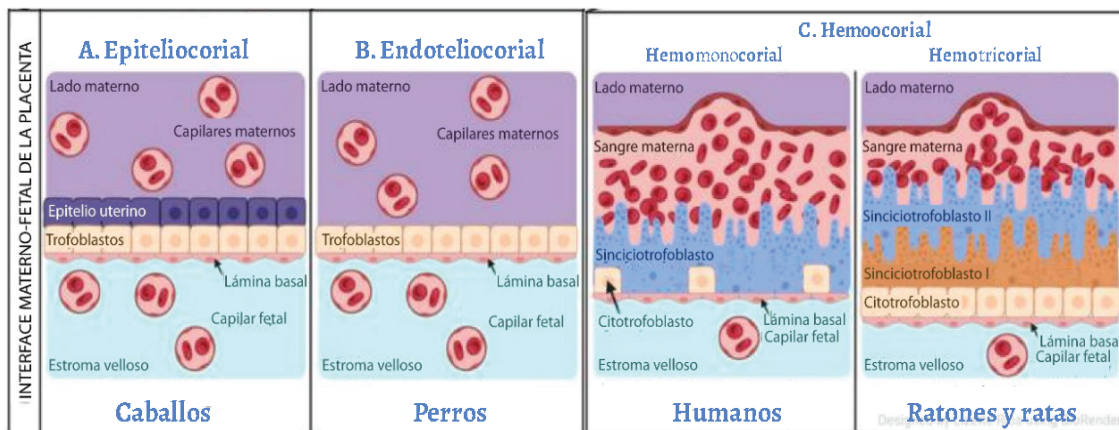


Figura 12. Clasificación histológica de la placenta. A: Placenta epiteliocorial. Trofoblastos del lado fetal están en contacto directo con el epitelio uterino del lado materno, actuando como una barrera entre ambos compartimentos. B: Placenta endoteliocorial. Trofoblastos del lado fetal están en contacto directo con el endotelio de los vasos sanguíneos maternos. C: Placenta hemocorial. Las vellosidades coriónicas quedan expuestas directamente a la sangre materna. Subdivisión en **Hemomonocorial**: una capa de trofoblasto separa a la sangre materna y **Hemotricorial**: tres capas. Adaptado de: (96).

6. Transmisión Transplacentaria

La transmisión transplacentaria de *T. cruzi* causa EChc en el 4-8% de los hijos de mujeres con EC crónica, e incluso si no se produce EChc, el resultado del embarazo puede mostrar un mayor riesgo de parto prematuro, bajo peso al nacer y muerte fetal (97, 98).

6.1. Hipótesis de transmisión transplacentaria

La transmisión transplacentaria es considerada la vía principal de pasaje de parásitos de sangre materna al embrión y existen tres hipótesis al respecto (**Figura 13**):

- A. Se cree que la principal vía implica la invasión del parásito al tejido trofoblástico (primera línea de defensa placentaria) y su multiplicación para atravesar el tejido mesenquimático rodeado por vesículas fetales (segunda línea de defensa placentaria), hasta acceder a dichas vesículas (64, 76). En gran parte, sólo el sincitiotrofoblasto se interpone entre la sangre materna y los tejidos fetales, previniendo la penetración intercelular (barrera estructural). Se ha observado que *T. cruzi* replica en trofoblastos de placentas de madres con altas cargas parasitarias (99). Sin embargo, esto no es frecuente en placentas de madres con infección crónica que han dado a luz neonatos infectados, ya que no se suelen encontrar parásitos en el trofoblasto vellosos (100).
- B. Otro mecanismo propuesto es la invasión de áreas de la placenta desprovistas de trofoblastos, tales como la zona marginal que une las membranas a las placas coriónica y basal, constituida por células de músculo liso recubiertas únicamente de epitelio materno. Esta vía parece ser importante en la transmisión congénita en madres que presentan enfermedad crónica (64). *T. cruzi* puede infectar y replicarse fácilmente en este músculo y en células epiteliales, facilitando la invasión placentaria. Otra hipótesis de esta corriente es que la invasión se produce a través de la matriz fibrinoide acelular, que reemplaza progresivamente el sincitiotrofoblasto degenerado durante la gestación.
- C. También se ha propuesto que los parásitos llegan al líquido amniótico desde las células amnióticas después de replicarse en la placenta, infectando oralmente al feto. De hecho, la presencia de parásitos en la placa coriónica provoca una infección secundaria en la capa contigua de células amnióticas (63).

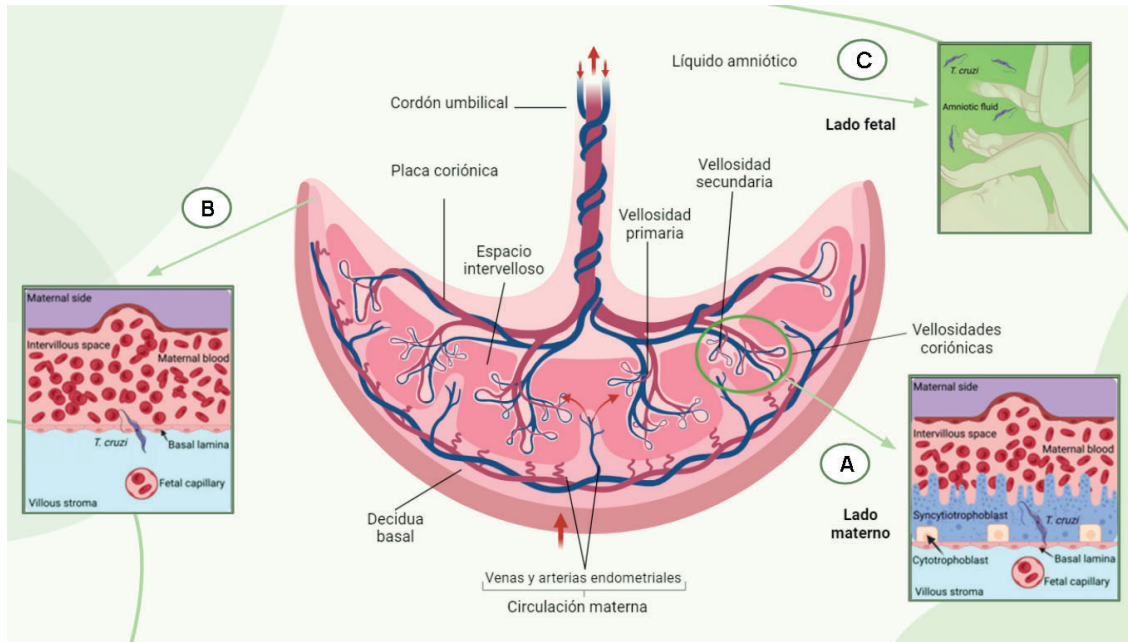


Figura 13. Hipótesis sobre la transmisión transplacentaria por *T. cruzi*. **A:** Invaden y se multiplican en el tejido trofoblástico, atravesando el tejido mesenquimático. **B:** Invaden áreas desprovistas de trofoblastos en la placenta, como la zona marginal entre las membranas coriónica y basal, donde se replica en células del músculo liso y epiteliales placentarias. **C:** Podrían llegar al líquido amniótico tras replicarse en la placenta y luego contaminar oralmente al feto. Adaptado de: (96).

6.2. Infección en el tejido trofoblástico

Para infectar al feto en desarrollo, los tripomastigotes de *T. cruzi* deben atravesar el trofoblasto, el primer tejido fetal que forma la barrera placentaria. Este epitelio está compuesto por una capa de citotrofoblastos vellosos mononucleares, ubicados debajo del sincitiotrofoblasto, en contacto directo con la sangre materna. A partir de la semana 20 de gestación, las células del citotrofoblasto disminuyen y los núcleos de los sincitiotrofoblastos se agrupan para formar nódulos. Esta reestructuración favorece el intercambio metabólico, ya que se generan áreas citoplasmáticas delgadas y desprovistas de núcleo, acercando los capilares fetales a los sincitiotrofoblastos y haciendo que la membrana placentaria se vuelva más delgada. En esta etapa, la invasión del parásito puede verse facilitada causando Chagas congénito. Se ha propuesto que los tripomastigotes del torrente sanguíneo materno, en el espacio intervilloso, infectan los sincitiotrofoblastos, citotrofoblastos y el tejido conectivo fetal del estroma vellosos, invadiendo diversos tipos celulares (64, 98).

7. Modelos para el estudio de la interacción parásito-hospedero

Existen diferentes modelos para el estudio de la interacción parásito-hospedero, que de alguna forma representan el ambiente placentario.

7.1. Modelos bidimensionales (2D)

Los modelos bidimensionales *in vitro*, como las líneas trofoblásticas humanas BeWo, se emplean con frecuencia como modelos hospedadores en estudios de transmisión e infección placentaria de *T. cruzi* (101, 102). Estas células presentan un crecimiento adherente, por lo que requieren una superficie adecuada para adherirse y proliferar. Además, poseen una baja tasa de fusión espontánea, la cual puede incrementarse empleando forskolina, un conocido inductor de la diferenciación del trofoblasto. Por lo tanto, el uso de células BeWo permite realizar estudios reproducibles que dan lugar a datos con significancia estadística. A pesar de sus ventajas, los cultivos 2D presentan limitaciones en representar adecuadamente la situación *in vivo*, ya que les falta la interacción con distintos tipos celulares y tisulares, así como el ambiente del tejido placentario (103, 104).

7.2. Tejido Placentario

Por otro lado, se ha utilizado el tejido placentario humano como modelo de estudio de la infección tisular *ex vivo* del parásito (99, 105, 106, 107). Este enfoque posee la ventaja de replicar condiciones similares a las que ocurren *in vivo*, es de fácil acceso dado que la placenta es expulsada del cuerpo materno tras el parto y no representa riesgos para la salud de la madre ni del recién nacido. En ensayos de infección con explantes de placenta humana, se han detectado alteraciones histopatológicas en diferentes compartimentos tisulares de las vellosidades coriónicas de intercambio, especialmente en el sincitiotrofoblasto, las láminas basales y la matriz extracelular del tejido conectivo fetal (99, 107).

7.3. Modelos tridimensionales (3D)

Los cultivos bidimensionales presentan limitaciones en reproducir adecuadamente las condiciones *in vivo* y el uso de tejido placentario humano presenta varias dificultades, entre ellas su disponibilidad limitada y las implicaciones éticas y legales, que requieren el consentimiento informado y el cumplimiento de diversas normativas. En este contexto los

cultivos de micro tejidos tridimensionales (3D), como los esferoides u organoides, emergen como un nuevo modelo *in vitro* prometedor. Esto se debe a que ofrecen una estrategia novedosa para modelos intermedios entre los cultivos bidimensionales y los modelos experimentales en animales, o los cultivos de explantes placentarios.

Los cultivos tridimensionales (3D) son fisiológicamente relevantes y una buena alternativa porque imitan la microarquitectura de los tejidos y pueden proporcionar un entorno similar al que se encuentra en las infecciones naturales (108). Entre las funciones biológicas de los cultivos 3D que se acercan a las de situaciones *in vivo* figuran la proliferación celular, la diferenciación, la morfogénesis y la expresión génica (108, 109, 110). El cultivo de esferoides de miocitos con tripomastigotes de *T. cruzi* ha demostrado ser un modelo preciso de fibrosis e hipertrofia que recrea adecuadamente la miocardiopatía chagásica crónica (111, 112). También, se exploró la infección de cultivos 3D formados por células HeLa con distintas cepas de *T. cruzi* asociando su patrón de migración con el comportamiento *in vivo* (113). Además, se ha desarrollado un micro tejido placentario 3D para recrear el entorno placentario humano y realizar pruebas de nanotoxicidad (104). En modelos 3D de infección transplacentaria por *T. cruzi* utilizando células del trofoblasto, se ha desarrollado un sistema de trofoblastos JEG-3, en combinación con células endoteliales microvasculares del cerebro humano, lo que permite investigar las respuestas celulares y la interacción entre estos tipos celulares en un entorno más representativo de la fisiología humana. Sin embargo, este modelo de esferoide fue refractario a la infección por *T. cruzi* (114).

Hipótesis y objetivos

Hipótesis

"Existen diferencias en el porcentaje de células infectadas, la carga parasitaria en tejido y el tiempo de diferenciación de estadio amastigote a tripomastigote, según la línea celular hospedadora, el sistema de cultivo (monocapa o 3D) y la cepa parasitaria empleada durante la infección"

Objetivos

El objetivo general de este trabajo consiste en desarrollar y aplicar modelos *in vitro* para la infección por *T. cruzi*, enfocados en la transmisión congénita, que permitan estudiar mecanismos de invasión y tropismo placentario. Para ello se proponen los siguientes objetivos específicos:

1. Capacitarse en técnicas de cultivo de líneas celulares trofoblásticas humanas en monocapa y de cepas de *T. cruzi* de distinto origen y en diferentes estadios.
 - a) Realizar controles de calidad periódicos de los cultivos empleados en los experimentos.
 - b) Diferenciar cultivos de epimastigotes a tripomastigotes, utilizando las líneas celulares Vero (<https://www.atcc.org/products/ccl-81>), HeLa (<https://www.atcc.org/products/crm-ccl-2>) y BeWo (<https://www.atcc.org/products/ccl-98>).
2. Comparar la infectividad de cepas de *T. cruzi* asociadas y no asociadas a casos de Chagas congénito en células BeWo, en relación con su infectividad en líneas celulares no placentarias (Vero y HeLa).
 - a) Realizar ensayos de infección en paralelo con distintas cepas y determinar, mediante microscopía, el porcentaje de células infectadas en cada caso.
3. Estandarizar métodos de PCR en tiempo real, para cuantificar la carga parasitaria en cepas pertenecientes a distintas unidades discretas de tipificación.
4. Capacitarse en técnicas de cultivo tridimensional de líneas celulares trofoblásticas humanas.
5. Caracterizar la infección en cultivos 3D de células BeWo y comparar los resultados con lo obtenido en cultivos en monocapa.
 - a) Caracterizar la infección por microscopía.
 - b) Realizar infecciones en esferoides con distintas cepas de *T. cruzi* y cuantificar por PCR cuantitativa en tiempo real la carga parasitaria de cada cepa.

Materiales y métodos

Medio de cultivo Eagle modificado de Dulbecco/mezcla de nutrientes F-12 (DMEM-F12) y medio esencial mínimo (MEM)

Se utilizaron dos medios de cultivo, Gibco™ Dulbecco's Modified Eagle Medium: Nutrient Mixture F12 (DMEM-F12) y Gibco™ Minimum Essential Medium (MEM) de Thermo Fisher Scientific. El contenido de los sobres de ambos medios de cultivo se vertieron en un Erlenmeyer y se añadió bicarbonato de sodio (NaHCO_3): 2,20 g para el MEM y 2,44 g para el DMEM-F12. Posteriormente, se agregó un litro de agua de grado dos (que contiene niveles reducidos de contaminantes orgánicos, inorgánicos y coloides). Para asegurarnos una completa homogeneización de la mezcla se empleó un buzo agitador magnético. El pH del medio se midió con un medidor de pH, manteniéndolo dentro del rango recomendado por el fabricante de 7 a 7,4, y se ajustó gota a gota utilizando soluciones concentradas de un ácido o una base según fuera necesario.

Las soluciones preparadas se filtraron dentro del flujo laminar utilizando un equipo de filtrado de 500 mL equipado con filtros de 0,1 μm de tamaño de poro, conectado a una bomba de vacío que permitió la circulación del medio a través del filtro. Los medios filtrados se colocaron en botellas de vidrio PYREX® previamente autoclavadas.

Los medios de cultivo celulares son específicos y con gran cantidad de componentes nutricionales, lo que los hace propensos a la contaminación. Por ello, la filtración previa de estos medios de cultivo constituye una etapa crucial; para estos fines, los filtros de membrana son utilizados para garantizar su esterilidad y asegurarnos que los cultivos celulares estén libres de microorganismos y otras impurezas.

El MEM y DMEM-F12 se almacenaron en heladera a 4 °C para su uso en cultivos celulares de células Bewo, HeLa y Vero.

Medio de infusión de hígado y triptona (LIT)

Para preparar 500 mL de medio LIT, utilizamos 0,50% p/v de infusión de hígado, 0,50% p/v de triptona, 0,40% p/v de cloruro de sodio (NaCl), 0,04% p/v de cloruro de potasio (KCl), 0,40% p/v de fosfato de disodio (Na_2HPO_4) y 0,20% p/v de glucosa ($\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$). Para la preparación, se disolvieron todos los reactivos en 450 mL de agua grado dos mediante agitación y se transfirió a una botella de vidrio PYREX® de 0,5 litros. Posteriormente, la solución se autoclavó y se completó con 50 mL de SFB, estreptopenicilina 1X y hemina 1X. El medio LIT se almacenó en heladera a 4 °C para su uso en cultivos de epimastigotes de *T.cruzi*.

Buffer fosfato salino (PBS)

El PBS es una solución de fosfatos y sales que mantienen el pH constante y generan un ambiente isotónico, por lo que es ampliamente utilizado en los cultivos celulares. Para preparar un litro de PBS 1X, se utilizaron 0,81% p/v de cloruro de sodio (NaCl), 0,022% p/v de cloruro de potasio (KCl), 0,12% p/v de fosfato de disodio (Na_2HPO_4) y 0,02% p/v de fosfato monopotásico (KH_2PO_4). La preparación se realizó en botellas de vidrio PYREX® de 1 litro con agua de grado dos, utilizando un agitador magnético para garantizar la completa disolución de las sales. El pH de la solución se ajustó en un rango de 7 a 7,4 mediante un medidor de pH y añadiendo gota a gota soluciones ácidas o básicas según fuera necesario. Finalmente, el PBS se esterilizó por autoclave y se almacenó en heladera a 4 °C para su uso en cultivos celulares.

Estreptomicina

La estreptomicina es un antibiótico de amplio espectro utilizado en los cultivos celulares. Para preparar 100 mL de una solución 100X, se utilizaron penicilina a una concentración de 10,000 U/mL y estreptomycin a 10 mg/mL. Para ello, se pesaron 0,602 g de penicilina y 1 g de estreptomycin. Luego, se disolvió dicha mezcla en Buffer de Fosfatos (PBS) y se filtró mediante una jeringa equipada con un filtro estéril de 0,22 μm de tamaño de poro. La estreptomicina se distribuyó en alícuotas de 15 mL y se almacenó a -20 °C para su almacenamiento a largo plazo.

Tripsina-EDTA

Se preparó tripsina-EDTA a partir de dos soluciones que se mezclaron en una proporción 1:1.

Tripsina: En un matraz limpio y estéril añadimos 200 mL de agua de grado dos. Luego agregamos los reactivos secos: 0,80% p/v de cloruro de sodio (NaCl), 0,04% p/v de cloruro de potasio (KCl), 0,01% p/v de fosfato disódico dodecahidratado ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$), 0,1% p/v de glucosa ($\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$), 0,3% p/v de Tris base ($\text{C}_4\text{H}_{11}\text{NO}_3$), 0,25% p/v de Tripsina. Para asegurarnos una completa homogeneización de la mezcla se empleó un bazo agitador magnético.

EDTA: En 500 mL de agua de grado dos utilizamos 0,04% p/v de EDTA.

Ambas soluciones se esterizaron filtrándolas mediante una jeringa equipada con un filtro estéril de 0,22 μm de tamaño de poro. Tras la filtración, se añadió un 0,006% p/v de penicilina ($\text{C}_{16}\text{H}_{18}\text{N}_2\text{O}_4\text{S}$) a la solución de tripsina. La mezcla de tripsina-EDTA se almacenó

en alícuotas de 15 mL en tubos a 4 °C para su uso en cultivos celulares y a -20 °C para su almacenamiento a largo plazo.

Cultivo de líneas celulares en monocapa

En este trabajo se utilizaron tres líneas celulares: BeWo, una línea epitelial derivada de la placenta de una paciente con coriocarcinoma; HeLa, una línea epitelial obtenida del cuello uterino de una paciente con adenocarcinoma; y Vero, una línea epitelial derivada del tejido renal de *Cercopithecus aethiops*.

Estas se cultivaron en botellas T-25 en una estufa húmeda a 37 °C con una atmósfera de 5% de dióxido de carbono (CO₂), utilizando medio de cultivo Eagle modificado de Dulbecco/mezcla de nutrientes F-12 (DMEM-F12) (Gibco™, Grand Island, NY) para BeWo y medio esencial mínimo (MEM) (Gibco™, Grand Island, NY) para HeLa y Vero.

Los medios de cultivo se suplementaron con suero fetal bovino (SFB) (Internegocios S.A., Mercedes, Buenos Aires, Argentina). El SFB es ampliamente utilizado dado que su composición compleja aporta nutrientes esenciales necesarios para el crecimiento de la mayoría de las líneas celulares. Este fue inactivado a 56 °C durante treinta minutos en un termobloque previo a su utilización, este proceso fue crucial para desactivar el sistema de complemento y otras proteínas inmunológicas que puedan interferir en el cultivo celular. A continuación, el suero fue filtrado mediante una jeringa equipada con un filtro estéril de 0,22 µm de tamaño de poro, para su esterilización (retención de bacterias y levaduras) y purificación (reducción de partículas como restos celulares o residuos que puedan haber quedado durante el proceso de recolección y procesamiento).

La concentración de SFB y los suplementos añadidos se ajustaron para satisfacer las necesidades específicas de los esferoides y células en cultivo:

Para el medio DMEM-F12: Se agregó SFB al 10% del volumen final para ambos tipos de esferoides. Además, se añadió estreptomicina 1X (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO), antibiótico de amplio espectro bactericida, y L-glutamina 1X (Gibco™, Grand Island, NY), necesaria para el crecimiento celular.

Para el medio MEM: Se completó con SFB al 5% del volumen final y también se incluyó estreptomicina 1X que proporciona protección antibiótica.

Se realizaron seguimientos periódicos de los cultivos celulares monitoreando los siguientes aspectos:

Color del medio: los medios de cultivo empleados contienen rojo de fenol, este presenta una tonalidad violeta a pH 7,8, roja a pH 7,4, y amarilla a pH 6,5. El color esperado es el rojo, que corresponde al pH óptimo para el crecimiento celular. Si se observa un color amarillo puede deberse al propio crecimiento celular, ya que las células liberan productos de desecho, como

ácido láctico ($C_3H_6O_3$) y dióxido de carbono (CO_2), o una contaminación bacteriana o fúngica cuyo metabolismo acidifica el medio.

Turbidez: mediante una observación a contraluz se puede apreciar si el medio exhibe transparencia o turbidez. Esto puede originarse por la presencia de partículas en suspensión (células muertas) o microorganismos en crecimiento, como bacterias, levaduras u hongos.

Morfología celular: al examinar su forma y estructura empleando un microscopio, se puede observar detalles sobre su estado actual, ya que su morfología puede cambiar en respuesta a las condiciones específicas de cultivo en las que están siendo mantenidas.

Porcentaje de confluencia: apreciamos la proporción del área de cultivo ocupada por las células con respecto al área total disponible, previniendo el sobrecrecimiento celular (células muertas en suspensión) y evitando un pasaje prematuro que comprometa la viabilidad de las líneas celulares.

Cuando los cultivos celulares alcanzaron aproximadamente el 100% de confluencia, fueron tratados con tripsina. Para ello se retiró el medio de cultivo y se realizaron tres lavados con *buffer* fosfato salino (PBS) 1X. A continuación, se añadió 1 mL de Tripsina-ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) (0,25% p/v de tripsina y 0,04% p/v de EDTA) (Gibco, Grand Island, NY) y se incubó por ocho minutos en estufa a 37 °C y 5% de CO_2 . La tripsina es una enzima proteolítica que degrada las proteínas de adhesión en la membrana celular, permitiendo que las células se desprendan de la superficie del cultivo y de las células vecinas. El EDTA, por su parte, es un agente quelante que secuestra iones como Ca^{2+} y Mg^{2+} , fundamentales para la adhesión celular. Al eliminar estos iones, se debilitan las interacciones célula-matriz y célula-célula, facilitando el efecto de la tripsina. Luego, se agregó medio de cultivo con SFB para inactivar la enzima, y se recolectó con pipeta las células en suspensión. Las suspensiones resultantes se centrifugaron a 800 revoluciones por minuto (rpm) para que las células decanten y se descartó el sobrenadante. Los *pellets* obtenidos se resuspendieron en medio de cultivo y el recuento de células se realizó observando bajo el microscopio óptico a un aumento de 40X empleando una cámara de Neubauer. Utilizando la media del recuento, el volumen de la cámara y el factor de dilución empleado, se determinó la cantidad de células presentes en un mililitro. Esta información nos permitió determinar con precisión el volumen de la suspensión necesario para sembrar cultivos con concentraciones conocidas y específicas de células, ya sea para realizar subcultivos o ensayos de infección. Estos nuevos cultivos se mantuvieron en estufa húmeda durante la noche (*overnight*) para permitir que las células se adhirieran al soporte sólido, luego de lo cual se renovó el medio de cultivo.

Las células remanentes se congelaron para generar una reserva de respaldo, para ser utilizadas en futuros experimentos o como precaución en caso de contaminación de algún cultivo. Para ello, se colocó la suspensión de las células en un criotubo de 2 mL y se le agregó

entre un 10 y 20% del volumen final de dimetilsulfóxido (DMSO). Luego, los criotubos se colocaron en el recipiente de congelación Mr. Frosty™ y se transfirieron al congelador de -80 °C. Este sistema proporciona una velocidad de enfriamiento de aproximadamente -1 °C/min, velocidad óptima para la conservación de células. Al día siguiente, se retiraron los criotubos del dispositivo de enfriamiento controlado y se conservaron a -80 °C.

Cultivo de clones de *T. cruzi*

Epimastigotes de los clones de *T. cruzi* K98-GFP, VD-RFP y VD-*wt* se cultivaron en botellas T-25 en estufa a 28 °C utilizando medio de infusión de hígado y triptona (LIT) con 10% SFB, estreptopenicilina 1X (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) y hemina 1X. Se realizaron observaciones periódicas con un microscopio invertido para verificar las condiciones del cultivo, y se renovó el medio LIT según fue necesario para asegurar su óptimo crecimiento.

Las cepas son clones de diferentes orígenes: K98, perteneciente al TcI, fue aislada de un paciente argentino con enfermedad de Chagas en etapa crónica (115), mientras que VD, correspondiente al TcVI, se aisló de un paciente pediátrico argentino con Chagas congénito (116). Estos fueron proporcionados por el equipo liderado por la Dra. Stella González-Cappa del Instituto de Investigaciones en Microbiología y Parasitología Médica en Facultad de Medicina de la Universidad de Buenos Aires (IMPAM-CONICET).

Los cultivos transgénicos utilizados en este trabajo consisten en poblaciones clonales originadas a partir de un cultivo inicial de una sola célula. Estos parásitos incorporaron genes que les permiten expresar proteínas fluorescentes, utilizadas ampliamente en biología molecular como marcadores. En concreto, se integraron el gen para la proteína verde fluorescente (GFP, *Green Fluorescent Protein*), procedente de la medusa *Aequorea victoria*, y el gen para la proteína roja fluorescente (RFP, *Red Fluorescent Protein*), derivada de la anémona de mar *Discosoma sp.* (117, 118). Ambas proteínas, conocidas por su fluorescencia verde y roja respectivamente, permiten visualizar a los parásitos fácilmente gracias a su expresión estable y que se aprecia de manera homogénea en todo el parásito.

Los clones K98-GFP y VD-RFP empleados fueron generados en el Laboratorio de Biología Molecular de la Enfermedad de Chagas (LabMECh) por la Dra. María de los Ángeles Curto. Los genes fluorescentes se integraron mediante transfección con vectores de la familia pTREX, diseñados para lograr una expresión estable en *T. cruzi*. Este vector, optimizado para tal propósito, se incorpora al locus del promotor ribosomal por recombinación homóloga, lo que asegura la sobreexpresión de genes exógenos sin necesidad de presión de selección, ya que quedan integrados de manera permanente en el genoma (119). Para seleccionar los parásitos transfectados, se empleó la resistencia a un antibiótico proporcionada por el

vector, seguida de un proceso de clonación por dilución serial, garantizando que todos los parásitos fueran clones entre sí.

Para evaluar la expresión estable de las proteínas GFP y RFP a lo largo del ciclo de vida del parásito se llevó a cabo una prueba de fluorescencia en los epimastigotes de ambos clones. Para ello, se centrifugaron los cultivos a 500 rpm durante 8 minutos. Se descartaron los sobrenadantes y se recolectaron los epimastigotes, los cuales se resuspendieron en PBS 1X. Luego, se añadió paraformaldehído (PFA) al 4% p/v para fijar las suspensiones celulares y se incubó durante 15 minutos a 4°C. Para remover el PFA se realizaron 3 lavados con PBS 1X, y se montaron las células sobre 2 portaobjetos y se les añadió medio de montaje Vectashield® Antifade Mounting Medium con 4,6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) (Vector Laboratories, EEUU) y se cubrió con cubreobjetos. DAPI es un tinte fluorescente que se une fuertemente a las regiones ricas de adenina y timina del ADN por lo que se emplea para la tinción de ADN de células. Además, de tinción este medio ayuda a preservar la muestra al evitar que se seque y reducir la fotodegradación, minimizando la pérdida de señal fluorescente por la exposición prolongada a la luz. También, permite su conservación a largo plazo, manteniendo la calidad de las muestras para estudios futuros. Finalmente, los epimastigotes se observaron utilizando un microscopio de fluorescencia Leica DM2500 LED y se tomaron fotografías 40X de campos al azar de las muestras ajustando los filtros específicos que permitan la excitación y emisión de luz de cada proteína fluorescente. Para GFP, se utiliza un filtro de excitación que posee una longitud de onda entre 440 y 490 nm. Este permite la transmisión de luz azul, que excita la GFP. Por otro lado, el filtro de emisión tiene una longitud de onda que va de 500 a 550 nm, lo que captura la luz verde emitida por la proteína, permitiendo así su visualización. En el caso de RFP, el filtro de excitación se sitúa entre 500 y 550 nm, permitiendo la transmisión de luz verde que excita la RFP. Para la emisión, se utiliza un filtro que abarca longitudes de onda de 630 a 700 nm, el cual captura la luz roja emitida por la RFP.

Diferenciación de clones de *T. cruzi*

Para inducir la diferenciación de *T. cruzi* y obtener tripomastigotes metacíclicos, los cultivos de epimastigotes se mantuvieron hasta alcanzar la fase estacionaria, sin renovar el medio LIT en los días posteriores.

Esta diferenciación generalmente se induce bajo condiciones específicas de estrés o en medios diseñados para simular las condiciones químicas y el entorno del intestino del vector, como el medio TAU (*Triatomine Artificial Urine*). En este trabajo se optó por realizar la diferenciación generando condiciones de estrés, que consistieron en no renovar el medio de cultivo. Luego de alcanzar la fase estacionaria, el porcentaje de parásitos en la etapa de

tripomastigotes metacíclicos aumenta, observándose un cambio en la morfología de los epimastigotes, pasando de su forma fusiforme característica a una más alargada y delgada. Este suceso generalmente se aprecia después de dos semanas. A continuación, se infectaron las líneas celulares BeWo y Vero (cultivos de al menos 24 horas post-subcultivo). Se permitió que los parásitos permanecieran en contacto con las células durante 24 horas, y luego se realizaron diez lavados con PBS 1X para eliminar los parásitos remanentes en el medio de cultivo. Para realizar el seguimiento de la infección se observó en el microscopio invertido en busca de nidos de amastigotes los primeros cuatro días, y de tripomastigotes en el medio en los días posteriores.

Los tripomastigotes diferenciados en cada línea celular (BeWo y Vero) fueron utilizados en las diversas pruebas de infección de la tesina, incluyendo los ensayos de infección en monocapa y la cuantificación de carga parasitaria mediante PCR cuantitativa en tiempo real. Los parásitos remanentes se congelaron (como se describió anteriormente para las células) como medida de precaución para crear una reserva de respaldo.

Para evaluar si la fluorescencia de ambos clones se mantuvo estable y homogénea durante su diferenciación a tripomastigotes, observamos los cultivos utilizando un microscopio óptico de fluorescencia ZEISS "AXIO Vert.A1" equipado con una cámara ZEISS "AxioCam 202 mono" (Carl Zeiss AG, Oberkochen, Germany). Esto facilitó el proceso, ya que no fue necesario repetir el protocolo empleado para los epimastigotes, gracias a la adquisición de este microscopio para el cuarto de cultivo de parásitos.

Dado que la diferenciación de epimastigotes a tripomastigotes demanda varios días de trabajo, se decidió utilizar crioviales de tripomastigotes K98-GFP y VD-*wt* previamente diferenciados en las líneas celulares BeWo y Vero para llevar a cabo la producción en las células HeLa. Para descongelarlos, se retiraron los criotubos conservados a -80 °C utilizando guantes de protección y se sumergieron rápidamente en un baño termostático a 37 °C, agitándolos suavemente hasta que se descongelaron por completo. La producción de tripomastigotes se llevó a cabo siguiendo el mismo procedimiento descrito anteriormente utilizando células HeLa en este caso.

Detección de micoplasma por PCR

En nuestro Instituto no disponíamos de células HeLa; estas fueron gentilmente donadas por el Laboratorio de Interacción Parásito-Hospedero del Instituto de Investigaciones Biotecnológicas (IIB-IIBio; UNSAM-CONICET), dirigido por la Dra. Valeria Tekiel. Por lo tanto, antes de iniciar el trabajo, realizamos un ensayo de detección de micoplasma mediante PCR para asegurarnos de que las células HeLa no estuvieran contaminadas,

protocolo llevado adelante cuando ingresan líneas celulares a nuestro Instituto. El control de micoplasma es esencial para proteger los cultivos ya que este tipo de bacteria no es visible al microscopio óptico, lo que dificulta su detección en los controles de rutina.

La extracción de ADN se realizó a partir del sobrenadante de un cultivo de células HeLa utilizando el kit High Pure PCR Template Preparation de Roche.

En un tubo Eppendorf que contenía proteinasa K, se añadieron 200 μ L de *buffer* de pegado, seguidos de 200 μ L de sobrenadante de células HeLa. La proteinasa K es una enzima proteolítica crucial para la lisis celular, ya que degrada proteínas, especialmente nucleasas que podrían degradar el ADN durante la extracción, facilitando la liberación del ADN al romper las uniones proteicas con las histonas que lo empaquetan y protegen. El *buffer* de pegado, por su parte, facilita la unión del ADN a la membrana de sílice en la columna. Contiene sales caotrópicas que, además de desnaturalizar proteínas, promueven la interacción entre el ADN y la sílice de la columna, lo que permite que el ADN se adhiera a la membrana mientras otras impurezas son eliminadas. La solución se agitó en el vortex durante 15 segundos para garantizar una mezcla uniforme de los reactivos con la muestra, seguida de una breve centrifugación (5-10 segundos) para concentrar el líquido en el fondo del tubo Eppendorf, evitar la formación de burbujas o gotas en las paredes del tubo y asegurando que toda la muestra esté disponible para los pasos posteriores. Luego, la muestra se incubó a 70 °C durante 10 minutos en el termobloque para maximizar la actividad de la proteinasa K, facilitando la desnaturalización y digestión completa de las proteínas. Se realizó otra centrifugación para separar los componentes de la mezcla, como restos celulares y precipitados. A continuación, se añadieron 100 μ L de isopropanol, se mezcló nuevamente en el vortex y se llevó a cabo una tercera centrifugación. El isopropanol precipita el ADN al deshidratar las moléculas, lo que lo vuelve insoluble en el medio (altas concentraciones de sales y alcohol), facilitando su separación de los demás componentes celulares. El ADN precipitado se aprecia como finas hebras blancas y visibles en la interfaz entre la fase de alcohol y el resto de la solución, mientras que otras sustancias permanecen disueltas.

La mezcla completa se aplicó a una columna de extracción, junto con un tubo de recolección de 2 mL. Estas columnas consisten en una membrana de sílice con afinidad por el ADN en presencia de ciertas sales y alcoholes. La columna se centrifugó a 8000 rpm durante 1 minuto, luego se transfirió a un nuevo tubo de recolección, descartando el tubo anterior con el filtrado. Durante esta centrifugación, el ADN que está unido a la membrana de sílice en la columna se mantiene inalterado, mientras que los componentes no deseados de la solución pasan a través de la columna y se recogen en el tubo de recolección para su descarte.

A continuación, se agregaron 500 μ L de *buffer* removedor de inhibidores a la columna y se centrifugó nuevamente a 8000 rpm durante 1 minuto. Este *buffer* elimina los inhibidores

presentes en la muestra que puedan interferir con las enzimas en reacciones posteriores, como la PCR, lo que mejora la eficiencia de las reacciones enzimáticas y preserva la integridad de las muestras. Luego de la centrifugación, la columna de extracción se colocó en nuevo tubo de recolección, descartando el anterior con el filtrado. Posteriormente, se añadieron 500 μL de *buffer* de lavado y se centrifugó a 8000 rpm durante 1 minuto. Este *buffer*, que contiene una concentración baja de sales y alcoholes, ayuda a remover impurezas mientras el ADN permanece adherido a la columna de sílice.

La columna se transfirió a un nuevo tubo de recolección, y el tubo con el filtrado fue descartado. Este proceso se repitió, colocando la columna de extracción en un tubo Eppendorf de 1,5 mL sin tapa, y el tubo con el filtrado fue desechado. Se centrifugó a máxima velocidad durante 10 segundos para eliminar cualquier resto de alcohol. Finalmente, se transfirió la columna a un nuevo tubo Eppendorf y se añadieron 100 μL de *buffer* de elución, previamente calentado a 70 °C. Luego, se centrifugó a 8000 rpm durante 1 minuto. Este *buffer*, generalmente un tampón de baja salinidad y libre de nucleasas, desestabiliza la unión entre el ADN y la membrana de sílice, permitiendo su elución en altas concentraciones y en solución acuosa. La columna fue desechada, el eluato conteniendo el ADN se trasvasó a un tubo Eppendorf y se almacenó a -20 °C hasta su utilización.

La PCR se llevó a cabo utilizando el kit T-Holmes ADN Polimerasa 500 U de Inbio Highway. La preparación consistió en: 1X de Buffer de reacción TAS (Inbio Highway), 0,04 U/ μL de T-Holmes ADN pol (Inbio Highway), 0,2 mM de dNTPS, 1,5 mM de MgCl_2 , 0,1 μM de Cebador Mico-5'-Fw y 0,1 μM de Cebador Mico-3'-Rv.

Para realizar el ensayo, se utilizaron cebadores específicos para secuencias del ARN ribosomal 16S de micoplasmas (120). Estos consisten en una mezcla de siete cebadores sentido y tres antisentido, de los cuales cuatro son degenerados. Este diseño se utiliza para detectar la mayor cantidad posible de especies de micoplasmas, ya que algunas de ellas difieren únicamente en un nucleótido y, así lograr un apareamiento completo del cebador con el sitio de reconocimiento en el gen para ARNr 16S (120).

Luego de homogeneizar y centrifugar la mezcla, se distribuyeron 20 μL en tubos individuales de 0,2 mL para las seis muestras, que incluyeron diferentes diluciones del ADN extraído de células HeLa: 1:1 (por duplicado), 1:10, 1:100 (por duplicado) y 1 ng/ μL . También se prepararon dos controles positivos de ADN de JEG-3 contaminado con micoplasma y dos controles sin templado (NTC, por sus siglas en inglés *No Template Control*). A cada tubo se le añadieron 5 μL de la muestra de ADN y se les realizó un breve centrifugado para que las muestras se unificaran completamente con la mezcla de reacción. Para evitar contaminaciones, la preparación y distribución de la mezcla de PCR se realizó en una sala (Laboratorio pre-PCR), mientras que la adición de las muestras de ADN se llevó a cabo en otra (Laboratorio de procesamiento de muestras). Finalmente, se llevó a cabo la

amplificación en un termociclador Bio-Rad T100 (Bio-Rad Laboratories, Inc.). El programa de ciclado incluyó una desnaturalización inicial a 94 °C durante 2 minutos, seguida de un ciclo de hibridación y extensión con los siguientes pasos: 72 °C durante 3 minutos, 65 °C durante 2 minutos, y 72 °C durante 5 minutos. Posteriormente, se realizaron 32 ciclos de amplificación con las siguientes etapas: desnaturalización a 95 °C durante 4 segundos, hibridación a 65 °C durante 8 segundos, y extensión a 72 °C durante 16 segundos. Finalmente, se realizó una etapa de extensión a 72 °C durante 5 minutos.

Para visualizar los productos de PCR, se preparó un gel de agarosa al 1,3% p/v en un buffer de Tris-Acetato-EDTA (TAE). Este buffer mantiene la integridad del ADN durante la electroforesis, proporcionando un pH ligeramente alcalino (8-8,5) que protege al ADN de su hidrólisis. Además, el EDTA actúa como un agente quelante que secuestra iones divalentes de magnesio, los cuales son necesarios para la actividad de la ADNasa.

Para facilitar la disolución de la agarosa se calentó la mezcla en el microondas, y, una vez que el gel disminuyó su temperatura, se añadieron 5 µL de bromuro de etidio (EtBr) dado que, al unirse al ADN e iluminar con luz ultravioleta (UV), permite visualizar su patrón de bandas. Luego el gel se colocó en una cuba de electroforesis y se añadió buffer TAE 1X hasta que quedó completamente sumergido. Se sembraron 5 µL de cada muestra, previamente mezcladas con 1 µL de *buffer* de carga (excepto el control positivo, que fue de 1 µL). Este *buffer* aumenta la densidad y colorea la muestra, lo que facilita su depósito en la calle, a la vez que permite monitorear la migración de las muestras en el gel.

Se incluyó un marcador de peso molecular, con fragmentos de ADN de tamaños conocidos entre 100 pb y 15000 pb (Plus DNA Ladder, Thermo Fisher Scientific), para determinar el tamaño de las bandas de ADN presentes. Finalmente, se conectaron los electrodos de la cuba a la fuente de alimentación y se aplicó corriente permitiendo la migración diferencial de las moléculas a través del gel de agarosa. Por último, se procedió a revelar el gel con un transiluminador UV dado que se utilizó EtBr como marcador fluorescente.

Ensayos de infección en monocapa

Para los ensayos de infección en las tres líneas celulares, se sembraron 12.000 células en 3 cubreobjetos de vidrio redondos diferentes, cada uno en un *well* de una placa de 24 pocillos. Luego, se expusieron a tripomastigotes de los clones K98-GFP y VD-*wt* (previamente diferenciados en la línea celular a infectar), utilizando una multiplicidad de infección (MOI, por sus siglas en inglés *multiplicity of infection*) de 20 parásitos por célula.

Se realizó un procedimiento de esterilización previo a los cubreobjetos. Primero, se sumergieron durante 3 horas en una solución de etanol al 96% v/v, asegurándose de que no

se apilaran para evitar rayaduras. Después, se lavaron con agua corriente, seguidos de lavados con agua destilada y un enjuague final con agua pura de grado dos. Posteriormente, se secaron en la estufa durante la noche y se colocaron en una placa de Petri de vidrio para su esterilización final en autoclave.

Para calcular el número de tripomastigotes, se tomó el medio de un cultivo de células infectadas durante 5-7 días con tripomastigotes visibles en suspensión. Luego, se realizaron 2 centrifugaciones para separar las células sueltas en el medio y los parásitos de interés, aprovechando sus diferencias en la velocidad de sedimentación (800 rpm para las células y 2500 rpm para los tripomastigotes). Después de descartar el sobrenadante, se mezcló con pulsos de vortex para distribuir uniformemente el *pellet* de tripomastigotes. Se tomó una alícuota de la suspensión y se diluyó en PBS 1X para facilitar su recuento en cámara de Neubauer. Se calculó el volumen necesario para llevar a cabo las infecciones por triplicado (para cada línea celular y clon parasitario) con una MOI de 20:1. Luego de 3 horas de contacto entre las células y los tripomastigotes, se lavaron los cultivos 10 veces con PBS 1X, se les añadió 1 mL de medio de cultivo y se incubaron por 48 horas en la estufa. Transcurrido el tiempo, se removió el medio de cultivo de los *wells*. Los cubreobjetos se lavaron 3 veces con PBS 1X, luego se fijaron con PFA al 4% p/v durante 15 minutos a 4°C.

La fijación de los cultivos, es un paso crucial para detener las funciones celulares y conservar sus estructuras y morfología intactas para su posterior observación al microscopio.

Para remover el PFA se realizaron 3 lavados con PBS 1X, luego se montaron los cubreobjetos redondos en un portaobjeto y se les añadió medio de montaje Vectashield® Antifade Mounting Medium con DAPI. Posteriormente, se evaluó la infección utilizando un microscopio de fluorescencia Leica DM2500 LED, lo que permitió visualizar los núcleos celulares, y los núcleos y kinetoplastos de los amastigotes presentes. Para cada cubreobjeto, se tomaron entre 7 y 10 fotografías de campos al azar, contando un total de entre 500 y 1000 células por cada uno. Para ello, utilizamos un filtro de excitación de 350 a 390 nm, diseñado para permitir que únicamente la luz UV irradie a las muestras teñida con DAPI, junto con un filtro de emisión de 450 a 490 nm, que bloquea todas las demás longitudes de onda, permitiendo que solo la fluorescencia azul emitida por el DAPI alcanza al detector del microscopio.

Esto permitió realizar un recuento de la cantidad total de células y células infectadas en cada imagen, utilizando el *software* Fiji (*Fiji Is Just ImageJ*) (121) y se determinó el porcentaje de células BeWo, HeLa y Vero infectadas por K98-GFP y VD-*wt*.

Para analizar los resultados utilizamos una prueba de Análisis de Varianza (ANOVA) de una vía, seguida por un test de comparación múltiple de Bonferroni, empleando el *software* GraphPad Prism 10 (EE. UU.)

Esto se empleó para comparar las medias de los 6 grupos (variables cuantitativas continuas e independientes) y evaluar si existen diferencias significativas entre las medias de los grupos. Si hay diferencias significativas, se emplea un test de comparación múltiple de Bonferroni para identificar específicamente cuáles grupos difieren entre sí, controlando el riesgo de cometer errores tipo I en las comparaciones múltiples.

Cuantificación de carga parasitaria por PCR cuantitativa en tiempo real

Para la cuantificación de carga parasitaria en la línea celular HeLa, se sembraron 57.000 células en los pocillos de una placa de 6 wells y se cultivaron por 24 hs en la estufa húmeda a 37 °C con una atmósfera de 5% de CO₂. Cumplido el tiempo se pusieron en contacto 3 wells con tripomastigotes de K98-GFP y los otros 3 con VD-*wt*, empleando una MOI de 20 parásitos por célula HeLa.

Para la obtención de los tripomastigotes, se llevó a cabo el mismo protocolo descrito en la sección de “Ensayos de Infección en monocapa” con la diferencia de que se les añadió 3 mL de medio de cultivo en este caso. Una vez cumplido el tiempo de incubación, se retiró el medio de cultivo y se lavó 3 veces con PBS 1X para poder tripsinizar con 0,5 mL de Tripsina-EDTA (0,25% p/v de tripsina y 0,04% p/v de EDTA) (Gibco, Grand Island, NY) los 6 wells de la placa. Se incubó por 8 minutos en estufa a 37 °C y 5% de CO₂. Se agregó 0,5 mL de MEM-5%SFB para inactivar la enzima, se recolectó con pipeta la suspensión y se traspasó a tres tubos Eppendorf (3 por cada clon empleado). Se centrifugaron los tubos a 800 rpm para que decanten las células, se descartó el sobrenadante hasta obtener un volumen final de 200 µL y se reservaron en el freezer a -20°C hasta el momento de la extracción de ADN.

En este caso, se utilizó el kit ADN Puri Prep-S (Inbio Highway). Para ello, se añadieron 20 µL de solución de proteasa a cada tubo Eppendorf, conteniendo 200 µL de suspensión de células HeLa, y se homogeneizaron mediante vortex. A continuación, se añadieron 200 µL de *buffer* de lisis y se mezclaron con pulsos de vortex para asegurar una lisis efectiva. Luego, se realizó una breve centrifugación y se incubaron las muestras a 56°C durante 10 minutos en el termobloque. Al finalizar la incubación, se centrifugaron brevemente para descender las microgotas condensadas en las tapas de los tubos. Se agregaron 200 µL de etanol (96-100%) a cada tubo, se agitó por inversión 3 veces y se repitió el pulso en la microcentrífuga. Luego, se transfirió el contenido de cada tubo a columnas colocadas sobre tubos colectores de 2 mL, y se centrifugaron a 12.000 *g* durante 1 minuto. El filtrado se descartó, y las minicolumnas se volvieron a colocar en los tubos colectores. Se agregaron 500 µL de *buffer* de lavado I a las paredes de cada minicolumna, asegurándonos de que la punta no tocara la membrana, y se centrifugaron durante 1 minuto a 12.000 *g*. Nuevamente, se descartó el filtrado y se

colocaron las minicolumnas en los tubos colectores. Posteriormente, se lavaron las minicolumnas con 500 μL de *buffer* de lavado II y se centrifugaron 2 veces durante 3 minutos a 12.000 g para eliminar cualquier resto de este *buffer*, ya que podría interferir técnicas posteriores con el ADN. Luego, se colocaron las minicolumnas en microtubos de 1,5 mL y se dejaron destapadas durante 15 minutos para permitir la evaporación de los restos de etanol. Se descartaron los tubos colectores y se colocaron las minicolumnas en nuevos microtubos de 1,5 mL. Se agregaron 100 μL de *buffer* de elución, calentado previamente a 70 °C, en el centro de la membrana de sílica de cada minicolumna y se incubaron durante 5 minutos a temperatura ambiente. Finalmente, se centrifugaron durante 2 minutos a 12.000 g , permitiendo la elución del ADN. El producto obtenido se conservó a -20°C si no se iba a utilizar en los siguientes 3 a 5 días.

Para llevar a cabo la PCR cuantitativa en tiempo real, se prepararon 2 mezclas de reacción utilizando el kit FG POWER SYBR™ GREEN PCR mix (Thermo Scientific, Rockford, IL, USA) al 1X según las recomendaciones del fabricante, junto con 0,3 μM de mezcla de cebadores GAPDH por un lado, y 0,3 μM del cebador EF-1 α -5'-Fw, y 0,3 μM del cebador EF-1 α -3'-Rv por el otro.

Para determinar la carga parasitaria se emplearon cebadores para el gen del factor de elongación 1 α (EF-1 α) de *T. cruzi* (122, 123) y GAPDH para la cuantificación de células HeLa (**Tabla 1**).

Cebadores	Secuencia sentido	Secuencia antisentido
EF-1 α	5'-GGAGGCATTGACAAGCGGACGAT-3'	5'-GATCGTGAACACAGACTTGGGCG-3'
GAPDH	5'-GGTCTCCTCTGACTTCAACA-3'	5'-GTGAGGGTCTCTCTTCCCT-3'

Tabla 1: Secuencia nucleotídica de los cebadores para los genes EF-1 α *T. cruzi* y GAPDH de células HeLa.

A continuación, se homogeneizaron los tubos, se centrifugaron y distribuyeron 12,75 μL de cada mezcla en tubos individuales de 0,2 mL para las seis muestras (analizadas por duplicado) y 4 controles sin templado (NTC) para cada mezcla de reacción. Se añadieron 2,25 μL de ADN a las muestras previamente homogeneizadas y se centrifugó brevemente.

En este caso se empleó la termocicladora de tiempo real QG-9600 (PeetLab, China). El programa de ciclado comenzó con una desnaturalización a 94 °C durante 5 minutos. Luego, se llevaron a cabo 40 ciclos de amplificación que incluyeron los siguientes pasos: desnaturalización a 94 °C durante 30 segundos e hibridación a 58 °C durante 30 segundos. Además, se incluyó una curva de fusión de 60 a 95 °C.

Finalmente, analizamos las curvas de amplificación, de fusión y su derivada ($-dF/dT$) para las muestras y controles utilizando el *software* Gene-9660. Una curva de amplificación es un gráfico que representa la evolución del producto amplificado (en este caso, ADN) en función del número de ciclos de amplificación. Esta curva permite visualizar en tiempo real cómo se amplifica una secuencia específica de ADN y se utiliza para cuantificar la cantidad de material genético inicial en una muestra. El *threshold* (umbral) es el nivel de fluorescencia que se establece para diferenciar el ruido de la señal específica de la amplificación del ADN de interés. Se representa con una línea horizontal trazada en la fase exponencial de la curva de amplificación. Por otro lado, una curva de fusión es un gráfico que muestra la separación de las hebras de ADN de doble cadena (desnaturalización) a medida que la temperatura aumenta. Se utiliza para comprobar la especificidad de la amplificación del ADN y detectar la presencia de productos no deseados, como dímeros de cebadores. A partir de este gráfico se puede generar el de la derivada ($-dF/dT$) vs. temperatura, que muestra la pendiente de la disminución de la fluorescencia en función de la temperatura. En este gráfico, los picos representan las transiciones más abruptas durante la desnaturalización del ADN, siendo el pico más alto el que corresponde a la temperatura de melting (T_m), es decir, la temperatura a la cual el 50% de la molécula de ADN bicatenario se desnaturaliza, indicando el producto amplificado.

Curvas estándar para cuantificación

La cuantificación se realizó utilizando curvas estándar (umbral de ciclo (Ct) en función de la concentración) específicas para cada cebador: una para las células HeLa y dos para los clones parasitarios (K98-GFP y VD-*wt*). Para generar la curva de *GAPDH*, se contó un cultivo de células HeLa en cámara de Neubauer y se realizó la extracción de ADN utilizando el kit ADN Puri Prep-S (Inbio Highway), siguiendo la misma metodología descrita anteriormente. Luego, se llevaron a cabo 6 diluciones seriadas al 1:10 de los ADNs extraídos, comenzando en 6×10^6 células totales.

Para la curva de *EF-1 α* , se contaron tripomastigotes de ambos clones parasitarios por separado en cámara de Neubauer y se purificó el ADN utilizando el mismo kit de extracción y metodología previamente descrita. A continuación, se realizaron 6 diluciones seriadas al 1:5, comenzando con 2×10^5 parásitos totales. Utilizando estas curvas estándar, es posible interpolar los valores de Ct de las muestras de células HeLa infectadas para determinar el número de células y parásitos.

Al cuantificar mediante curvas estándar, es importante considerar 3 aspectos:

Rango dinámico: Es esencial que los valores de Ct de las muestras se encuentren dentro del rango dinámico de la curva estándar. Si los valores están fuera del rango de las diluciones estándar (por ejemplo, significativamente más altos o más bajos), la interpolación pierde precisión y eficacia. Para corregir esto, se pueden concentrar o diluir las muestras, garantizando que queden dentro de este rango.

Eficiencia de la PCR: La pendiente de la curva estándar proporciona información sobre la eficiencia de la PCR. Una pendiente ideal, cercana a -3,32, corresponde a una eficiencia del 100%. Por lo tanto, es crucial que las curvas obtenidas presenten una pendiente en torno a este valor.

Linealidad de la curva: La interpolación es confiable sólo en la región lineal de la curva estándar. Para asegurar esto, se prepararon seis diluciones de los estándares, cubriendo un amplio rango de concentraciones. El valor de R^2 es un indicador de la linealidad, refleja el grado en que los datos experimentales se ajustan a un modelo lineal. Por lo tanto, las curvas utilizadas para la cuantificación deben tener un coeficiente de determinación de 1 (valor ideal), o cercano (por ejemplo, 0,99 y 0,98).

Finalmente, se llevó a cabo la misma reacción de PCR descrita anteriormente, con la modificación de que las diluciones de ADN se analizaron por triplicado. Al finalizar el proceso de ciclado, se evaluaron las curvas estándar para cada gen utilizando el *software* Gene-9660. Se estimó la carga parasitaria calculando el número de parásitos por célula HeLa.

En el LabMECh, se realizó el mismo procedimiento de cuantificación de la carga parasitaria en células BeWo, cuyos resultados utilizaremos para comparar con los obtenidos en esta sección.

Para analizar los resultados, dado que se compararon las medias de más de 2 grupos independientes, utilizamos una prueba de Análisis de Varianza (ANOVA) de una vía, seguida por un test de comparación múltiple de Bonferroni, empleando el *software* GraphPad Prism 10 (EE. UU.).

Cultivo de células BeWo en 3D

Los cultivos 3D se generaron utilizando el sistema MicroTissues® 3D Petri Dish® de Sigma-Aldrich® (St. Louis, MO). Este sistema consta de un molde de silicona autoclavable que se utiliza para la creación de Petri Dish® 3D, micro moldes de agarosa con micropozos antiadherentes que facilitan el contacto entre las células, lo que nos permite generar diferentes tipos de cultivos tridimensionales (3D). En nuestro trabajo empleamos dos tipos

de moldes de silicona: 12-81 *large* (cat. Z764019-6EA) y 12-256 *small* (cat. Z764000-6EA). Los moldes de esferoides *small* tienen 256 micropocillos circulares, distribuidos en una matriz de 16x16, de 300 μm de diámetro por 800 μm de profundidad, mientras que los de *large* tienen 81 micropocillos, en una matriz de 9x9, de 800 μm de diámetro por 800 μm de profundidad. En primer lugar, se preparó una solución de agarosa al 2% p/v en cloruro de sodio al 0,9% p/v en 50 mL de agua destilada. Esta solución y los moldes Micro Tissues® 3D Petri Dish® se esterilizaron mediante autoclave. Luego, se fundió la solución en el microondas y se dejó enfriar hasta una temperatura de 60-70 °C. Dentro de una cabina de flujo laminar, se añadieron 500 μL de agarosa fundida en cada molde de silicona, evitando la formación de burbujas. Una vez que el gel solidificó, se flexionaron los moldes de silicona con pinzas para facilitar la separación de los Petri Dish® 3D de agarosa formados (Figura 14). Después de verificar que estaban en óptimas condiciones para su uso, los micro moldes se transfirieron a una placa de cultivo de 12 wells. Para equilibrarlos, se añadieron 2,5 mL de medio de cultivo DMEM-F12 10% SFB y se incubó durante 15 minutos.

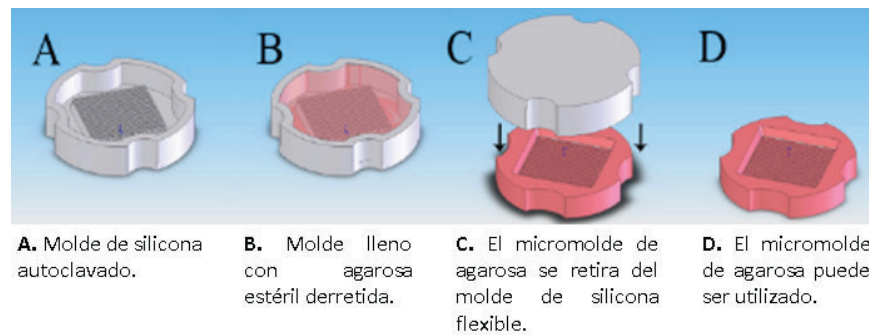


Figura 14. Armado de micromoldes de agarosa. Adaptado de Microtissues, Inc.

Posteriormente, se realizó la tripsinización de las células BeWo y se sembraron en los Petri Dish® 3D con 81000 células en un volumen de siembra de 190 μL , equivalentes a 1000 células por micropocillo para moldes *large* y 316 células por micropocillo para moldes *small*.

Una vez sembradas se dejó reposar durante unos 15 minutos para permitir que las células decanten por gravedad en los micropocillos de los moldes (Figura 15). Cumplido el tiempo, se agregaron 2,5 mL de DMEM-F12 10% SFB a cada *well* con esferoides *large* y *small*, y se colocaron las placas de cultivo en una estufa a 37 °C con un nivel de CO_2 del 5% durante 3 días, permitiendo así la formación de los esferoides. Finalmente, se tomaron imágenes de ambos tipos de esferoides empleando un microscopio invertido para poder evaluar su diámetro teórico utilizando el software Fiji (Fiji Is Just Image). El diámetro teórico se informó como si fueran esféricos.

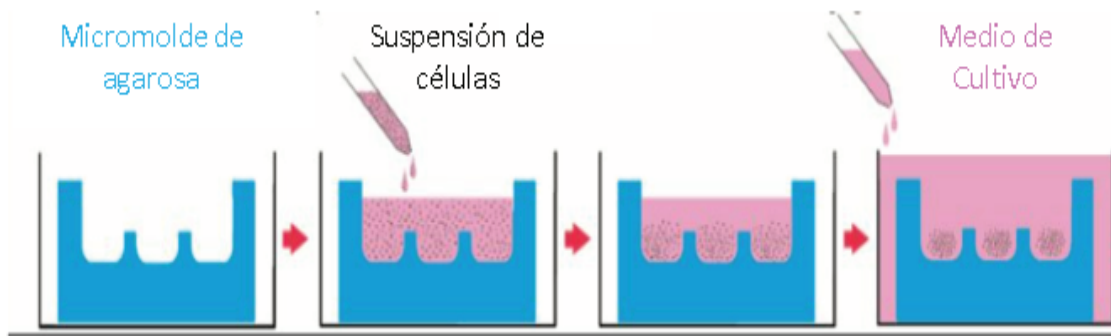


Figura 15. Siembra en micro moldes de agarosa. 190 μ L de suspensión de células, con la concentración deseada, se siembran sobre el micromolde de agarosa. Se dejan reposar durante 15 minutos para que las células decanten y se completa con 2,5 mL de DMEM-F12 5 y 10% SFB según el tipo de esferoide. Adaptado de Microtissues, Inc.

En el LabMECh, se realizaron esferoides bajo las mismas condiciones: sembrando 1000 células BeWo para los *large* y 316 para los *small* y empleando DMEM-F12 10% SFB. Estos valores serán comparados con los obtenidos de este apartado.

Para llevar a cabo la comparación, dado que se compararon las medias de más de 2 grupos independientes, utilizamos una prueba de Análisis de Varianza (ANOVA) de una vía, seguida por un test de comparación múltiple de Bonferroni, empleando el *software* GraphPad Prism 10 (EE. UU.).

Infecciones de cultivos 3D de células BeWo

Las infecciones de cultivos 3D de células BeWo fueron estandarizadas por la Dra. Sofía Apodaca, en el marco de su tesis doctoral defendida en noviembre de 2024. Se llevaron a cabo ensayos de infección de esferoides *large* de células BeWo, sembrando 1000 células por pocillo. A los tres días de su cultivo fueron expuestos a tripomastigotes K98-GFP y VD-*wt* de *T. cruzi* durante 48 hs con una MOI de 20:1. Luego, los cultivos fueron fijados e inmunomarcados. Para evidenciar la infección, se observó la expresión de la proteína fluorescente verde GFP y se realizó un marcaje con anticuerpos anti-*T. cruzi* (VD-*wt*). La cuantificación de la carga parasitaria se realizó mediante PCR cuantitativa por triplicado para cada muestra, utilizando el mismo procedimiento descrito para los cultivos en 2D.

La metodología detallada figura en el trabajo publicado recientemente titulado “*Novel 3D human trophoblast culture to explore T. cruzi infection in the placenta*” (124) , en el cual participé como coautor. Debido a que mi rol fue de asistir a la doctora Apodaca en estas tareas, el análisis comparativo de los resultados obtenidos para los mismos clones en ambos modelos será presentado en la sección “Discusión” de esta tesina.

Resultados

Cultivo de líneas celulares en monocapa

Los cultivos celulares se monitorearon periódicamente como se describió en la sección de Métodos. En base a las observaciones optamos por renovar el medio DMEM-F12 para las células BeWo, y MEM para las líneas HeLa y Vero, cada tres días realizando previamente 3 lavados con PBS 1X. De esta manera nos aseguramos un suministro de los nutrientes que permitió alcanzar la confluencia en siete días para poder realizar subcultivos y ensayos de infección. Además, logramos mantener un ambiente estéril y libre de contaminantes, como bacterias y hongos, lo que se evidenció al no observar turbidez en los medios de cultivo empleados, como así tampoco en las observaciones bajo el microscopio óptico durante los controles rutinarios de las células.

Cultivo de clones de *T. cruzi*

Al monitorear las condiciones de los cultivos de epimastigotes, decidimos renovar el medio LIT cada siete días para asegurarnos las condiciones óptimas para su crecimiento y desarrollo. Una vez que el cultivo alcanzó una densidad de alrededor 1×10^6 parásitos por mililitro, realizamos subcultivos y ensayos de diferenciación mediante su hambreado.

Al analizar las imágenes de epimastigotes de stocks de los clones K98-GFP (**Figura 16 A**) y VD-RFP (**Figura 16 B**) obtenidas mediante microscopía, se observó fluorescencia verde y roja de forma homogénea en ambos stocks de parásitos, respectivamente. Esto demostró que la expresión de las proteínas GFP y RFP se mantuvo estable durante la fase de epimastigote en su ciclo de vida.

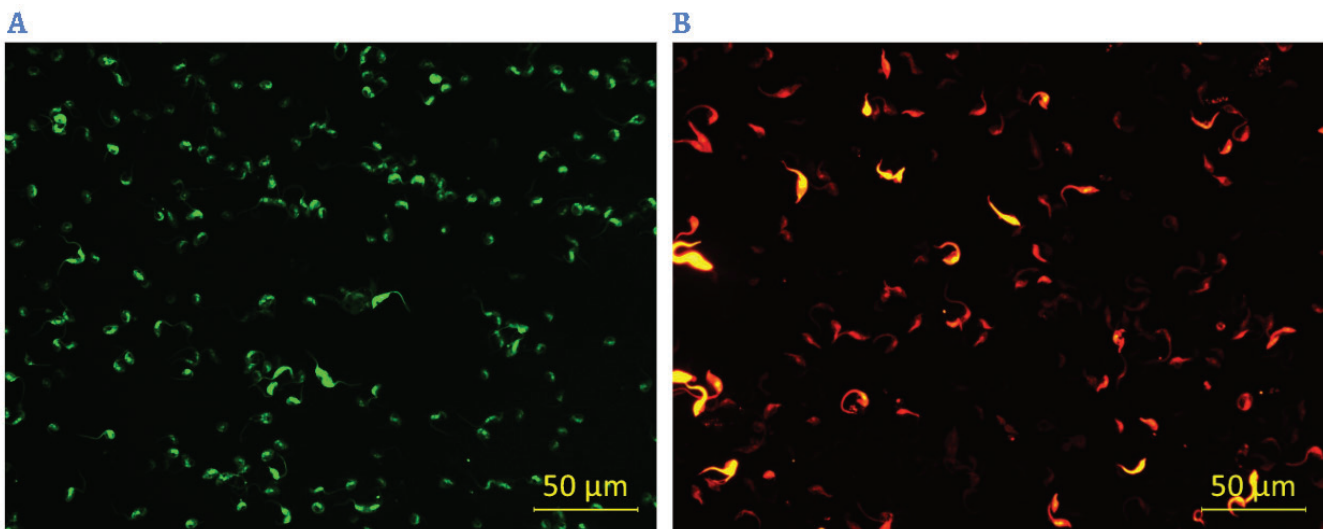


Figura 16. Epimastigotes de *T. cruzi*. Imágenes 40X del Microscopio de fluorescencia de Epimastigotes: **A:** K98-GFP. **B:** VD-RFP.

Diferenciación de clones de *T. cruzi*

Tras realizar las infecciones, se observaron tripomastigotes de K98-GFP en suspensión entre el quinto y séptimo día en las líneas celulares BeWo y Vero. El seguimiento de la infección fue rápida y sencilla empleando un microscopio óptico de fluorescencia, ya que tanto los amastigotes intracelulares como los tripomastigotes en el medio emitían una fluorescencia verde debido a la expresión de la proteína GFP (**Figura 17**). Esto indicó que la expresión de GFP permaneció estable, tanto en la fase de amastigote como en la de tripomastigote de K98-GFP.

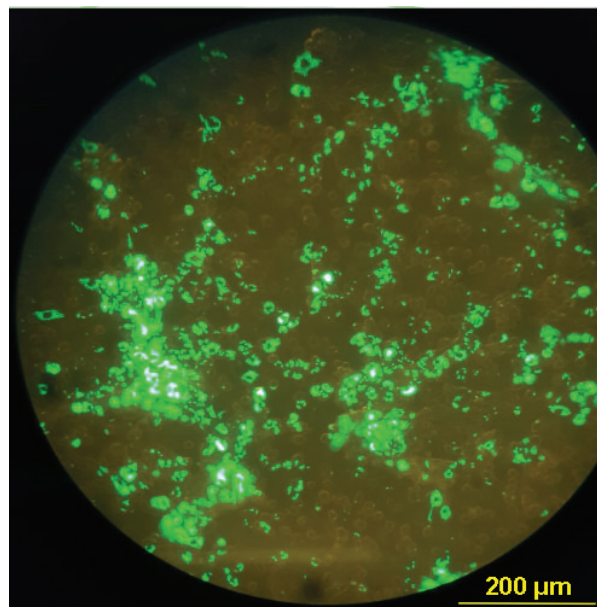


Figura 17. Infección con *T. cruzi* K98-GFP. Imagen 10X del Microscopio óptico de fluorescencia de Células Vero infectadas con K98-GFP. Amastigotes y tripomastigotes se pueden apreciar de un color verde fluorescente.

Los tripomastigotes del clon VD-RFP se observaron en suspensión luego de diez días post infección. Por otro lado, se evidenció la pérdida de fluorescencia roja en los tripomastigotes VD, ya que al ser expuestos al microscopio óptico de fluorescencia no emitieron la fluorescencia asociada a la expresión de la proteína RFP. Esto indicó que la expresión de dicha proteína no se mantuvo estable en los tripomastigotes del clon recombinante. Debido a estas dificultades, decidimos no continuar trabajando con VD-RFP durante el desarrollo de esta tesina y optamos por sustituirla por VD-*wt*.

Tras realizar las infecciones en las células BeWo y Vero con VD-*wt*, los tripomastigotes pudieron ser observados entre el séptimo y décimo día.

En cuanto a la diferenciación en células HeLa, los tripomastigotes del clon K98-GFP se observaron entre el cuarto y quinto día por su emisión de fluorescencia verde. Mientras que los VD-*wt* se detectaron a partir del quinto día post infección.

Detección de micoplasma por PCR

La detección de micoplasma se realizó por PCR de punto final seguida de electroforesis en geles de agarosa. Pudimos apreciar que en las calles que contenían los productos de amplificación del ADN de células HeLa (**Figura 18** calles 1,2,3,4,5 y 7) no se observaron bandas específicas correspondientes al gen de ARNr 16S de micoplasma (500 pares de bases). Por otro lado, las calles correspondientes a los controles positivos (9 y 10) mostraron bandas específicas de micoplasma, comparables a la banda de 500 pb del marcador de peso molecular (calles 6 y 11). Finalmente, los controles sin templado (calles 8 y 12) no presentaron bandas.

De esta manera, corroboramos que las células HeLa se encontraban libres de micoplasma, que la amplificación se realizó con éxito y que los reactivos empleados no presentaron contaminación durante la preparación de la mezcla de reacción. Esto nos permitió confirmar que podíamos emplear esta línea celular para los ensayos de diferenciación y el experimento de infección en monocapa.

Al emplear un cultivo de células HeLa en confluencia para llevar a cabo la extracción de ADN, contamos con una alta concentración de ADN celular; por ende fue crucial determinar la concentración adecuada que no inhiba la PCR. Para llevarlo a cabo, medimos su concentración y pureza empleando un espectrofotómetro de microvolumen Nanodrop. Este espectrofotómetro midió la absorbancia a 260 nm para calcular la concentración de ácidos nucleicos en la muestra y para su pureza dos relaciones: A260/A280 (1,8 y 2,0 indica una buena pureza) y A260/A230 (2,0 y 2,2 son óptimos). Con los valores obtenidos, confirmamos que el ADN extraído presentaba alta pureza y concentración. Por ende, optamos por diluir una parte de las muestras en diluciones de 1:10 y 1:100 utilizando el buffer de elución y otras ajustando su concentración final a 1 ng/ μ L para llevar a cabo la PCR. Esta decisión buscó evitar la saturación de la polimerasa, garantizar una amplificación eficiente y mantener la especificidad, minimizando posibles efectos adversos asociados al exceso de ADN.

Debido a esto, en las calles 1 y 2 de la corrida electroforética en gel de agarosa (**Figura 18**), donde se sembró la muestra sin diluir, se observó un "chorreado" causado por el exceso de ADN en la muestra. Este exceso impide que el ADN migre de manera uniforme, resultando

en una banda difusa o extendida en lugar de una banda nítida. Por otro lado, en las calles 3, 4, 5, 7 y 8, donde se sembraron las muestras diluidas con la concentración final deseada, no se observó esta banda extendida. Esto indicó que la PCR no fue inhibida por exceso de ADN. Además, al no observarse la banda específica de 500 pb, y al ver una reacción en los controles positivos y la ausencia de bandas en los controles sin templado (NTC), pudimos confirmar que las células HeLa estaban libres de micoplasma y eran aptas para su uso en cultivo.

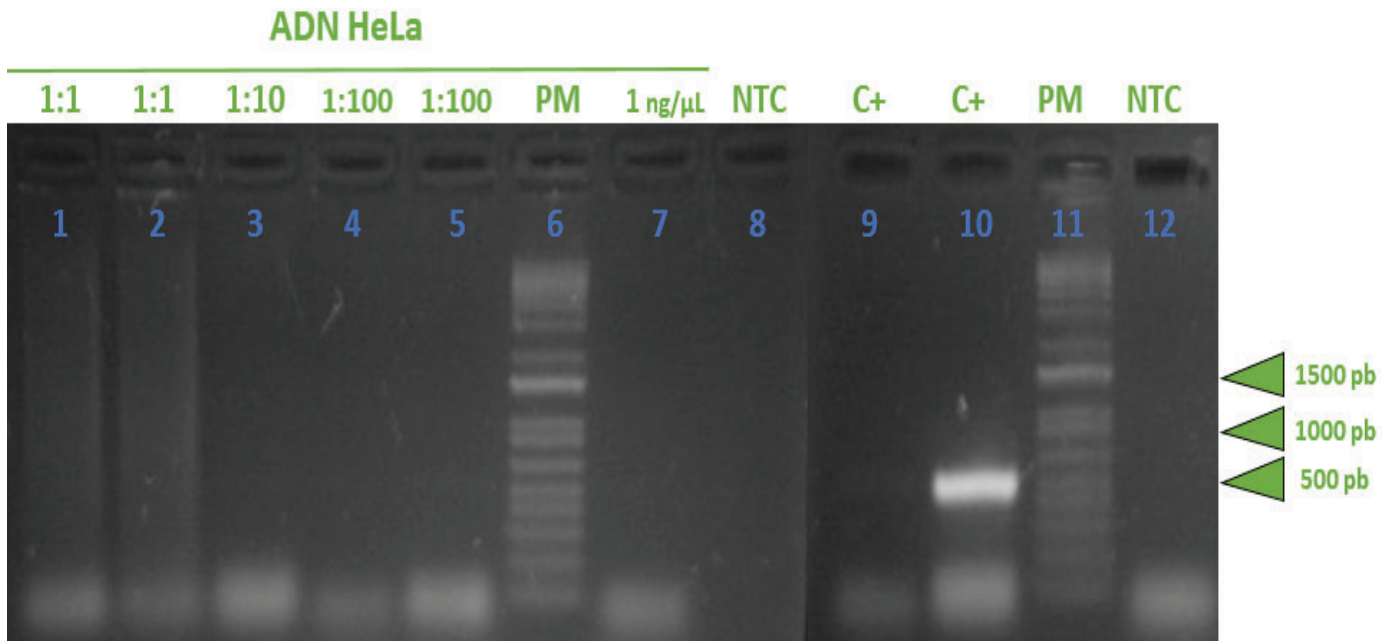


Figura 18. Electroforesis en gel de agarosa para la determinación de micoplasma por PCR en células HeLa. Calles: C+: ADN JEG-3 contaminado con micoplasma, NTC: controles sin templado. PM: marcador de peso molecular de 100 a 15000 pb.

Ensayos de infección en monocapa

Mediante microscopía de fluorescencia se determinó el porcentaje de células infectadas para cada línea celular infectada con K98-GFP y VD-*wt*. En cada fotografía se contabilizó el número total de células y el número de células infectadas (**Tablas A1 a A6**, Anexo). Este recuento se llevó a cabo mediante el conteo de los núcleos celulares (**Figura 19**), así como de los núcleos y kinetoplastos de los amastigotes (**Figura 19 Zoom**, flechas amarillas), que se visualizaron en azul gracias a la tinción con DAPI .

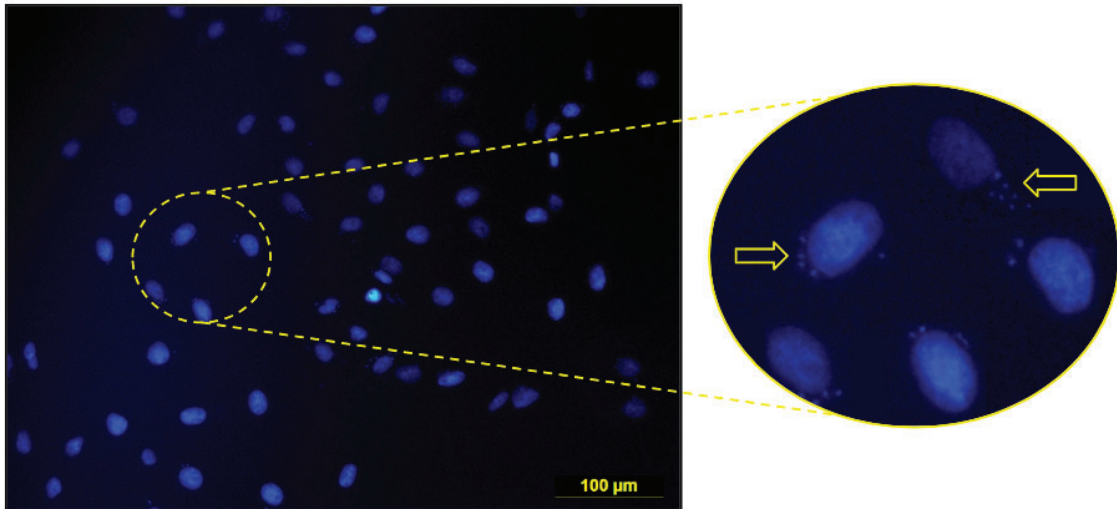


Figura 19. Infección con *T. cruzi* K98-GFP. Imagen 20X del Microscopio de fluorescencia: Tripomastigotes K98-GFP vs Células Vero (20:1) por 48 hs en donde se muestra la marcación con Dapi (azul). **Zoom 40X:** Las flechas amarillas señalan los núcleos y kinetoplastos de los amastigotes en las células Vero infectadas.

El porcentaje de infección en células BeWo por el clon K98-GFP fue de $51,20 \pm 3,44\%$ (media \pm DE), mientras que con VD-*wt* fue de $3,84 \pm 0,18\%$. En las células HeLa, la infección con K98-GFP alcanzó el $16,69 \pm 0,88\%$, frente al $7,43 \pm 0,74\%$ observado con VD-*wt*. Por último, en células Vero, los porcentajes de infección fueron de $28,07 \pm 4,07\%$ para K98-GFP y de $17,22 \pm 1,52\%$ para VD-*wt* (**Figura 20**).

El análisis estadístico, realizado mediante la prueba de Análisis de Varianza (ANOVA) de una vía seguida por un test de comparación múltiple de Bonferroni, reveló que el porcentaje de células infectadas fue significativamente mayor al utilizar K98-GFP en comparación con la cepa VD-*wt* en las tres líneas celulares.

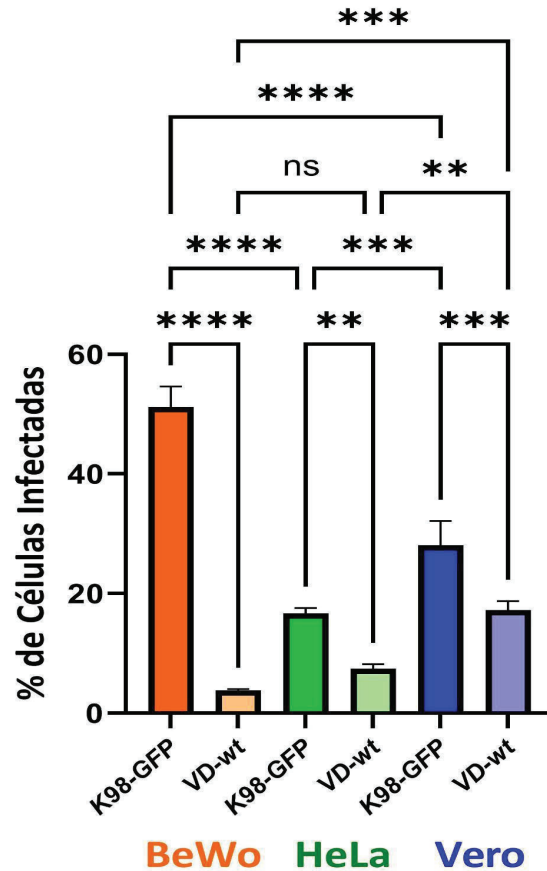


Figura 20. Infecciones en cultivos 2D con MOI 20:1. Gráfico de barras del porcentaje de células infectadas obtenidas para las líneas celulares Bewo, HeLa y Vero empleando los clones parasitarios K98-GFP y VD-wt de *T.cruzi*. Los resultados se muestran como el promedio con su desviación estándar (*corresponden a diferencias significativas ANOVA, Bonferroni: **** $P \leq 0,0001$ *** $P \leq 0,001$ ** $P \leq 0,01$ * $P \leq 0,05$ ns $P > 0,05$).

Quantificación de carga parasitaria por PCR cuantitativa en tiempo real

Al analizar la curva de amplificación obtenida para *GAPDH* (Figura 21 A), se observó amplificación en las seis muestras por duplicado, con valores de Ct entre 23 y 27, aproximadamente, utilizando un umbral (*threshold*) de 650,62 (valor asignado automáticamente por el software del termociclador). En los controles sin templado no se detectó amplificación, lo que confirmó la ausencia de contaminación de ADN en los reactivos o durante la reacción.

En relación con el gráfico de la derivada ($-dF/dT$) vs. temperatura (Figura 21 B), se observó que los productos presentaron una temperatura de fusión (T_m) de 79 °C y reproducible en todas las muestras. Además, la curva mostró un único pico para cada una de las muestras analizadas, lo que indica que se obtuvo un producto de amplificación específico.

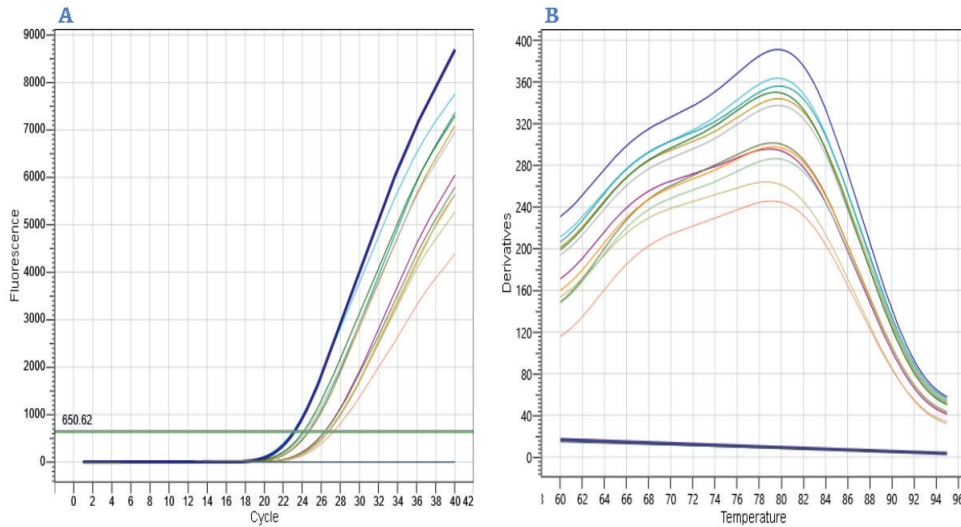


Figura 21. A: Curva de amplificación: Fluorescencia vs Número de ciclos para GAPDH. **B:** Gráfico de $-dF/dT$ vs temperatura (°C) para GAPDH.

En relación con la curva de amplificación obtenida para *EF-1 α* (**Figura 22 A**), se observó amplificación en las seis muestras por duplicado, con valores de Ct entre 23 y 29, aproximadamente, utilizando un *threshold* de 650,62 (valor asignado automáticamente por el software del termociclador). Sin embargo, en los controles sin templado se detectó amplificación, con un valor de Ct de 35.

Al analizar la derivada ($-dF/dT$) vs. temperatura (**Figura 22 B**), se observó que todas las muestras presentaron una misma T_m de 79 °C. En cambio, los controles sin templado mostraron un pico a una T_m inferior (72 °C), lo que sugiere la presencia de amplicones más cortos o con un contenido de GC diferente, característico de dímeros de cebadores.

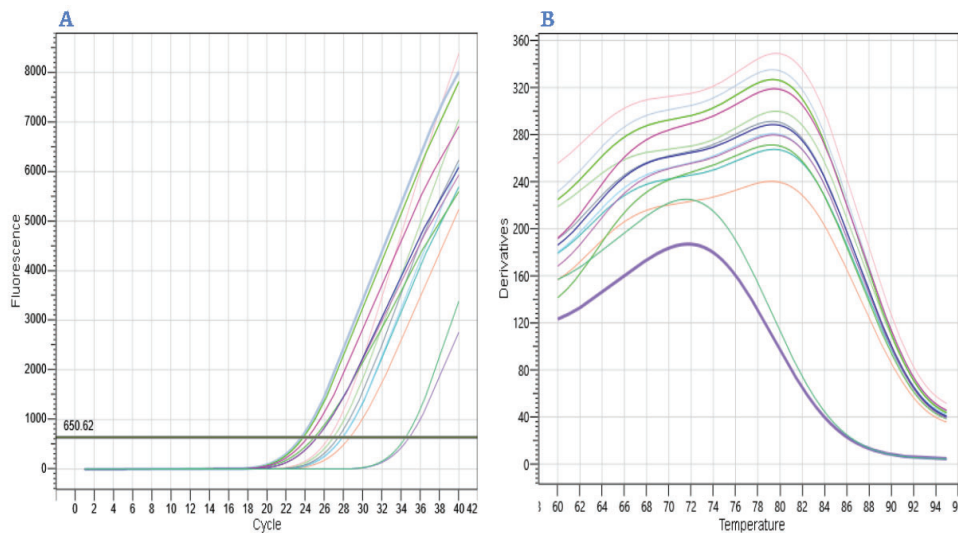


Figura 22. A: Curva de amplificación: Fluorescencia vs Número de ciclos para *EF-1 α* . **B:** Gráfico de $-dF/dT$ vs temperatura (°C) para *EF-1 α* .

Curvas estándar para cuantificación

El ensayo de PCR cuantitativa para la curva estándar de *GAPDH* en células HeLa (**Figura 23 A**) mostró una eficiencia del 95%. En cuanto a la curva para *EF-1 α* de K98-GFP (**Figura 23 B**) se obtuvo una eficiencia del 102%, mientras que la de *VD-wt* (**Figura 23 C**) presentó una del 88%. Las tres curvas mostraron una buena eficiencia de reacción, ya que sus pendientes estuvieron cerca del valor ideal de -3,32. Sin embargo, la curva estándar de *EF-1 α* para el clon *VD-wt* fue la que más se desvió de este valor (0,32), lo que refleja la menor eficiencia entre las tres. En términos de linealidad, las tres curvas presentaron un R^2 cercano a 1 (0,99 y 0,98), lo que indicó una fuerte correlación lineal, con solo pequeñas desviaciones de los datos con respecto a la recta.

Considerando lo mencionado anteriormente, se puede afirmar que estas tres curvas estándar son adecuadas para la cuantificación de las muestras de forma precisa y eficiente.

Es importante señalar que, en las curvas estándar de *GAPDH* y *EF-1 α* para *VD-wt*, se eliminó el punto correspondiente a la muestra sin diluir (6×10^6 células totales para *GAPDH* y 2×10^5 parásitos totales para *EF-1 α* *VD*). ya que se encontraba fuera de la recta, afectando la eficiencia de la misma. Por esta razón, dichas curvas tienen 5 puntos, mientras que la curva de *EF-1 α* para K98-GFP cuenta con 6 puntos (todas por triplicado).

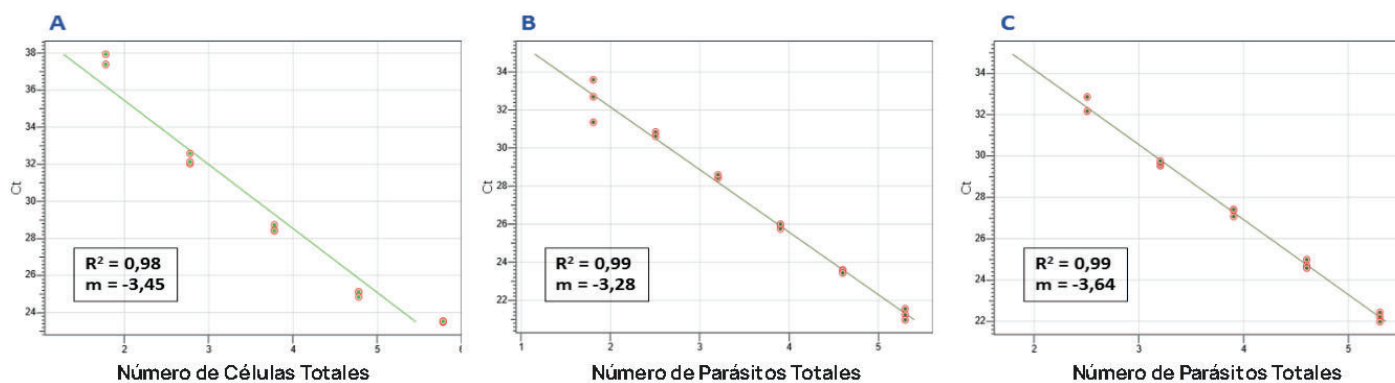


Figura 23. Curvas estándar. Umbral de ciclo en función de células y parásitos totales. A: Curva estándar de *GAPDH* en células HeLa. **B:** Curva estándar de *EF-1 α* para K98-GFP. **C:** Curva estándar de *EF-1 α* para *VD-wt*. R^2 : coeficiente de determinación, m : pendiente de la recta.

Utilizando estas 3 curvas estándar, se interpolaron los valores de Ct obtenidos para las muestras de células HeLa infectadas con ambos stocks parasitarios, determinando así el número de células HeLa y de parásitos K98-GFP y *VD-wt*.

Para determinar el número de células HeLa, se empleó la curva estándar del gen *GAPDH* (**Figura 23 A**) y se interpolaron los valores de Ct obtenidos de las muestras infectadas con

K98-GFP (**Figura 24 A**) y VD-wt (**Figura 24 B**). En ambas curvas, los valores de Ct de las muestras analizadas se encuentran dentro del rango dinámico lineal.

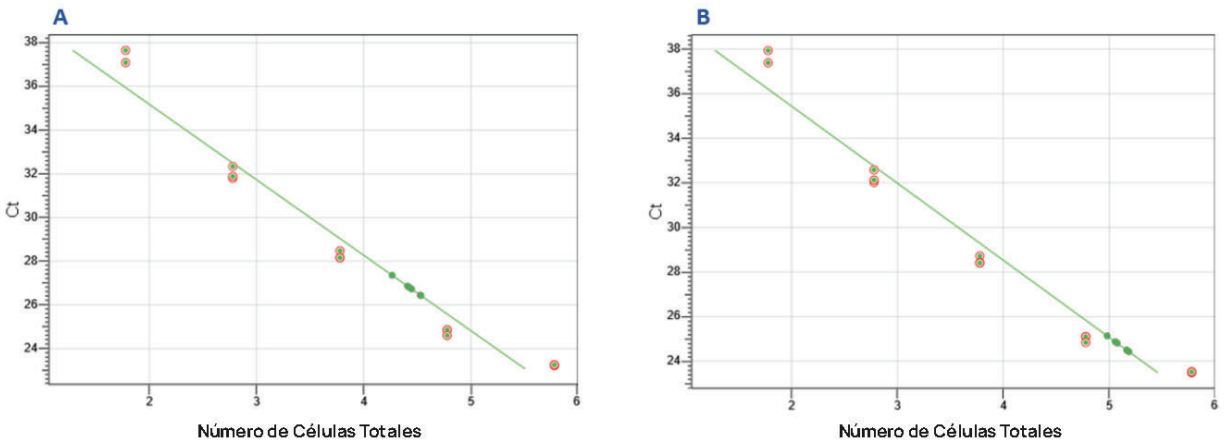


Figura 24. Curvas estándar de *GAPDH* con valores de Ct obtenidos de las muestras. **A:** Células HeLa infectadas con K98-GFP. **B:** Células HeLa infectadas con VD-wt.

En cuanto a la cuantificación de los parásitos, utilizamos las curvas estándar de *EF-1 α* (**Figura 23 B** para K98-GFP y **Figura 23 C** para VD-wt), interpolando los valores de Ct obtenidos de las muestras infectadas con K98-GFP (**Figura 25 A**) y VD-wt (**Figura 25 B**). En ambas determinaciones, se observó que los valores de Ct de las muestras evaluadas se encuentran dentro del rango dinámico lineal de cada curva.

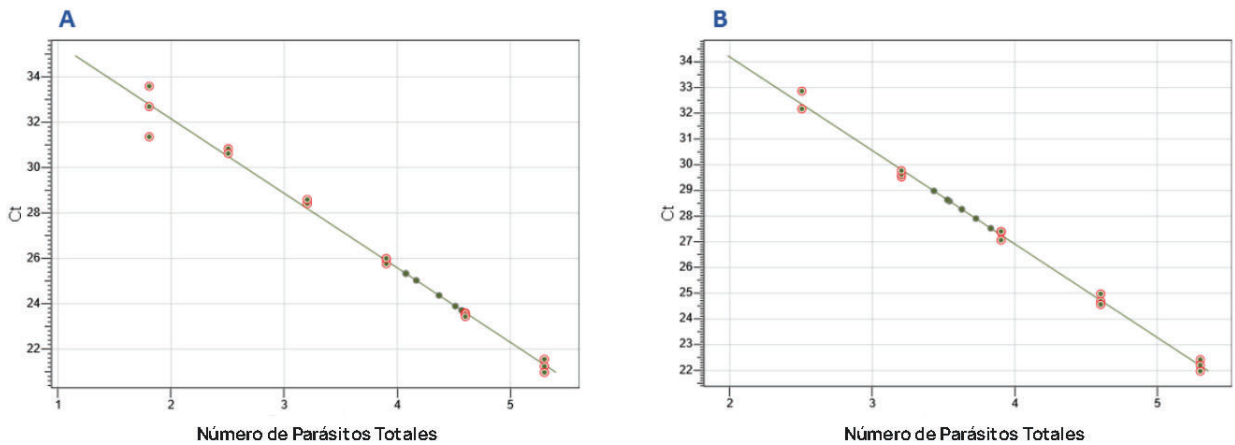


Figura 25. Curvas estándar de *EF-1 α* con valores de Ct obtenidos de las muestras. **A:** Células HeLa infectadas con K98-GFP. **B:** Células HeLa infectadas con VD-wt.

Una vez obtenido el número de células HeLa y de ambos stocks de parásitos presentes en las muestras, calculamos su carga parasitaria, determinando la relación entre el número de parásitos presentes por célula HeLa (**Tablas A7 y A8**, Anexo).

El número de parásitos de K98-GFP por célula HeLa fue de $0,77 \pm 0,35$ (media \pm DE), mientras que para VD-*wt* fue de $0,033 \pm 0,0044$ parásitos por célula (**Figura 26**). Mientras que en la línea celular BeWo, el número de parásitos K98-GFP por célula fue de $1,70 \pm 0,18$, y para VD-*wt* fue de $0,12 \pm 0,02$ parásitos por célula (**Figura 26**).

El análisis estadístico mediante la prueba de ANOVA de una vía junto al test de comparación múltiple de Bonferroni nos indicó que se obtuvo un número de parásitos por célula significativamente mayor al utilizar K98-GFP en comparación a VD-*wt* para ambas líneas celulares.

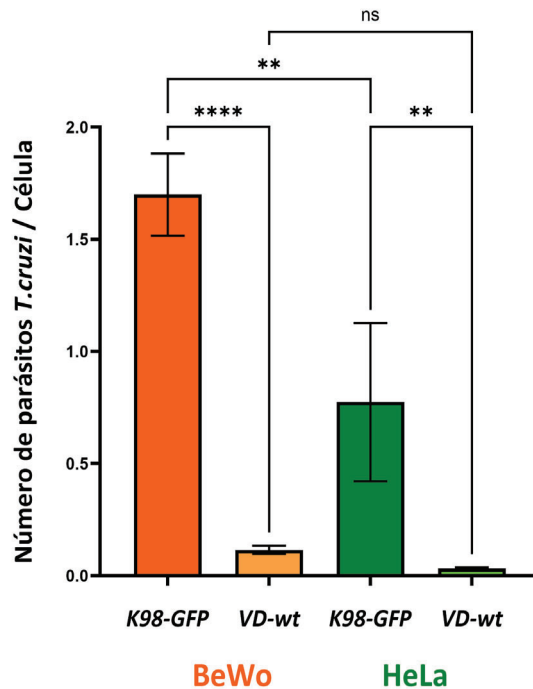


Figura 26. Parásitos por células BeWo y HeLa. Gráfico de barras del número de parásitos por células BeWo y HeLa empleando los clones parasitarios K98-GFP y VD-*wt* de *T. cruzi*. Los resultados se muestran como la media con su desviación estándar (*corresponden a diferencias significativas ANOVA, Bonferroni: **** $P \leq 0,0001$ *** $P \leq 0,001$ ** $P \leq 0,01$ * $P \leq 0,05$ ns $P > 0,05$)

Cultivo de células BeWo en 3D

Se generaron cultivos 3D utilizando la línea celular BeWo y el sistema 3D-Petri Dish®. Para esto, los moldes de silicona se rellenaron con agarosa fundida y una vez que el gel solidificó, se les flexionaron las puntas para facilitar la separación de los Petri Dish® 3D de agarosa formados. Así se obtuvieron ambos micromoldes, como se muestra en la **Figura 27**. Estos adquirieron un tono rosado tras ser equilibrados con DMEM-F12 al 10% de SFB.

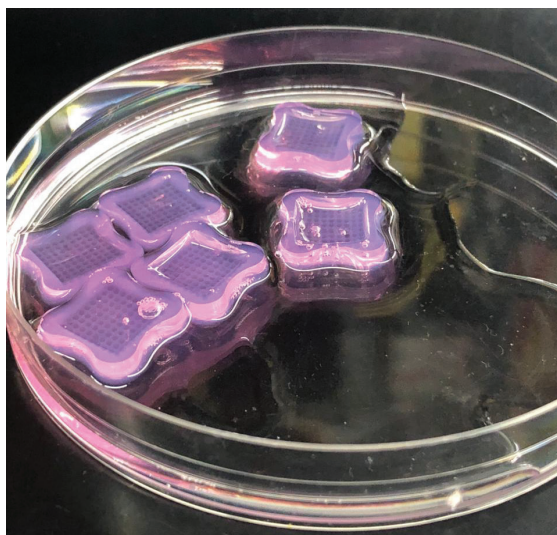


Figura 27. Petri Dish® 3D *large* y *small* de agarosa para generar cultivos tridimensionales de células BeWo.

Después de tres días de incubación de las células BeWo en ambos Petri Dish® 3D, pudimos observar mediante el microscopio invertido que ambos tipos de esferoides se habían formado de manera uniforme, tal como se aprecia en la **Figura 28**.

Al analizar las imágenes de ambos tipos de esferoides, obtuvimos las mediciones de área, radio y diámetro teórico, junto con sus respectivas desviaciones estándar (Tablas A9 y A10, Anexo). Esto nos permitió calcular el diámetro teórico de los esferoides formados: los *large* presentaron un diámetro de $341,30 \pm 24,52 \mu\text{m}$ (media \pm DE) al sembrar 1000 células por micropocillo, mientras que los *small* mostraron uno de $163,28 \pm 6,98 \mu\text{m}$ al sembrar 316 células por micropocillo.

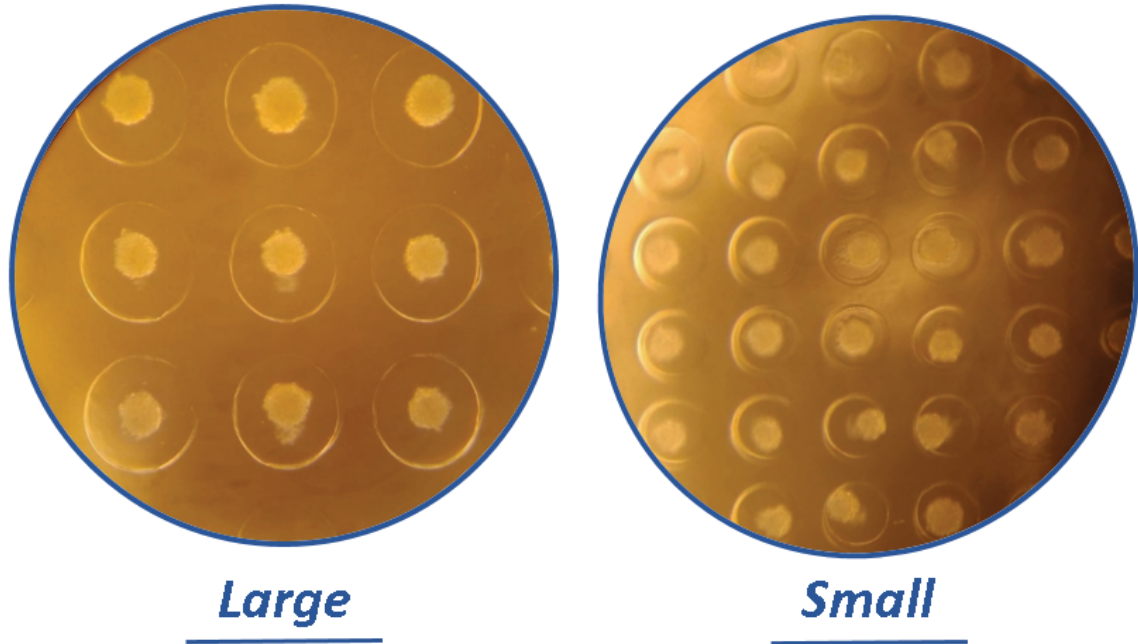


Figura 28. Esferoides large y small. Imágenes 10X obtenidas por el microscopio invertido de los esferoides obtenidos luego de tres días de cultivo.

Al comparar con los resultados previos obtenidos en el LabMECh (*Figura 29*), se observó que los esferoides *large* presentaron un diámetro teórico promedio de $284,48 \pm 2,79$ mientras que los *small* alcanzaron uno de $154,84 \pm 1,53$ μm .

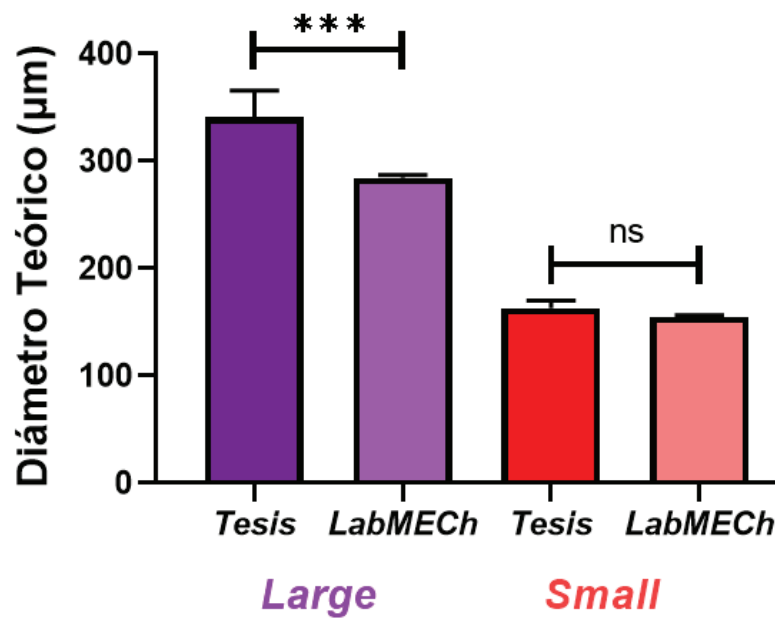


Figura 29. Diámetro teórico de Esferoides. Comparación del diámetro teórico de esferoides *large* y *small* obtenidos en este trabajo con antecedentes del laboratorio. Los resultados se muestran como la media

con su desviación estándar (* corresponden a diferencias significativas ANOVA, Bonferroni: *** $P \leq 0,001$ ** $P \leq 0,01$ * $P \leq 0,05$; ns $P > 0,05$).

El análisis estadístico de los diámetros teóricos obtenidos en este trabajo comparados con los previamente realizados en el laboratorio reveló que no existen diferencias significativas en los valores correspondientes a los esferoides *small*. Sin embargo, para los esferoides *large*, se observaron diferencias significativas entre ambos valores.

Discusión

El objetivo general de este trabajo fue desarrollar y aplicar distintos modelos *in vitro* de infección con diferentes cepas de *T. cruzi*, que permitieran recrear la interacción parásito-hospedador, con un enfoque en la transmisión congénita, para estudiar los mecanismos de invasión y el tropismo placentario.

Los modelos más populares de cultivo celular son 2D, en estos las células se adhieren a una superficie plana como soporte, formando monocapas. Este método es el más empleado debido a que es simple y conveniente; de esta manera ha sido un método invaluable que continúa proporcionando información y conocimiento crucial al ser empleado para modelar enfermedades (125, 126). En este contexto, los modelos bidimensionales *in vitro*, como las líneas trofoblásticas humanas BeWo, se emplean con frecuencia como sistemas hospedadores en estudios de transmisión e infección placentaria de *T. cruzi* y permiten realizar estudios reproducibles que dan lugar a datos con significancia estadística (103, 104). Sin embargo, cuando las células crecen adheridas a superficies planas puede modificar su metabolismo y funcionamiento (125). Además, las interacciones célula-célula y célula-matriz extracelular se reducen, y el nivel de respuesta celular es limitado (127). Frente a esta limitación, los cultivos tridimensionales (3D) son una buena alternativa, dado que son fisiológicamente relevantes y una buena opción porque imitan la microarquitectura de los tejidos y puede proporcionar un entorno similar al que se encuentra en las infecciones naturales (108). Se han desarrollado modelos 3D de infección transplacentaria por *T. cruzi* utilizando células del trofoblasto, empleando la línea celular de trofoblastos Jeg-3, en combinación con células endoteliales microvasculares del cerebro humano. Sin embargo, este modelo de esferoide es refractario a la infección por *T. cruzi* (114).

Las cepas de *T. cruzi* influyen en la respuesta placentaria a la infección y se clasifican en seis Unidades Discretas de Tipificación (UDTs) con distribución y ciclos de transmisión específicos (10, 11). Además, se ha descrito el tropismo tisular de diferentes cepas de *T. cruzi* en la placenta en modelo murino (86), por ejemplo: la cepa Colombiana (TcI) presenta una alta incidencia de parasitismo placentario (98%), mientras que la cepa Y (TcII) infecta solo el 17% de las placentas. Además, se identificaron diferencias en la respuesta del microambiente placentario tras la infección crónica con cepas pertenecientes a diferentes UDTs: K98 (UDT I, aislada de un paciente con Chagas crónico) y VD (UDT VI aislada de un caso congénito) presentan tropismo placentario diferencial en ratones (87).

En este estudio, se utilizaron cultivos 2D y 3D de líneas celulares trofoblásticas humanas BeWo, junto con líneas celulares no placentarias (HeLa y Vero) como controles, con el fin de evaluar las diferencias en la infectividad de las cepas K98 y VD de *T. cruzi*.

En el trabajo con células en cultivo, uno de los controles más importantes es la detección de micoplasma. Por esta razón, antes de iniciar los experimentos con células HeLa, realizamos

un ensayo de detección de micoplasma mediante PCR en tiempo real, protocolo que también se aplica cada vez que se incorporan nuevas líneas celulares a nuestro Instituto.

Este análisis fue crucial para asegurar la esterilidad de los cultivos utilizados por los diferentes grupos de trabajo y para garantizar la validez de los resultados experimentales en los ensayos de infección en monocapa. La contaminación por micoplasma en un cultivo podría sesgar las comparaciones entre las diferentes líneas celulares, lo que afectaría significativamente la interpretación de los resultados.

Los micoplasmas son las bacterias autorreplicantes más pequeñas y simples, contienen el conjunto mínimo de orgánulos esenciales para el crecimiento y la replicación: una membrana plasmática, ribosomas y un genoma que consiste en una molécula de ADN circular de doble cadena. A diferencia de todos los demás procariontes, los micoplasmas no tienen pared celular (128). Estos microorganismos dependen obligatoriamente de células eucariotas y sus características fisiológicas les permiten proliferar de manera inadvertida en cultivos celulares durante largos períodos de tiempo obteniendo nutrientes del medio de cultivo celular y de los metabolitos celulares. Su principal desventaja es que pasan inadvertidos durante la inspección microscópica de rutina de las células, además no causan muerte celular inmediata ni turbidez en el medio, y no son afectados por antibióticos que actúan sobre la pared celular o la síntesis de proteínas. La principal fuente de contaminación son cultivos celulares infectados y su contaminación cruzada con otros cultivos por prácticas inadecuadas en el cuarto de cultivo. Otras posibles fuentes, como el SFB o suplementos de cultivo celular e incubadoras, se consideran menos probables para contribuir significativamente a las altas tasas de contaminación (120).

Por lo tanto, empleamos la PCR como método de detección y control de calidad de las células HeLa donadas por la Dra Valeria Tekiel. Este se basa en la amplificación específica del ADN que codifica para el ARNr 16S de micoplasma mediante la PCR que posee unos 500 pb aproximadamente. Este proceso utiliza oligonucleótidos que se hibridan a secuencias específicas del ADN micoplasmático, permitiendo una detección altamente sensible de contaminación por micoplasma en cultivos celulares (120).

Un aspecto relevante es que existen 183 especies de estas bacterias, de las cuales 16 se han aislado en humanos (129). Para su detección, se emplea una combinación de siete cebadores sentido y tres antisentido, con cuatro de ellos diseñados como degenerados. Este diseño permite abarcar la mayor cantidad posible de especies de micoplasmas, incluso aquellas que difieren en un solo nucleótido. De este modo, se garantiza un apareamiento completo entre el cebador y el sitio de reconocimiento en el gen del ARNr 16S, mejorando significativamente la sensibilidad del método.

Al emplear un cultivo de células HeLa en confluencia para llevar a cabo la extracción de ADN, contamos con una alta concentración de ADN celular; por ende fue crucial determinar la concentración adecuada que no inhiba la PCR y se lleve correctamente.

En caso de que las células HeLa hubiesen estado contaminadas con micoplasma antes de los ensayos de infección con tripomastigotes de K98-GFP y VD-*wt*, es probable que el número de parásitos por célula se hubiera visto afectado, generando resultados erróneos.

La presencia de micoplasma podría influir en diversos factores que afectan el cultivo celular y la infección por parásitos. Estas bacterias alteran las condiciones del medio al consumir nutrientes esenciales, lo que repercute en el metabolismo celular y genera un entorno menos propicio para la replicación de los parásitos. Además, el micoplasma puede modificar la expresión o la estructura de receptores celulares clave, dificultando la adhesión e ingreso de los parásitos a las células hospedadoras y, en consecuencia, afectando la dinámica de la infección. Por último, sus efectos inmunomoduladores, como la activación de vías inmunológicas en las células hospedadoras, pueden interferir con la capacidad de los parásitos para establecer una infección eficiente. Por último, al afectar la proliferación celular, pueden reducir el número total de células disponibles reduciendo el número de células infectadas en el ensayo (130, 131, 132, 133).

Por lo tanto, fue fundamental trabajar con cultivos libres de micoplasma para asegurar la obtención de datos confiables y evitar interpretaciones erróneas de los resultados experimentales en esta tesina.

Una vez confirmado que la línea celular HeLa no presentaba contaminación con micoplasma llevamos a cabo los ensayos de infección en monocapa. Los resultados obtenidos apoyan la hipótesis planteada debido a que se obtuvieron diferencias significativas en el porcentaje de células infectadas según la línea hospedadora y el clon parasitario empleado durante la infección.

Es interesante notar que el *stock* obtenido de un caso congénito mostró una mayor infección en la línea celular epitelial de riñón de mono verde africano, Vero (17,22%) y la línea celular epitelial humana HeLa (7,43%), que en la células BeWo (3,84%). Es decir, resultó menos infectiva en la línea de trofoblastos humanos, evidenciando además menor tropismo por trofoblastos que la cepa K98 derivada de un caso no congénito en donde se apreció 51,20% de infección (28,07% en Vero y 16,69% en HeLa, como control).

Se ha reportado previamente que la cepa VD (TcVI), aislada de un caso de Chagas congénito, presenta un mayor tropismo por la placenta murina en comparación con la cepa K98 (TcI), conocida por su baja infectividad (87). Además, estudios en explantes *ex vivo* de vellosidades coriónicas han mostrado que la cepa VD genera una mayor carga parasitaria en tejido placentario que la cepa no congénita Y (88), aunque hasta el momento no se han realizado

experimentos similares con K98. Estas diferencias resaltan la influencia crítica del hospedero en el tropismo y la virulencia de las cepas de *T. cruzi*, evidenciando la complejidad de las interacciones parásito-hospedero en contextos de infección congénita.

En este contexto, no podemos descartar la posibilidad de que la cepa VD se haya modificado genéticamente debido a su prolongado cultivo en condiciones *in vitro* (134) y se haya atenuado su infectividad. Se ha descrito el aumento en número de copias y de mutaciones en genes de familias multigénicas de *T. cruzi* asociadas a su virulencia como las trans sialidasas, las mucinas y las MASP, que pueden modificar el fenotipo de un stock parasitario luego de cierto número de pasajes en líneas de cultivo *in vitro* después de varias generaciones (135). De todos modos, es atractivo especular que la vía de transmisión de VD no haya sido a través del trofoblasto. Por ende, es de interés poder estudiar el comportamiento de VD en el modelo 3D, que posibilita observar si la cepa migra entre células trofoblásticas en vez de infectarlas. Futuros estudios trabajando con esferoides compuestos por más de un tipo de tejido serán necesarios para probar esta hipótesis.

En cuanto a las células HeLa se registró un porcentaje de infección mayor para K98 que para VD. Esta es considerada altamente infectiva en modelo experimental murino (134) pero su infectividad en células HeLa no había sido caracterizada anteriormente, por lo que este comportamiento podría ser específico de esta línea celular humana. Además, no podemos descartar la posibilidad de que VD se encuentra atenuado como se mencionó anteriormente. Además, este ensayo ha puesto de manifiesto las limitaciones inherentes al uso de cultivos 2D, destacando la necesidad de avanzar en investigaciones que empleen modelos 3D para una comprensión integral de los procesos biológicos estudiados.

En estos ensayos de infección, inicialmente se planteó detectar las infecciones de manera rápida y sencilla mediante la fluorescencia de los clones transgénicos bajo el microscopio. Este enfoque permitiría identificar fácilmente las células infectadas, reduciendo el margen de error en el recuento, como se muestra en la **Figura 30**. Sin embargo, la pérdida de fluorescencia en el estadio de tripomastigote metacíclico del clon VD-RFP hizo inviable su uso en los experimentos, lo que obligó a trabajar con la variante *wild type* (VD-*wt*) para cumplir con los objetivos planteados.

Debido a esta limitación, el recuento de células infectadas no pudo realizarse mediante la fluorescencia de las proteínas, y se optó por estandarizar la metodología utilizando DAPI para visualizar tanto las infecciones con VD-*wt* como con K98-GFP. Este enfoque permitió comparar de manera consistente los resultados obtenidos con ambos stocks parasitarios.

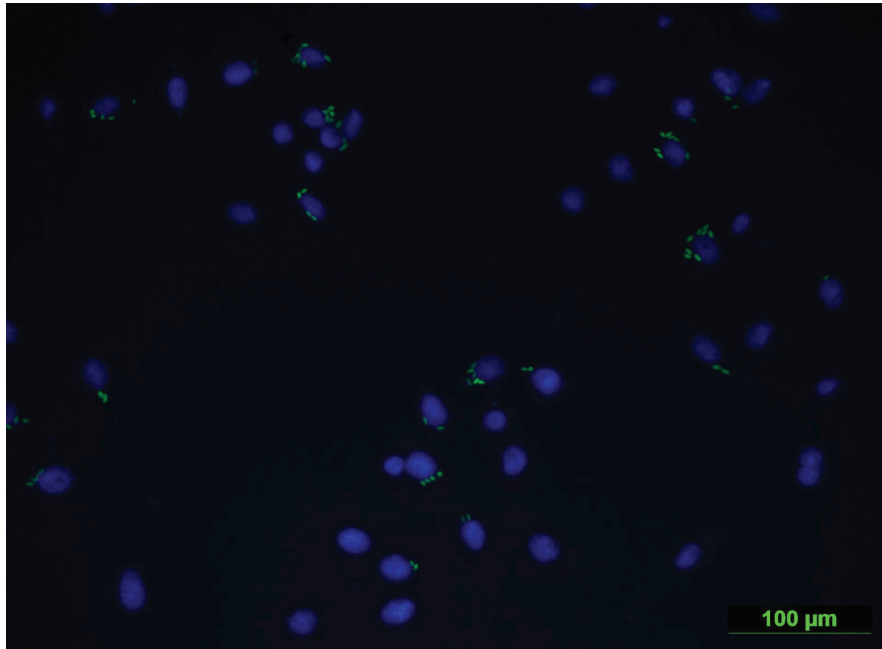


Figura 30. Infección con *T. cruzi* K98-GFP. Imagen 20X Microscopio de fluorescencia Leica DM2500 LED: Tripomastigotes K98-GFP vs Células Vero (20:1) por 48 hs. Se observa la marcación con Dapi (azul) y GFP (verde) en la unión de las imágenes.

La pérdida de fluorescencia o diferencia en la expresión de proteínas fluorescentes (GFP y RFP) entre los clones K98 y VD de *Trypanosoma cruzi* en sus diferentes estadios puede deberse a diversos factores relacionados con la regulación genética y el comportamiento específico del vector de expresión en cada clon.

En cuanto a los promotores específicos del vector, el clon K98-GFP probablemente utiliza un promotor constitutivo o uno que se mantiene activo en ambos estadios, permitiendo la expresión estable de la proteína GFP tanto en su estadio de amastigote como de tripomastigote. Por otro lado, el clon VD-RFP puede estar utilizando un promotor específico en su estadio de epimastigote que se desactiva durante la diferenciación a tripomastigote, lo cual es común en *T. cruzi* debido a las diferencias en la regulación transcripcional y postranscripcional entre estadios (137, 138).

Por otro lado, en *T. cruzi* la expresión génica depende principalmente de la regulación postranscripcional. Es posible que el ARNm de la RFP en el clon VD sea menos estable o más susceptible a degradación en los tripomastigotes, mientras que el ARNm de GFP en el clon K98 se mantenga estable y traducible en ambos estadios. La integración del vector de RFP en el clon VD podría haber ocurrido en un locus que está sujeto a silenciamiento transcripcional en los tripomastigotes, mientras que el vector de GFP en el clon K98 podría estar en un locus que permite una expresión continua. Las diferencias en la accesibilidad de la cromatina en cada estadio del parásito también pueden influir en la expresión diferencial (138).

Por otro lado, la estabilidad diferencial de ambas proteínas fluorescentes podría haber contribuido a la pérdida de fluorescencia observada en VD-RFP. Es posible que la proteína roja fluorescente sea más susceptible a la degradación bajo las condiciones metabólicas y proteolíticas específicas de los tripomastigotes, en comparación con la proteína verde, que tiende a ser más estable en diferentes condiciones. Estudios en proteínas fluorescentes han demostrado que la GFP y sus variantes poseen una mayor resistencia al *photobleaching*, es decir, mantiene su capacidad de emitir fluorescencia durante períodos prolongados de irradiación en comparación con muchas RFP. Esto se debe a su estructura química, que la hace menos propensa a degradarse bajo exposición prolongada a la luz intensa. Además, las GFP suelen mostrar mayor tolerancia a variaciones en el pH y otras condiciones ambientales. También tienen un tiempo de maduración más rápido, lo que les permite alcanzar niveles óptimos de fluorescencia más rápido que muchas RFP (139, 140).

Un parámetro crucial a verificar al trabajar con el clon K98-GFP fue si sus parámetros de infección fueron similares que la *wild type* en las líneas celulares empleadas. La integración del vector pTREX en el parásito transgénico no modifica sus principales características biológicas de la cepa *wild type* sino que se mantienen inalteradas. Entre ellas se encuentran: forma y tamaño del parásito, niveles de parasitemia, variación de peso corporal y producción de anticuerpos IgG anti-*T. cruzi* en ratones infectados, tropismo tisular y características histopatológicas (119).

Además, en el LaBMECh se realizaron infecciones en monocapa con la línea celular BeWo y la cepa K98 y el clon K98-GFP a una MOI de 20:1 para verificar dicha premisa. Los resultados obtenidos son comparables en términos del porcentaje de células infectadas: $48,50 \pm 15,72\%$ (media \pm DE) para la cepa salvaje y $51,20 \pm 3,44\%$ para la recombinante portadora de pTREX-GFP. Por lo tanto, inferimos que este comportamiento se mantiene en las líneas celulares Vero y HeLa al trabajar con el clon o la *wild type*.

Durante la diferenciación de los tripomastigotes metacíclicos en la línea celular en la que se llevó a cabo el ensayo de infección, se observaron diferencias en los tiempos de diferenciación de amastigote a tripomastigote según el *stock* parasitario y la línea celular utilizada.

En células HeLa, los tripomastigotes de K98-GFP, detectados por su fluorescencia verde, aparecieron entre el cuarto y quinto día post-infección, mientras que los de VD-*wt* se observaron a partir del quinto día. En células BeWo y Vero, los tripomastigotes de K98-GFP se detectaron entre el quinto y séptimo día, mientras que los de VD-*wt* necesitaron más tiempo para diferenciarse, apareciendo entre el séptimo y décimo día.

La diferenciación de *Trypanosoma cruzi* de amastigotes a tripomastigotes puede variar significativamente según las características y el ambiente proporcionado por las distintas líneas celulares y las características del parásito.

Las líneas celulares hospederas utilizadas en esta tesis, como BeWo, HeLa y Vero, tienen un impacto significativo en los tiempos y la eficiencia de la diferenciación del parásito. Las características específicas de cada línea celular, tales como su metabolismo, capacidad de internalización y microambiente intracelular, pueden influir en este proceso, afectando de manera directa la dinámica de diferenciación. La variabilidad entre cepas influye en los tiempos de diferenciación, lo cual está relacionado con diferencias genéticas y moleculares, como las variaciones en los genes involucrados en la adhesión celular, por ejemplo, las proteínas de la familia amastina (141, 142, 143).

En cuanto a las condiciones ambientales, factores como el pH ácido y la disponibilidad de nutrientes son determinantes en la diferenciación. Condiciones ácidas, por ejemplo, pueden acelerar la transformación de tripomastigotes a amastigotes extracelulares en ciertas cepas (142, 144). Las interacciones entre el huésped y el parásito son también fundamentales, ya que *T. cruzi* induce modificaciones en el citoesqueleto de las células hospedadoras durante su invasión, facilitando la internalización y posterior diferenciación intracelular. Estas modificaciones incluyen la formación de pseudópodos, soportados por filamentos de actina, que son esenciales para la internalización de los tripomastigotes y la formación de vacuolas parasitóforas (142, 144).

En modelos tridimensionales de cultivo, las interacciones entre el parásito y el huésped pueden simular mejor las condiciones *in vivo*, alterando los tiempos de diferenciación observados en comparación con los modelos bidimensionales (145, 146, 147).

Las implicaciones biológicas de estas variaciones en los tiempos de diferenciación podrían reflejar adaptaciones evolutivas del parásito (148, 149). Por ejemplo, cepas como VD que presentaron tiempos de diferenciación más largos, podrían estar empleando mecanismos de evasión inmune o estrategias de supervivencia a largo plazo.

En base a los resultados obtenidos apreciamos que la interacción entre *T. cruzi* y las líneas celulares es compleja, con múltiples factores que influyen en la eficiencia de la invasión y su posterior diferenciación. Los tiempos observados dependen de la combinación de las características genéticas del parásito y las propiedades del ambiente intracelular proporcionado por las células hospedadoras. Estudios adicionales en modelos tridimensionales podrían proporcionar más información sobre estas dinámicas.

La PCR cuantitativa en tiempo real se basa en la premisa de que existe una relación logarítmica entre la cantidad de ADN blanco inicial y el número de ciclo en el cual la fluorescencia supera el umbral (Ct). De esta manera, para estimar la concentración de ADN presente en una muestra incógnita se emplea una curva estándar construida a partir de cantidades conocidas del ADN blanco. Esto requiere la cuantificación precisa de un estándar utilizando metodologías independientes como el recuento directo del microorganismo (150).

Siguiendo esta premisa, logramos realizar exitosamente una PCR cuantitativa en tiempo real para estimar la carga de parásitos por célula HeLa en cepas de diferentes UDT como K98 y VD. El clon K98-GFP mostró un mayor número de parásitos por célula HeLa (0,77 par/cel) en comparación con VD (0,033 par/cel). Este resultado coincide con los hallazgos obtenidos en los ensayos de infección en monocapa observados mediante microscopía. Al comparar estos resultados con los obtenidos en LaBMECh para células BeWo, se observó un patrón similar, ya que el número de parásitos por célula fue significativamente mayor en K98-GFP (1,70 par/cel) en comparación con VD-*wt* (0,12 par/cel).

La técnica de qPCR ofrece ventajas significativas sobre los métodos tradicionales de cultivo para la determinación de la carga parasitaria, optimizando tanto la precisión como la eficiencia del análisis. Su alta sensibilidad y especificidad permiten detectar mínimas cantidades de ADN, lo que resulta crucial para identificar infecciones en etapas tempranas con cargas parasitarias bajas, algo que los cultivos convencionales suelen pasar por alto. Además, proporciona resultados en cuestión de horas, en contraste con los tiempos prolongados de los cultivos, que pueden extenderse durante días o semanas. Una de sus ventajas más destacadas es la capacidad de cuantificar con precisión la carga parasitaria mediante la medición exacta del ADN, superando las limitaciones inherentes a los métodos basados en cultivo y microscopía. Asimismo, reduce significativamente el riesgo de falsos positivos o negativos, ya que trabaja directamente con ADN extraído, minimizando la posibilidad de contaminación, un problema frecuente en los cultivos. Su aplicabilidad es también notablemente versátil, ya que permite detectar y diferenciar múltiples especies parasitarias en una sola reacción, optimizando tanto el tiempo como los recursos en comparación con técnicas que requieren procedimientos específicos para cada microorganismo. Por último, la qPCR es útil incluso para analizar muestras archivadas o parcialmente degradadas, dado que no depende de la viabilidad del microorganismo, lo que la convierte en una herramienta invaluable en estudios retrospectivos (151, 152, 153, 154, 155, 156).

En el trabajo mencionado previamente llevado a cabo en modelo murino con las cepas K98 y VD (87), la cepa VD mostró mayor tropismo placentario.

Estos resultados resaltan la importancia del rol del hospedero y el modelo utilizado para evaluar el tropismo y virulencia de una cepa parasitaria. En este contexto, en el laboratorio se han desarrollado cultivos 3D de células BeWo, relevantes para profundizar estudios de infectividad con cepas obtenidas de casos congénitos y de otros orígenes.

En cuanto a los cultivos tridimensionales de células BeWo, los resultados obtenidos muestran que los esferoides *large*, generados a partir de 1000 células por micropocillo, alcanzaron un diámetro promedio teórico de $341,30 \pm 24,52 \mu\text{m}$, mientras que los *small*, formados con 316

células, presentaron un diámetro promedio de $163,28 \pm 6,98 \mu\text{m}$. Al contrastar estos resultados con los obtenidos en el estudio realizado en LaBMECh (124), que empleó el mismo sistema de cultivos 3D y condiciones experimentales idénticas, se identificaron diferencias significativas. En este estudio, los esferoides *large* presentaron un diámetro promedio de $284,48 \pm 2,79 \mu\text{m}$, mientras que los *small* alcanzaron un promedio de $154,84 \pm 1,53 \mu\text{m}$. El análisis estadístico reveló una diferencia significativa de $56,82 \mu\text{m}$ entre los esferoides *large*. En contraste, la diferencia de $8,44 \mu\text{m}$ observada en los *small* no resultó estadísticamente significativa.

Las diferencias observadas en los diámetros teóricos promedio de los esferoides *large* podrían deberse a diversas variables relacionadas con el sistema de cultivo, las condiciones experimentales o a las células empleadas. Entre las posibles explicaciones para las variaciones observadas se encuentra la distribución inicial desigual de las células. Aunque se sembraron 1000 células por pocillo en ambos casos, es plausible que la heterogeneidad en la distribución al inicio del cultivo haya influido en el número final de células asentadas en cada pocillo. Además, las condiciones de incubación y manejo también podrían haber contribuido. Variaciones sutiles en parámetros como el pH, los tiempos de cultivo, las concentraciones de gases (O_2 y CO_2) o incluso en la manipulación de las placas pueden impactar significativamente el desarrollo de los esferoides, dada su sensibilidad a perturbaciones. Por ejemplo, movimientos bruscos durante el manejo podrían causar que los esferoides, al estar suspendidos, impacten contra las paredes del pocillo, lo que podría provocar el desprendimiento de células. La variabilidad experimental es otro factor a considerar. Diferencias inadvertidas entre lotes de medios, sueros u otros insumos, así como posibles errores del operador, como imprecisiones durante el recuento celular en la cámara de Neubauer o fallos al pipetear el volumen correspondiente a las 81.000 células totales en el micromolde, podrían haber influido en los resultados obtenidos. Estas variables subrayan la importancia de mantener un control riguroso en cada etapa del proceso experimental para minimizar su impacto.

Otro factor a tener en cuenta es la desviación estándar obtenida en el diámetro de los esferoides *large* llevados a cabo en este trabajo ($24,52 \mu\text{m}$). Esta DS es aproximadamente la mitad de la diferencia entre los diámetros obtenidos en el trabajo en comparación con lo de Apodaca et al. (2024).

Este valor, aunque elevado en comparación con la media ($341,30 \mu\text{m}$), no resulta inusual considerando las características del conjunto de datos analizados. La desviación estándar alta puede explicarse por varios factores relacionados con la dispersión observada. En primer lugar, el amplio rango de valores, que oscila entre un mínimo de $304,26$ y un máximo de $392,32$, genera una diferencia de $88,06$ entre los extremos. Esta amplitud refleja una notable variabilidad en los datos, lo que contribuye directamente al incremento de la desviación

estándar. Además, la presencia de valores extremos en ambos límites del rango afecta significativamente este parámetro estadístico, ya que dichos valores, al distanciarse considerablemente de la media, aumentan la medida de dispersión. El tamaño de la muestra, compuesto por 9 datos, aunque adecuado para obtener estimaciones razonables, sigue siendo relativamente pequeño. En este contexto, cualquier variabilidad en los valores tiene un impacto proporcionalmente mayor, lo que podría magnificar la percepción de una desviación estándar elevada. Por último, la distribución de los datos no es completamente uniforme alrededor de la media. Aunque una proporción considerable de los valores se concentra entre 330 y 360, la presencia de algunos puntos más distantes eleva la dispersión general, incrementando así la desviación estándar observada.

Para reducirla se podría aumentar el tamaño de la muestra, lo que podría amortiguar la influencia de valores extremos y proporcionar una mejor representación de los datos y analizar los valores más alejados para determinar si reflejan variaciones reales del sistema o si corresponden a errores experimentales como los mencionados anteriormente.

En consecuencia, basándonos en los resultados obtenidos, podemos afirmar que el cultivo tridimensional (3D) de los esferoides *large* y *small* con la línea trofoblástica BeWo fue exitoso. Además, resultó un modelo útil y funcional para estudiar la infección por *T. cruzi* dado que fue susceptible a la invasión por parásitos pertenecientes a diferentes UDTs y de diferentes orígenes. Resultados anteriores empleando el mismo modelo de cultivo pero diferente línea celular trofoblástica (JEG-3) resultaron impermeables a la infección por *T. cruzi*. Esto se debió a la formación de una barrera estructural con uniones celulares estrechas, la producción de factores inmunomoduladores y moléculas de defensa, la posible reducción de receptores esenciales para la adhesión e invasión del parásito, y la mejor representación del microambiente fisiológico de la interfaz materno-fetal en comparación con cultivos 2D, siendo clave en este proceso la línea celular JEG-3, que forma una barrera funcional similar al sincitiotrofoblasto y permite estudiar los mecanismos de resistencia placentaria, lo que sugiere que la placenta humana puede actuar como una barrera efectiva contra la transmisión congénita del parásito en condiciones normales (114).

En el trabajo de Apodaca et al. (2024) se llevó a cabo el perfil de crecimiento del cultivo en 3D midiendo el diámetro teórico en función de los días de cultivo. En los esferoides *large* de 1000 células por micropocillo y los *small* de 316, el diámetro teórico no supera los 500 μm , incluso después de 5 días, siendo $408,68 \pm 12,65 \mu\text{m}$ y $204,70 \pm 1,34 \mu\text{m}$ respectivamente.

Este análisis es esencial al trabajar con esferoides, ya que se ha establecido un valor límite estimado de 500 μm para evitar la formación de centros necróticos (157). Siguiendo esta premisa, se optó por medir los diámetros de los esferoides al tercer día para verificar si se superaba este valor crítico. Dado que los resultados no alcanzaron los 500 μm , se eligió el

tercer día para realizar las infecciones, minimizando así la posibilidad de formación de un centro necrótico a las 48 horas posteriores (quinto día). La formación de estos centros, caracterizados por la falta de oxígeno y nutrientes, disminuyen la viabilidad de las células en su interior, lo que impacta en la replicación del parásito y la caracterización de la infección. La medición de los diámetros se llevó a cabo para caracterizar los esferoides, ya que, según la teoría, no se forman centros necróticos en cultivos con diámetros menores a 500 μm . Para complementar este análisis, se recomienda realizar estudios de viabilidad celular, como el uso de azul de tripán.

El término "teórico" se refiere al diámetro de los esferoides calculado bajo condiciones ideales, utilizando modelos matemáticos que consideran parámetros como la cantidad de células sembradas, el volumen del cultivo, la proliferación celular, la distribución de nutrientes y las características del medio. Este valor no se obtiene mediante mediciones directas en el experimento, sino que es una estimación basada en suposiciones simplificadas, como la homogeneidad del medio y el comportamiento ideal de las células. El diámetro teórico actúa como una referencia para comparar con el diámetro real de los esferoides y evaluar cómo estos se ajustan a las predicciones hechas bajo condiciones experimentales ideales, sin considerar factores externos o variaciones que puedan influir en el crecimiento real (158, 159).

En cuanto a los ensayos de infección realizados en esferoides de células BeWo (Apodaca et al. (2024), se observó la presencia de amastigotes intracelulares para ambos *stocks* parasitarios. Esto se evidenció a través de la expresión de la proteína fluorescente GFP en K98 y mediante el marcaje con anticuerpos anti-*T. cruzi* en VD, como se muestra en la **Figura 31**.

En estos, se utilizaron los esferoides *large* de 1000 células debido a su diámetro y que este tipo resultó más cómodo al preparar las muestras para análisis por microscopía, ya que se aprecian a simple vista.

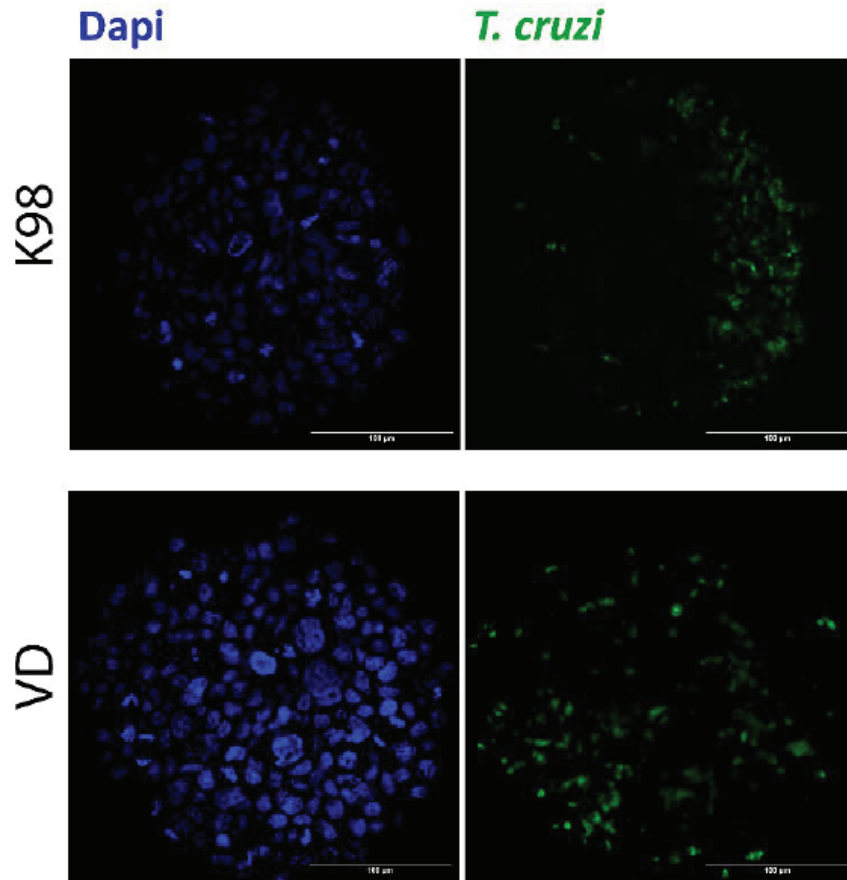


Figura 31. Infección de cultivos 3D por *T. cruzi*. Esferoides *large* de tres días fueron expuestos a tripomastigotes de *T. cruzi* de los stocks K98 y VD. De izquierda a derecha, las imágenes muestran los núcleos en azul y los parásitos en verde. Extraído de: (124).

El número de parásitos por célula BeWo presentó diferencias significativas entre los cultivos 2D y 3D para cada *stock* parasitario.

Como se mencionó anteriormente, en los cultivos 2D infectados con K98-GFP se observó un promedio de $1,70 \pm 0,18$ par/cél, mientras que VD-*wt* $0,16 \pm 0,02$ par/cél. Al compararlo con los cultivos 3D vemos que este valor para K98-GFP disminuyó a $1,03 \pm 0,19$ par/cél, mientras que en VD-*wt* aumentó significativamente a $1,32 \pm 0,19$ par/cél (**Figura 32**). Al comparar los resultados obtenidos para VD en cultivos 2D y 3D, se observaron diferencias significativamente entre ambos modelos. Mientras que, al comparar ambas infecciones en el modelo 3D esta diferencia resultó no significativa.

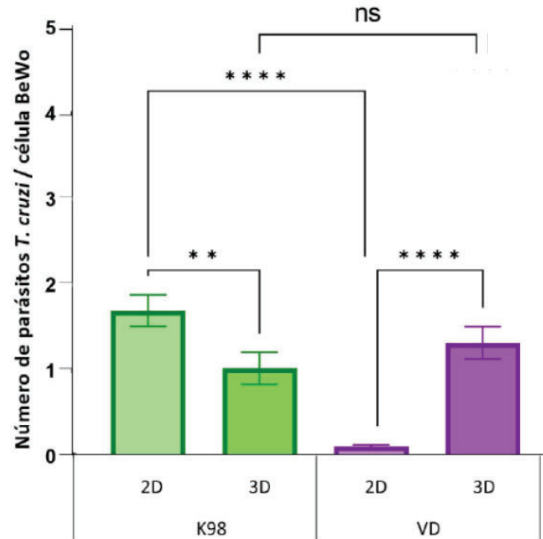


Figura 32. Parásitos por célula BeWo. Se realizó PCR cuantitativa para el gen target *EF-1α* de *T. cruzi* y *GAPDH* humano y utilizando curvas para cada stock parasitario (K98, VD) y para las células BeWo, se calculó el número de parásitos por célula trofoblástica. Se realizaron tres réplicas biológicas y tres réplicas de PCR. Los resultados se muestran como la media con su desviación estándar. * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,005$, *** $p \leq 0,0010$ y **** $p \leq 0,0001$. Extraído de: (160).

Las imágenes de microscopía confocal de los esferoides infectados revelan una variabilidad en la distribución y el progreso de la infección según el *stock* parasitario empleado. En el caso VD, la infección mostró una distribución más extensa, con parásitos detectados incluso en el centro de los esferoides. En contraste, K98 presentó una distribución limitada a las áreas cercanas a la superficie del esferoide.

El origen de VD a partir de un caso congénito podría justificar su comportamiento diferencial, ya que este no solo podría estar asociado a su capacidad de invasión, sino también a un posible comportamiento migratorio entre las células que conforman los esferoides. Esto sugiere que el mecanismo de transmisión transplacentaria podría involucrar, además de la invasión de los trofoblastos, la migración a través de ellos. Estudios utilizando cultivos 3D de miocitos revelaron que diferentes cepas presentan un patrón de migración característico que puede asociarse con su comportamiento *in vivo*. En este contexto, las cepas aisladas de niños con infección vertical mostraron un fenotipo altamente migratorio, mientras que el aislado de una madre infectada, que no transmitió la infección a sus hijos, presentó considerablemente menos migración (161).

En los ensayos de infectividad en cultivos 2D y 3D, es relevante destacar que VD aumentó el número de parásitos por célula BeWo empleando el modelo 3D en comparación con el 2D. Esta diferencia puede deberse a factores del hospedero relacionados con la defensa

placentaria (162) o al reconocimiento por parte de los parásitos de moléculas específicas presentes en el medio de cultivo, la matriz extracelular o la superficie de las células trofoblásticas. Estos factores se desarrollan de manera más representativa en cultivos 3D, ya que imitan funciones *in vivo*, reproducen de forma más precisa el entorno fisiológico y la microarquitectura de los tejidos, proporcionando un entorno similar al de las infecciones naturales (108, 109, 110).

Conclusiones

En base a los resultados obtenidos durante esta Tesis es posible concluir que:

1. Se caracterizó la infección por *T. cruzi* en diferentes modelos *in vitro*, enfocados en la transmisión congénita:

a) **Cultivos bidimensionales:**

- Se destacó la importancia de trabajar con cultivos libres de micoplasma en los ensayos de infección, ya que esto asegura la fiabilidad y validez de los experimentos, lo cual es esencial para obtener conclusiones científicas precisas y reproducibles.
- Se observó que la diferenciación de los epimastigotes a tripomastigotes, utilizando distintas líneas celulares, es un proceso complejo influenciado por múltiples factores que afectan tanto la eficiencia de la invasión como el tiempo requerido para su diferenciación.
- Se evidenció que la cepa VD, proveniente de un caso congénito, mostró una menor infectividad en la línea de trofoblastos humanos en comparación con las líneas epiteliales HeLa y Vero, además de presentar un menor tropismo por trofoblastos en comparación con la cepa K98, derivada de un caso no congénito.

b) **Cultivos Tridimensionales:**

- Se estandarizó el cultivo tridimensional de esferoides de tipo *large* y *small* de líneas celulares trofoblásticas humanas empleando el sistema MicroTissues® 3D Petri Dish® de Sigma-Aldrich® (St. Louis, MO).
- Se desarrolló un modelo útil para estudiar la infección por *T. cruzi* dado que resultó permeable a la infección por parásitos pertenecientes a diferentes UDTs y de diferentes orígenes.
- Se observó un incremento en la infectividad de la cepa VD, aislada de un caso congénito, en comparación con el modelo 2D, así como una distribución más generalizada de los parásitos a lo largo de todo el esferoide. En contraste, la cepa K98 mostró una distribución más limitada, restringiéndose principalmente a la superficie del esferoide.

2. A través de las optimizaciones de la PCR en tiempo real, se ha logrado cuantificar carga parasitaria en cepas pertenecientes a distintas unidades discretas de tipificación en ambos modelos de cultivo *in vitro*.

- **2D:** Se apreció una mayor carga parasitaria en células BeWo para K98-GFP y VD-*wt* en comparación con las HeLa.

- **3D:** Se obtuvo una mayor carga parasitaria en esferoides de células BeWo empleando VD-*wt* que el clon K98-GFP.

Anexo

Ensayos de infección en monocapa

BeWo K98-GFP	Células totales	Células Infeccionadas	Porcentaje de infección (%)	Media ± Desviación estándar (%)
Cubreobjeto 1	524	260	49,62	51,20 ± 3,44
Cubreobjeto 2	515	284	55,15	
Cubreobjeto 3	596	291	48,83	
Total	1635	835	-	

Tabla A1. Número de células totales, células infectadas y porcentaje de infección en cada cubreobjeto para la línea celular BeWo infectada con K98-GFP. El porcentaje de infección se informó empleando la media junto a su desvío estándar.

BeWo VD-wt	Células totales	Células Infeccionadas	Porcentaje de infección (%)	Media ± Desviación estándar (%)
Cubreobjeto 1	576	22	3,82	3,84 ± 0,18
Cubreobjeto 2	546	22	4,03	
Cubreobjeto 3	654	24	3,67	
Total	1776	68	-	

Tabla A2. Número de células totales, células infectadas y porcentaje de infección en cada cubreobjeto para la línea celular BeWo infectada con VD-wt. El porcentaje de infección se informó empleando la media junto a su desvío estándar.

HeLa K98-GFP	Células totales	Células Infeccionadas	Porcentaje de infección (%)	Media ± Desviación estándar (%)
Cubreobjeto 1	563	95	16,87	16,69 ± 0,88
Cubreobjeto 2	642	101	15,73	
Cubreobjeto 3	527	92	17,46	
Total	1732	288	-	

Tabla A3. Número de células totales, células infectadas y porcentaje de infección en cada cubreobjeto para la línea celular HeLa infectada con K98-GFP. El porcentaje de infección se informó empleando la media junto a su desvío estándar.

HeLa VD-wt	Células totales	Células Infeccionadas	Porcentaje de infección (%)	Media ± Desviación estándar (%)
Cubreobjeto 1	815	56	6,87	7,43 ± 0,74
Cubreobjeto 2	798	66	8,27	
Cubreobjeto 3	658	47	7,14	
Total	2271	169	-	

Tabla A4. Número de células totales, células infectadas y porcentaje de infección en cada cubreobjeto para la línea celular HeLa infectada con VD-wt. El porcentaje de infección se informó empleando la media junto a su desvío estándar.

Vero K98-GFP	Células totales	Células Infeccionadas	Porcentaje de infección (%)	Media ± Desviación estándar (%)
Cubreobjeto 1	583	191	32,76	28,07 ± 4,072
Cubreobjeto 2	743	189	25,44	
Cubreobjeto 3	688	179	26,02	
Total	2014	559	-	

Tabla A5. Número de células totales, células infectadas y porcentaje de infección en cada cubreobjeto para la línea celular Vero infectada con K98-GFP. El porcentaje de infección se informó empleando la media junto a su desvío estándar.

Vero VD-wt	Células totales	Células Infeccionadas	Porcentaje de infección (%)	Media ± Desviación estándar (%)
Cubreobjeto 1	818	154	18,83	17,22 ± 1,52
Cubreobjeto 2	956	151	15,79	
Cubreobjeto 3	599	102	17,03	
Total	2373	407	-	

Tabla A6. Número de células totales, células infectadas y porcentaje de infección en cada cubreobjeto para la línea celular Vero infectada con VD-wt. El porcentaje de infección se informó empleando la media junto a su desvío estándar.

Cuantificación de carga parasitaria por PCR cuantitativa en tiempo real

K98-GFP	Número de parásitos	Desviación estándar	HeLa	Número de células	Desviación estándar	Carga Parasitaria (Parásitos/célula)	Media ± Desviación estándar (Parásitos/célula)
Muestra 1	34899,91	3186,19	Muestra 1	29620,93	5731,27	1,18	0,77 ± 0,35
Muestra 2	19082,43	6142,55	Muestra 2	30988,71	4362,7	0,62	
Muestra 3	11914,19	28,62	Muestra 3	22558,36	5930,05	0,53	

Tabla A7: Valores de concentración de células HeLa y K98-GFP en las 3 muestras, junto con la carga parasitaria y su desviación estándar.

VD-wt	Número de parásitos	Desviación estándar	HeLa	Número de células	Desviación estándar	Carga Parasitaria (Parásitos/célula)	Media ± Desviación estándar (Parásitos/célula)
Muestra 1	18522,48	546,16	Muestra 1	626666,88	12897	0,030	0,033 ± 0,0044
Muestra 2	20275,56	2416,41	Muestra 2	531450	19765,52	0,038	
Muestra 3	19156,12	767,7	Muestra 3	597664,64	5282,17	0,032	

Tabla A8: Valores de concentración de células HeLa y VD-wt en las 3 muestras, junto con la carga parasitaria y su desviación estándar.

Cultivo de células BeWo en 3D

Esferoideos Large	Área (µm)	Radio (µm)	Diámetro teórico (µm)	Media ± Desviación Estándar (µm)
1	98.199,92	176,80	353,60	341,30 ± 24,52
2	120.887,20	196,16	392,32	
3	100.711,43	179,05	358,09	
4	86.772,57	166,19	332,39	

5	85.433,10	164,91	329,81
6	88.028,32	167,39	334,79
7	88.739,91	168,07	336,14
8	85.705,18	165,17	330,34
9	72.708,13	152,13	304,26

Tabla A9. Valores obtenidos de área, radio, diámetro teórico y desviación estándar de los esferoides *large*.

Esferoides Small	Área (μm)	Radio (μm)	Diámetro teórico (μm)	Media ± Desviación Estándar (μm)
1	18.968,81	77,70	155,41	163,28 ± 6,98
2	19.266,66	78,31	156,62	
3	19.033,97	77,84	155,68	
4	21.723,85	83,16	166,31	
5	21.900,70	83,49	166,99	
6	23.389,91	86,29	172,57	
7	21.975,16	83,64	167,27	
8	19.443,50	78,67	157,34	
9	23.064,14	85,68	171,37	

Tabla A10. Valores obtenidos de área, radio, diámetro teórico y desviación estándar de los esferoides *small*.

Bibliografía

Introducción

1. Kaufer, A., Ellis, J., Stark, D., & Barratt, J. (2017). The evolution of trypanosomatid taxonomy. *Parasites & Vectors*, 10, 1-17. <https://doi.org/10.1186/s13071-017-2369-7>
2. Schoch CL, et al. NCBI Taxonomy: a comprehensive update on curation, resources and tools. *Database (Oxford)*. 2020: [baaa062](https://doi.org/10.1093/database/baaa062). PubMed: [32761142](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32761142/) PMC: [PMC7408187](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/PMC7408187/).
3. Apt Baruch, W. (Ed.). (2013). *Parasitología humana*. McGraw-Hill Education.
4. Brener, Z. (1973). Biology of *Trypanosoma cruzi*. *Annual Reviews in Microbiology*, 27(1), 347-382. <https://doi.org/10.1146/annurev.mi.27.100173.002023>
5. Krogstad, D. (1994). Protozoarios de la sangre y los tejidos. En M. Schaechter, G. Medoff, B. Eisenstein, & H. Guerra (Eds.), *Microbiología. Mecanismos de las enfermedades infecciosas* (2ª ed., pp. 630-649). Editorial Médica Panamericana.
6. García, E. S., & Azambuja, P. (1991). Development and interactions of *Trypanosoma cruzi* within the insect vector. *Parasitol. Today*, 7(9), 240-244. [https://doi.org/10.1016/0169-4758\(91\)90237-I](https://doi.org/10.1016/0169-4758(91)90237-I)
7. Hemmige, V., Tanowitz, H., & Sethi, A. (2012). *Trypanosoma cruzi* infection: A review with emphasis on cutaneous manifestations. *International Journal of Dermatology*, 51(5), 501-508. <https://doi.org/10.1111/j.1365-4632.2011.05380.x>
8. Andrade, L. O., & Andrews, N. W. (2005). The *Trypanosoma cruzi*-host-cell interplay: Location, invasion, retention. *Nature Reviews Microbiology*, 3(10), 819-823. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1249>
9. Zingales, B. (2018). *Trypanosoma cruzi* genetic diversity: Something new for something known about Chagas disease manifestations, serodiagnosis, and drug sensitivity. *Acta Tropica*, 184, 38-52. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2017.09.017>
10. Zingales, B., et al. (2009). A new consensus for *Trypanosoma cruzi* intraspecific nomenclature: Second revision meeting recommends TcI to TcVI. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 104(7), 1051-1054. <https://doi.org/10.1590/s0074-02762009000700021>
11. Velásquez-Ortiz, N., Herrera, G., Hernández, C., & otros. (2022). Discrete typing units of *Trypanosoma cruzi*: Geographical and biological distribution in the Americas. *Scientific Data*, 9, 360. <https://doi.org/10.1038/s41597-022-01452-w>
12. Zingales, B. (2018). *Trypanosoma cruzi* genetic diversity: Something new for something known about Chagas disease manifestations, serodiagnosis and drug sensitivity. *Acta Tropica*, 184, 38-52. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2017.09.017>
13. Ministerio de Salud de la Nación. (2022, agosto). Información sobre parasitosis humanas: Enfermedad de Chagas. Recuperado de <https://www.argentina.gob.ar/salud>
14. Salud OPS. (2018). *Guía para el diagnóstico y el tratamiento de la enfermedad de Chagas*. Washington, DC: Organización Panamericana de la Salud.

15. World Health Organization (WHO). (2023). World Chagas Disease Day [Online]. Available at: <https://www.who.int/campaigns/world-chagas-disease-day> [Accessed].
16. World Health Organization (WHO). (2023). *Chagas disease (American trypanosomiasis)*. [https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/chagas-disease-\(american-trypanosomiasis\)](https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/chagas-disease-(american-trypanosomiasis))
17. Murray, T. (s.f.). *Triatoma dimidiata (female)* [Fotografía]. pBase. <https://www.pbase.com/tmurray74/image/133600799>
18. Welcome Cure. (s.f.). *Achalasia Cardia Similar Conditions*. Welcome Cure. <https://www.welomecure.com/diseases/achalasia-cardia/similar-conditions>
19. Hotez, P. J., Bottazzi, M. E., Franco-Paredes, C., Ault, S. K., & Periago, M. R. (2008). The neglected tropical diseases of Latin America and the Caribbean: A review of disease burden and distribution and a roadmap for control and elimination. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 2, e300.
20. World Health Organization (WHO). (2015). *Chagas disease in Latin America: An epidemiological update based on 2010 estimates*. *Wkly Epidemiol Rec*, 90, 33-44.
21. World Health Organization (WHO). (2024). *Data Source: World Health Organization Map Production: Control of Neglected Tropical Diseases (NTD)*. World Health Organization.
22. Antinori, S., et al. (2017). Chagas disease in Europe: A review for the internist in the globalized world. *European Journal of Internal Medicine*, 43, 6-15. <https://doi.org/10.1016/j.ejim.2017.05.001>
23. Bern, C., Kjos, S., Yabsley, M. J., & Montgomery, S. P. (2011). *Trypanosoma cruzi* and Chagas' disease in the United States. *Clinical Microbiology Reviews*, 24, 655-681.
24. Gascón, J., Albajar, P., Cañas, E., et al. (2007). Diagnosis, management, and treatment of chronic Chagas cardiomyopathy in areas where *Trypanosoma cruzi* infection is not endemic. *Revista Española de Cardiología*, 60, 285-293.
25. Alvarado-Salazar, J. A., Padilla-Martínez, I. I., Vazquez, K., & Mendieta-Wejebe, J. E. (2024). *Chagas disease: History, pathophysiology and therapeutic treatment*. [Manuscrito bajo licencia CC BY-NC 4.0].
26. Sociedad Argentina de Cardiología (SAC). (2019). *Consenso Enfermedad de Chagas 2019*. Obtenido de <https://www.sac.org.ar>
27. Organización Panamericana de la Salud (OPS). (2022). *Informe sobre la interrupción de la transmisión del Chagas en América Latina*. Recuperado de <https://www.paho.org>
28. Vazquez Brust, A., Olego, T., Rosati, G., Lang, C., Bozzoli, G., Weinberg, D., ... Sarraute, C. (2019). Detecting areas of potential high prevalence of Chagas in Argentina. *Companion Proceedings of the 2019 World Wide Web Conference on - WWW '19*. <https://doi.org/10.1145/3308560.3316485>
29. Ministerio de Salud de la Nación. (2022, agosto). *Boletín Epidemiológico N° 616*.

- Recuperado de <https://www.argentina.gob.ar/salud>
30. Mundo Sano. (2021, 15 de abril). *Chagas, una deuda pendiente en Argentina*. Mundo Sano. Recuperado de <https://mundosano.org/es/>
 31. Cardillo, F., et al. (2015). Immunity and immune modulation in *Trypanosoma cruzi* infection. *Pathogens and Disease*, 73(9), 1–18. <https://doi.org/10.1093/femspd/ftvo82>
 32. Laranja, F. S., et al. (1956). Chagas' disease: A clinical, epidemiologic, and pathologic study. *Circulation*, 14, 1035–1060.
 33. Prata, A. (2001). Clinical and epidemiological aspects of Chagas disease. *The Lancet Infectious Diseases*, 1, 92–100.
 34. Pérez-Molina, J. A., et al. (2018). Chagas disease. *The Lancet*, 391(10115), 82–94. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(17\)31612-4](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(17)31612-4)
 35. MedBullets. (2019). *Chagas disease*. MedBullets Step 2. Recuperado de <https://step2.medbullets.com/infectious-dis/121843/chagas-disease>
 36. Navarro Tuculet, C., Hidalgo Parra, I., Enz, P., Galimberti, G., & Galimerti, R. (2007). Enfermedad de Chagas: Manifestación cutánea en un paciente con trasplante hepático. Reactivación. *Medicina Cutánea Ibero-Latinoamericana*, 35(1), 25–28. <https://www.medigraphic.com/pdfs/cutanea/mc-2007/mco71f.pdf>
 37. Rassi, A., de Rezende, J. M., Luquetti, A. O., & Rassi, A. (2017). Clinical phases and forms of Chagas disease. En J. Telleria & M. Tibayrenc (Eds.), *American Trypanosomiasis Chagas Disease* (2ª ed., pp. 653-686). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-801029-7.00029-0>
 38. Dutra, W. O., Menezes, C. A. S., Villani, F. N. A., Costa, G. C. D., Silveira, A. B. M. D., Reis, D. D. Á., & col. (2009). Cellular and genetic mechanisms involved in the generation of protective and pathogenic immune responses in human Chagas disease. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 104, 208–218.
 39. Quijano-Hernández, I., & Dumonteil, E. (2014). Advances and challenges towards a vaccine against Chagas disease. *Human Vaccines*, 7(11), 1184–1191.
 40. Buitrago, Y. M., & Gutiérrez Duque, D. (2023). *Enfermedad de Chagas*. Recuperado de <https://www.icscyl.com/mileon/wp-content/uploads/2023/03/Dres-Buitrago-y-Gutierrez-sesres-Mar23.pdf>
 41. Méndez-Domínguez, N., Chi-Méndez, C., Canto-Losa, J., Peniche-Echazarreta, A., Canto-Losa, J. P., & Gómez-Carro, S. (2017). Cardiopatía Chagásica en un escolar: Reporte de caso. *Revista Chilena de Pediatría*, 88(5), 647–651. <https://dx.doi.org/10.4067/S0370-41062017000500012>
 42. Rassi, A. & Marin-Neto, J. A. (2010). Chagas disease. *The Lancet*, 375(9723), 1388–1402.
 43. Alonso-Padilla, J., Gallego, M., Schijman, A. G., & Gascon, J. (2017). Molecular diagnostics for Chagas disease: Up-to-date and novel methodologies. *Expert Review of*

- Molecular Diagnostics*, 17(7), 699–710.
44. Besuschio, S. A., Llano Murcia, M., Benatar, A. F., Monnerat, S., Cruz, I., Picado, A., et al. (2017). Analytical sensitivity and specificity of a loop-mediated isothermal amplification (LAMP) kit prototype for detection of *Trypanosoma cruzi* DNA in human blood samples. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 11(7), e0005779. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0005779>
 45. Besuschio, S. A., Picado, A., Muñoz-Calderón, A., Wehrendt, D. P., Fernández, M., Benatar, A., et al. (2020). *Trypanosoma cruzi* loop-mediated isothermal amplification (*Trypanosoma cruzi* Loopamp) kit for detection of congenital, acute and Chagas disease reactivation. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 14(8), e0008402. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0008402>
 46. Tarleton, R. L. (2015). CD8+ T cells in *Trypanosoma cruzi* infection. *Seminars in Immunopathology*, 37(3), 233–238.
 47. Ministerio de Salud de la Nación Argentina. (2018). Enfermedades infecciosas: "Chagas". Atención al paciente infectado con *T. cruzi*. Guía para el equipo de salud (3ª ed.). Ministerio de Salud de la Nación Argentina.
 48. Urbina, J. A. (2015). Recent clinical trials for the etiological treatment of chronic Chagas disease: Advances, challenges and perspectives. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 62(1), 149–156.
 49. Wegner, D. H., et al. (1972). The effect of nifurtimox in acute Chagas' infection. *Arzneimittelforschung*, 22, 1624–1635.
 50. Balouz, V., Melli, L. J., Volcovich, R., Moscatelli, G., Moroni, S., González, N., et al. (2017). The Trypomastigote Small Surface Antigen from *Trypanosoma cruzi* improves treatment evaluation and diagnosis in pediatric Chagas disease. *Journal of Clinical Microbiology*, 55(12), 3444–3453. <https://doi.org/10.1128/JCM.01055-17>
 51. Sánchez Negrette, O., Mora, M. C., & Basombrío, M. A. (2005). High prevalence of congenital *Trypanosoma cruzi* infection and family clustering in Salta, Argentina. *Pediatrics*, 115(6), e668–e672. <https://doi.org/10.1542/peds.2004-1732>
 52. Schmunis, G. A., Zicker, F., Pinheiro, F., & Brandling-Bennett, D. (1998). Risk for transfusion transmitted infectious diseases in Central and South America. *Emerging Infectious Diseases*, 4, 5–11.
 53. Martín-Dávila, P., Fortún, J., López-Vélez, R., et al. (2008). Transmission of tropical and geographically restricted infections during solid-organ transplantation. *Clinical Microbiology Reviews*, 21, 60–96.
 54. Calvo-Méndez, M. L., Noguera-Torres, B., Alejandre-Aguilar, R., & Cortés-Jiménez, M. (1994). Experimental infection with *Trypanosoma cruzi* through contaminated water and food. *Latin American Journal of Microbiology*, 36, 67–69.

55. Añez, N., Crisante, G., & Romero, M. (2009). Survival and infectivity of metacyclic forms of *Trypanosoma cruzi* in experimentally contaminated food. *JBol. Malarial Salud Amb*, 49, 91–96.
56. Brener, Z. (1987). Laboratory-acquired Chagas disease: Comment. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 81, 527.
57. Torrico, F., Alonso-Vega, C., Suárez, E., et al. (2004). Maternal *Trypanosoma cruzi* infection, pregnancy outcome, morbidity, and mortality of congenitally infected and non-infected newborns in Bolivia. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 70, 201–209.
58. Muñoz, J., Portus, M., Corachan, M., Fumado, V., & Gascón, J. (2007). Congenital *Trypanosoma cruzi* infection in a non-endemic area. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 101, 1161–1162.
59. Fernández-Aguilar, S., Lambot, M. A., Torrico, F., et al. (2005). Placental lesions in human infection with *Trypanosoma cruzi*. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 38(Suppl. 2), 84–86.
60. Carlier, Y., Torrico, F., Sosa-Estani, S., et al. (2011). Congenital Chagas disease: recommendations for diagnosis, treatment and control of newborns, siblings and pregnant women. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 5, e1250. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0001250>
61. Gurtler, R. E., Segura, E. L., & Cohen, J. E. (2003). Congenital transmission of *Trypanosoma cruzi* infection in Argentina. *Emerging Infectious Diseases*, 9, 29–32.
62. Messenger, L. A., & Bern, C. (2018). Congenital Chagas disease: current diagnostics, limitations and future perspectives. *Current Opinion in Infectious Diseases*, 31(5), 415–421. <https://doi.org/10.1097/QCO.0000000000000509>
63. Carlier, Y., & Truyens, C. (2010). Maternal–Fetal Transmission of *Trypanosoma cruzi*. In *Chagas Disease: From Basic Science to Clinical Management* (pp. 211–225). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384876-5.00022-8>
64. Carlier, Y., Truyens, C., Deloron, P., & Peyron, F. (2012). Congenital parasitic infections: a review. *Acta Tropica*, 121(2), 55–70. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2011.10.018>
65. De Rissio, A. M., Riarte, A. R., García, M. M., Esteva, M. I., Quaglino, M., & Ruiz, A. M. (2010). Congenital *Trypanosoma cruzi* infection. Efficacy of its monitoring in an urban reference health center in a non-endemic area of Argentina. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 82(5), 838–845. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.2010.08-0383>
66. Atias, A., Morales, M., Muñoz, P., & Barria, M. (1985). Ocular involvement in congenital Chagas disease. *Revista Chilena de Pediatría*, 56, 137–141.

67. Zaidenberg, M. (1999). Congenital Chagas disease in the province of Salta, Argentina, from 1980 to 1997. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 32, 689–695.
68. Moya, P. R., Paolasso, R. D., Blanco, S., et al. (1985). Treatment of Chagas disease with nifurtimox during the first months of life. *Medicina (Buenos Aires)*, 45, 553–558.
69. Freilij, H., & Altcheh, J. (1995). Congenital Chagas disease: diagnostic and clinical aspects. *Clinical Infectious Diseases*, 21, 551–555.
70. Bittencourt, A. L. (2000). Transmissão Vertical da Doença de Chagas. In Z. Brener, Z. A. Andrade, & M. Barral-Netto (Eds.), *Trypanosoma cruzi e doença de Chagas* (pp. 16–20). Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan S.A.
71. Carlier, Y., & Torrico, F. (2003). Congenital infection with *Trypanosoma cruzi*: From mechanisms of transmission to strategies for diagnosis and control. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 36, 767–771.
72. Torrico, M. C., Solano, M., Guzmán, J. M., et al. (2005). Estimation of parasitemia in human infection with *Trypanosoma cruzi*: High parasitemia is associated with severe and fatal congenital Chagas disease. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 38(Suppl. 2), 58–61.
73. Moretti, E., Basso, B., Castro, I., et al. (2005). Chagas' disease: study of congenital transmission in cases of acute maternal infection. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 38, 53–55.
74. Schijman, A. G., Alonso-Padilla, J., Longhi, S. A., & Picado, A. (2022). Parasitological, serological and molecular diagnosis of acute and chronic Chagas disease: From field to laboratory. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, 117, e200444. <https://doi.org/10.1590/0074-02760200444>
75. Altcheh, J., Sierra, V., Ramirez, T., Pinto Rocha, J. J., Grossmann, U., Huang, E., Moscatelli, G., & Ding, O. (2023). Efficacy and Safety of Nifurtimox in Pediatric Patients with Chagas Disease: Results at 4-Year Follow-Up in a Prospective, Historically Controlled Study (CHICO SECURE). *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 67(4), e0119322. <https://doi.org/10.1128/aac.01193-22>
76. Kemmerling, U., Osuna, A., Schijman, A. G., & Truyens, C. (2019). Congenital transmission of *Trypanosoma cruzi*: A review about the interactions between the parasite, the placenta, the maternal and the fetal/neonatal immune responses. *Frontiers in Microbiology*, 10, 1854. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01854>
77. Burgos, J. M., Altcheh, J., Bisio, M., Duffy, T., Valadares, H. M., Seidenstein, M. E., Piccinali, R., Freitas, J. M., Levin, M. J., Macchi, L., Macedo, A. M., Freilij, H., & Schijman, A. G. (2007). Direct molecular profiling of minicircle signatures and lineages of *Trypanosoma cruzi* bloodstream populations causing congenital Chagas disease. *International Journal for Parasitology*, 37(12), 1319–1327.

- <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2007.04.015>
78. Bisio, M., Seidenstein, M. E., Burgos, J. M., Ballering, G., Risso, M., Pontoriero, R., Moreau, M., Altchek, J., Leguizamón, M. S., Freilij, H., Marceillac, M., & Schijman, A. G. (2011). Urbanization of congenital transmission of *Trypanosoma cruzi*: Prospective polymerase chain reaction study in pregnancy. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 105(10), 543–549. <https://doi.org/10.1016/j.trstmh.2011.07.003>
79. Bua, J., Volta, B. J., Velazquez, E. B., Ruiz, A. M., Rissio, A. M., & Cardoni, R. L. (2012). Vertical transmission of *Trypanosoma cruzi* infection: Quantification of parasite burden in mothers and their children by parasite DNA amplification. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 106(10), 623–628. <https://doi.org/10.1016/j.trstmh.2012.03.015>
80. Bua, J., Volta, B. J., Perrone, A. E., Scollo, K., Velázquez, E. B., Ruiz, A. M., De Rissio, A. M., & Cardoni, R. L. (2013). How to improve the early diagnosis of *Trypanosoma cruzi* infection: Relationship between validated conventional diagnosis and quantitative DNA amplification in congenitally infected children. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 7(10), e2476. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002476>
81. Llewellyn, M. S., Messenger, L. A., Luquetti, A. O., García, L., Torrico, F., Tavares, S. B., et al. (2015). The sequencing of the surface proteases GP63 of *Trypanosoma cruzi* reveals diversity and diversifying selection between patients with chronic and congenital Chagas disease. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 9, e0003458. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0003458>
82. Macedo, A. M., & Peña, S. D. (1998). Genetic variability of *Trypanosoma cruzi*: Implications for the pathogenesis of Chagas disease. *Parasitol. Today*, 14, 119–124. [https://doi.org/10.1016/S0169-4758\(97\)01179-4](https://doi.org/10.1016/S0169-4758(97)01179-4)
83. Macedo, A. M., Machado, C. R., Oliveira, R. P., & Peña, S. D. J. (2004). *Trypanosoma cruzi*: Genetic structure of populations and relevance of genetic variability for the pathogenesis of Chagas disease. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 99, 1–12. <https://doi.org/10.1590/S0074-02762004000100001>
84. Carlier, Y., & Truyens, C. (2015). Congenital Chagas disease as an ecological model of interactions between *Trypanosoma cruzi* parasites, pregnant women, placenta, and fetuses. *Acta Tropica*, 151, 103–115. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2015.07.016>
85. Herrera, C., Truyens, C., Dumonteil, E., Alger, J., Sosa, S., Cafferata, M. L., et al. (2019). The phylogenetic analysis of *Trypanosoma cruzi* from pregnant women and newborns in Argentina, Honduras, and Mexico suggests an association between parasite haplotypes and congenital transmission of the parasite. *Journal of Molecular Diagnostics*, 21, 1095–1105. <https://doi.org/10.1016/j.jmoldx.2019.07.004>

86. Andrade, S. G. (1982). The influence of *Trypanosoma cruzi* strain on placental infections in mice. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 76, 123–128. [https://doi.org/10.1016/0035-9203\(82\)90036-0](https://doi.org/10.1016/0035-9203(82)90036-0)
87. Juiz, N. A., Solana, M. E., Acevedo, G. R., Benatar, A. F., Ramirez, J. C., da Costa, P. A., Macedo, A. M., Longhi, S. A., & Schijman, A. G. (2017). Different genotypes of *Trypanosoma cruzi* produce distinctive placental environment genetic response in chronic experimental infection. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 11(3), e0005436. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0005436>
88. Medina, L., Castillo, C., Liempi, A., Herbach, M., Cabrera, G., Valenzuela, L., Galanti, N., de Los Angeles Curto, M., Schijman, A. G., & Kemmerling, U. (2018). Differential infectivity of two *Trypanosoma cruzi* strains in placental cells and tissue. *Acta Tropica*, 186, 35–40. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2018.07.001>
89. Moore, K. L., Persaud, T. V. N., & Torchia, M. G. (2013). *Embriología clínica* (9ª ed.). Elsevier.
90. Arora, N., Sadovsky, Y., Dermody, T. S., & Coyne, C. B. (2017). Microbial vertical transmission during human pregnancy. *Cell Host & Microbe*, 21(5), 561–567. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2017.04.007>
91. Cross, J. C., Werb, Z., & Fisher, S. J. (1994). Implantation and the placenta: Key pieces of the development puzzle. *Science*, 266, 1508–1518.
92. Weisblum, Y., Panet, A., Haimov-Kochman, R., & Wolf, D. G. (2014). Models of vertical cytomegalovirus (CMV) transmission and pathogenesis. *Seminars in Immunopathology*, 36(6), 615–625. <https://doi.org/10.1007/s00281-014-0449-1>
93. Carter, A. M., & Mess, A. (2010). Hans Strahl's pioneering studies in comparative placentation. *Placenta*, 31(10), 848–852. <https://doi.org/10.1016/j.placenta.2010.07>
94. Grosser, O. (1927). Frühentwicklung, Eihautbildung und Placentation des Menschen und der Säugetiere. In R. T. Jaschke (Ed.), *Deutsche Frauenheilkunde, Geburtshilfe, Gynäkologie und Nachbargebiete in Einzeldarstellungen*, vol. V. Bergmann.
95. Leiser, R., & Kaufmann, P. (2009). Placental structure: In a comparative aspect. *Experimental and Clinical Endocrinology & Diabetes*, 102(03), 122–134. <https://doi.org/10.1055/s-0029-1211275>
96. Ávalos-Borges, E. E., Rios, L. E., Jiménez-Coello, M., Ortega-Pacheco, A., & Garg, N. J. (2022). Animal models of *Trypanosoma cruzi* congenital transmission. *Pathogens*, 11(10), 1172. <https://doi.org/10.3390/pathogens11101172>
97. Torrico, F., Alonso-Vega, C., Suarez, E., Rodriguez, P., Torrico, M.-C., Dramaix, M., et al. (2004). Maternal infection with *Trypanosoma cruzi*, pregnancy outcome, morbidity, and mortality of newborns with and without congenital infection in Bolivia. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 70, 201–209.

- <https://doi.org/10.4269/ajtmh.2004.70.201>
98. Liempi, A., Castillo, C., Carrillo, I., Muñoz, L., Droguett, D., Galanti, N., et al. (2016). A local innate immune response against *Trypanosoma cruzi* in the human placenta: The epithelial turnover of trophoblasts. *Microbial Pathogenesis*, 99, 123–129. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2016.08.022>
99. Duaso, J., Rojo, G., Cabrera, G., Galanti, N., Bosco, C., Maya, J. D., Morello, A., & Kemmerling, U. (2010). *Trypanosoma cruzi* induces tissue disorganization and destruction of chorionic villi in an ex vivo infection model of human placenta. *Placenta*, 31(8), 705–711. <https://doi.org/10.1016/j.placenta.2010.05.007>
100. Ortiz, S., Zulantay, I., Solari, A., Bisio, M., Schijman, A., Carlier, Y., & Apt, W. (2012). Presence of *Trypanosoma cruzi* in pregnant women and typing of lineages in congenital cases. *Acta Tropica*, 124(3), 243–246. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2012.08.001>
101. Liempi, A., Castillo, C., Cerda, M., Droguett, D., Duaso, J., Barahona, K., Hernández, A., Díaz-Luján, C., Fretes, R., Härtel, S., & Kemmerling, U. (2015). *Trypanosoma cruzi* infectivity assessment in "in vitro" culture systems by automated cell counting. *Acta Tropica*, 143, 47–50. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2014.12.006>
102. Droguett, D., Carrillo, I., Castillo, C., Gómez, F., Negrete, M., Liempi, A., Muñoz, L., Galanti, N., Maya, J. D., & Kemmerling, U. (2017). *Trypanosoma cruzi* induces cellular proliferation in the trophoblastic cell line BeWo. *Experimental Parasitology*, 173, 9–17. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2016.12.005>
103. Burleigh, D. W., Kendzioriski, C. M., Choi, Y. J., Grindle, K. M., Grendell, R. L., Magness, R. R., & Golos, T. G. (2007). Microarray analysis of BeWo and JEG3 trophoblast cell lines: Identification of differentially expressed transcripts. *Placenta*, 28(5-6), 383–389. <https://doi.org/10.1016/j.placenta.2006.05.001>
104. Muoth, C., Wichser, A., Monopoli, M., Correia, M., Ehrlich, N., Loeschner, K., Gallud, A., Kucki, M., Diener, L., Manser, P., Jochum, W., Wick, P., & Buerki-Thurnherr, T. (2016). A 3D co-culture microtissue model of the human placenta for nanotoxicity assessment. *Nanoscale*, 8(39), 17322–17332. <https://doi.org/10.1039/c6nr06749b>
105. Luján, C. D., Triquell, M. F., Sembaj, A., Guerrero, C. E., & Fretes, R. E. (2004). *Trypanosoma cruzi*: Productive infection is not allowed by chorionic villous explant from normal human placenta in vitro. *Experimental Parasitology*, 108(3-4), 176–181. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2004.07.013>
106. Sartori, M. J., Mezzano, L., Lin, S., Repossi, G., & Fabro, S. P. (2005). Cellular components and placental alkaline phosphatase in *Trypanosoma cruzi* infection. *Revista*

- de la Sociedad Brasileña de Medicina Tropical, 38(Suppl 2), 87–91. PMID: 16482823
107. Fretes, R. E., & Kemmerling, U. (2012). Mechanism of *Trypanosoma cruzi* placenta invasion and infection: The use of human chorionic villi explants. *Journal of Tropical Medicine*, 2012, 614820. <https://doi.org/10.1155/2012/614820>
 108. Shamir, E. R., & Ewald, A. J. (2014). Three-dimensional organotypic culture: Experimental models of mammalian biology and disease. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 15(10), 647–664. <https://doi.org/10.1038/nrm3873>
 109. Yamada, K. M., & Cukierman, E. (2007). Modeling tissue morphogenesis and cancer in 3D. *Cell*, 130(4), 601–610. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.08.006>
 110. Smalley, K. S., Lioni, M., & Herlyn, M. (2006). Life isn't flat: Taking cancer biology to the next dimension. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Animal*, 42(8-9), 242–247. <https://doi.org/10.1290/0604027.1>
 111. Garzoni, L. R., Adesse, D., Soares, M. J., Rossi, M. I., Borojevic, R., & de Meirelles, M. de N. (2008). Fibrosis and hypertrophy induced by *Trypanosoma cruzi* in a three-dimensional cardiomyocyte-culture system. *Journal of Infectious Diseases*, 197(6), 906–915. <https://doi.org/10.1086/528373>
 112. Ferrão, M. P., Nisimura, M., Moreira, C., Land, G., Pereira, M. C., de Mendonça-Lima, L., Araujo-Jorge, C., Waghbi, C., & Garzoni, R. (2018). Inhibition of TGF- β pathway reverts extracellular matrix remodeling in *T. cruzi*-infected cardiac spheroids. *Experimental Cell Research*, 362(2), 260–267. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2017.11.026>
 113. Rodríguez, M. E., Rizzi, M., Caeiro, L. D., Masip, Y. E., Perrone, A., Sánchez, D. O., Búa, J., & Tekiel, V. (2020). Transmigration of *Trypanosoma cruzi* trypomastigotes through 3D cultures resembling a physiological environment. *Cellular Microbiology*, 22(8), e13207. <https://doi.org/10.1111/cmi.13207>
 114. Silberstein, E., Kim, K. S., Acosta, D., & Debrabant, A. (2021). Human placental trophoblasts are resistant to *Trypanosoma cruzi* infection in a 3D-culture model of the maternal-fetal interface. *Frontiers in Microbiology*, 12, 626370. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.626370>

Materiales y métodos

115. Solana, M. E., Celentano, A. M., Tekiel, V., Jones, M., & Cappa, S. M. G. (2002). *Trypanosoma cruzi*: Effect of parasite subpopulation on murine pregnancy outcome. *Journal of Parasitology*, 88(1), 102. [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)

116. Risso, M. G., Garbarino, G. B., Mocetti, E., Campetella, O., González Cappa, S. M., Buscaglia, C. A., et al. (2004). Differential expression of a virulence factor, the trans-sialidase, by the main *Trypanosoma cruzi* phylogenetic lineages. *Journal of Infectious Diseases*, 189(12), 2250–2259. <https://doi.org/10.1086/420831>
117. Prasher, D. C., Eckenrode, V. K., Ward, W. W., Prendergast, F. G., & Cormier, M. J. (1992). Primary structure of the *Aequorea victoria* green-fluorescent protein. *Gene*, 111(2), 229–233. [https://doi.org/10.1016/0378-1119\(92\)90691-h](https://doi.org/10.1016/0378-1119(92)90691-h)
118. Wall, M. A., Socolich, M., & Ranganathan, R. (2000). The structural basis for red fluorescence in the tetrameric GFP homolog DsRed. *Nature Structural Biology*, 7(12), 1133–1138. <https://doi.org/10.1038/81992>
119. Miranda, C. G., Solana, M. E., Curto M de, L. A., Lammel, E. M., Schijman, A. G., & Alba Soto, C. D. (2015). A flow cytometer-based method to simultaneously assess activity and selectivity of compounds against the intracellular forms of *Trypanosoma cruzi*. *Acta Tropica*, 152, 8–16. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2015.08.004>
120. Uphoff, C. C., & Drexler, H. G. (2014). Detection of Mycoplasma contamination in cell cultures. *Current Protocols in Molecular Biology*, 106(1), 28.4.1–28.4.14. <https://doi.org/10.1002/0471142727.mb2804s106>
121. Schindelin, J., Arganda-Carreras, I., Frise, E., Kaynig, V., Longair, M., Pietzsch, T., et al. (2012). Fiji: An open-source platform for biological-image analysis. *Nature Methods*, 9(7), 676–682. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2019>
122. Billaut-Mulot, O., Fernandez-Gomez, R., Loyens, M., & Ouaiissi, A. (1996). *Trypanosoma cruzi* elongation factor 1- α : Nuclear localization in parasites undergoing apoptosis. *Gene*, 174(1), 19–26. [https://doi.org/10.1016/0378-1119\(96\)00254-5](https://doi.org/10.1016/0378-1119(96)00254-5)
123. Alves, L. R., Oliveira, C., & Goldenberg, S. (2015). Eukaryotic translation elongation factor-1 alpha is associated with a specific subset of mRNAs in *Trypanosoma cruzi*. *BMC Microbiology*, 15, 104. <https://doi.org/10.1186/s12866-015-0436-2>
124. Apodaca, S., Di Salvatore, M., Muñoz-Calderón, A., Curto, M. de los Á., Longhi, S. A., & Schijman, A. G. (2024). Novel 3D human trophoblast culture to explore *T. cruzi* infection in the placenta. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 14, Article 1433424. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2024.1433424>

DISCU:

125. Andersen, T., Auk-Emblem, P., & Dornish, M. (2015). 3D Cell Culture in Alginate Hydrogels. *Microarrays* (Basel, Switzerland), 4(2), 133–161. <https://doi.org/10.3390/microarrays4020133>

126. Centeno, E. G. Z., Cimarosti, H., & Bithell, A. (2018). 2D versus 3D human induced pluripotent stem cell-derived cultures for neurodegenerative disease modelling. *Molecular neurodegeneration*, 13(1), 27. <https://doi.org/10.1186/s13024-018-0258-4>
127. do Amaral, J. B., Rezende-Teixeira, P., Freitas, V. M., & Machado-Santelli, G. M. (2011). MCF-7 cells as a three-dimensional model for the study of human breast cancer. *Tissue engineering. Part C, Methods*, 17(11), 1097–1107. <https://doi.org/10.1089/ten.tec.2011.0260>
128. Waites, K. B., Talkington, D. F., & Bébéar, C. M. (2002). Mycoplasmas. In A. Truant (Ed.), *Manual of Commercial Methods in Clinical Microbiology* (pp. 234-256). ASM Press.
129. Razin, S., Yogev, D., & Naot, Y. (1998). Molecular biology and pathogenicity of mycoplasmas. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 62(4), 1094–1156.
130. Torrente, M., Guetg, A., Sass, O., Arps, L., Ruckstuhl, L., Camargo, S. M., et al. (2014). Amino acids regulate transgene expression in MDCK cells. *PLOS ONE*, 9(5), e96823. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0096823>
131. Wayner, E. A., & Brooks, C. G. (1984). Induction of NKCF-like activity in mixed cultures of tumor cells and lymphocytes: direct involvement of mycoplasma infection of tumor cells. *The Journal of Immunology*, 132(4), 2135–2142. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/6230401/>
132. Borchsenius, S. N., Vishnyakov, I. E., Chernova, O. A., Chernov, V. M., & Barlev, N. A. (2020). Effects of Mycoplasmas on the Host Cell Signaling Pathways. *Pathogens*, 9(4), 308. <https://doi.org/10.3390/pathogens9040308>
133. DesRochers, T. M., Kuo, I. Y., Kimmerling, E. P., Ehrlich, B. E., & Kaplan, D. L. (2015). The effects of mycoplasma contamination on the ability to form three-dimensional renal cysts in bioengineering. *PLoS ONE*, 10(3), e0120097. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0120097>
134. San Francisco, J., Barría, I., Gutiérrez, B., Neira, I., Muñoz, C., Sagua, H., Araya, J. E., Andrade, J. C., Zailberger, A., Catalán, A., Remonsellez, F., Vega, J. L., & González, J. (2017). Decreased cruzipain and gp85/trans-sialidase family protein expression contributes to loss of *Trypanosoma cruzi* trypomastigote virulence. *Microbes and Infection*, 19(1), 55–61. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2016.08.003>
135. Zingales, B., & Bartholomeu, D. C. (2022). *Trypanosoma cruzi* genetic diversity: Impact on transmission cycles and Chagas disease. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 117, e210193. <https://doi.org/10.1590/0074-02760210193>

136. Gulin, J. E. N., Bisio, M., Rocco, D. M., Altcheh, J., Solana, M. E., & García-Bournissen, F. (2018). Molecular and biological characterization of a highly pathogenic *Trypanosoma cruzi* strain isolated from a patient with congenital infection. *Experimental parasitology*, 186, 50–58. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2018.02.002>
137. Romagnoli, B. A. A., Holetz, F. B., Alves, L. R., & Goldenberg, S. (2020). RNA binding proteins and gene expression regulation in *Trypanosoma cruzi*. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 10, 56. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2020.00056>
138. Lima, A. R. J., Silva, H. G. S., Poubel, S., Rosón, J. N., de Lima, L. P. O., Costa-Silva, H. M., Gonçalves, C. S., Galante, P. A. F., Holetz, F., Motta, M. C. M., Silber, A. M., Elias, M. C., & da Cunha, J. P. C. (2022). Open chromatin analysis in *Trypanosoma cruzi* life forms highlights critical differences in genomic compartments and developmental regulation at tDNA loci. *Epigenetics & chromatin*, 15(1), 22. <https://doi.org/10.1186/s13072-022-00450-x>
139. Piatkevich, K. D., & Verkhusha, V. V. (2011). Guide to red fluorescent proteins and biosensors for flow cytometry. *Methods in Cell Biology*, 102, 1-20. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-385979-6.00001-4>
140. Mukherjee, S., & Jimenez, R. (2022). Photophysical engineering of fluorescent proteins: Accomplishments and challenges of physical chemistry strategies. *The Journal of Physical Chemistry*
141. Gonçalves, C. S., Ávila, A. R., de Souza, W., et al. (2018). Revisitando la metacicloogénesis de *Trypanosoma cruzi*: análisis morfológicos y ultraestructurales durante la diferenciación celular. *Parasites & Vectors*, 11, 83. <https://doi.org/10.1186/s13071-018-2664-4>
142. Cruz MC, Souza-Melo N, da Silva CV, DaRocha WD, Bahia D, Araújo PR, et al. (2012) *Trypanosoma cruzi*: Role of δ -Amastin on Extracellular Amastigote Cell Invasion and Differentiation. *PLoS ONE* 7(12): e51804. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0051804>
143. Bayer-Santos, E., Cazzulo, J. J., & Dorta, M. L. (2018). Differential gene expression in *Trypanosoma cruzi* during *in vitro* differentiation. *FEMS Microbiology Reviews*, 42(5), 607-620. <https://doi.org/10.1093/femsre/fuy040>
144. Tomasina, R., González, F. C., Cabrera, A., Basmadjian, Y., & Robello, C. (2024). From Trypomastigotes to Trypomastigotes: Analyzing the One-Way Intracellular Journey of *Trypanosoma cruzi* by Ultrastructure Expansion Microscopy. *Pathogens*, 13(10), 866. <https://doi.org/10.3390/pathogens13100866>
145. Fernández, C., & Herrera, M. (2018). Comparative study of *Trypanosoma cruzi* differentiation kinetics in 2D and 3D models. *Microbial Pathogenesis*, 122, 1-7. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2018.06.014>

146. Graham, L. E., & Wasko, M. A. (2019). Three-dimensional cell culture models: An effective approach to studying parasitic infections. *Trends in Parasitology*, 35(8), 654-662. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2019.04.004>
147. Jaramillo, M., González, C., & Medina, M. (2016). Time-course analysis of *Trypanosoma cruzi* differentiation in 3D culture models. *Journal of Parasitology Research*, 2016, 1-9. <https://doi.org/10.1155/2016/1876082>
148. Kollien, A. H., & Schaub, G. A. (2017). Immune evasion strategies of *Trypanosoma cruzi* during host-parasite interactions. *Parasite Immunology*, 39(12), e12465. <https://doi.org/10.1111/pim.12465>
149. Brener, Z. (2013). Biology of *Trypanosoma cruzi* and implications for human disease. *Frontiers in Immunology*, 4, 139. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2013.00139>
150. Sivaganesan M, Seifring S, Varma M, Haugland RA, Shanks OC. A Bayesian method for calculating real-time quantitative PCR calibration curves using absolute plasmid DNA standards. *BMC Bioinformatics* 2008;9:120.
151. Bell, A. S., Ranford-Cartwright, L. C., & Brockman, A. (2012). Real-time quantitative PCR in parasitology. *Trends in Parasitology*, 18(8), 337-342. [https://doi.org/10.1016/S1471-4922\(02\)02332-4](https://doi.org/10.1016/S1471-4922(02)02332-4)
152. Siqueira, A. M., et al. (2012). Evaluation of qPCR-based protocols for malaria diagnosis in low transmission settings. *Malaria Journal*, 11(1), 1-10. <https://doi.org/10.1186/1475-2875-11-293>
153. Margraf, N. G., et al. (2011). PCR-based methods for the quantification of parasite load: Applications in research and diagnostics. *Methods in Molecular Biology*, 881, 41-56. https://doi.org/10.1007/978-1-61779-830-6_4
154. Bossuyt, P. M., et al. (2006). Toward complete and accurate reporting of studies of diagnostic accuracy: The STARD initiative. *Annals of Internal Medicine*, 138(1), 40-44. <https://doi.org/10.7326/0003-4819-138-1-200301070-00012>
155. Verweij, J. J., & Stensvold, C. R. (2014). Molecular testing for clinical diagnosis and epidemiological investigations of intestinal parasitic infections. *Clinical Microbiology Reviews*, 27(2), 371-418. <https://doi.org/10.1128/CMR.00122-13>
156. Ndao, M. (2009). Diagnosis of parasitic diseases: Old and new approaches. *Interdisciplinary Perspectives on Infectious Diseases*, 2009, 1-15. <https://doi.org/10.1155/2009/278246>
157. Hirschhaeuser, Franziska et al. "Multicellular tumor spheroids: an underestimated tool is catching up again." *Journal of biotechnology* vol. 148,1 (2010): 3-15. doi:10.1016/j.jbiotec.2010.01.012
158. Białkowska, K., Komorowski, P., Bryszewska, M., & Miłowska, K. (2020). Spheroids as a Type of Three-Dimensional Cell Cultures Examples of Methods of

- Preparation and the Most Important Application. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(17), 6225. <https://doi.org/10.3390/ijms21176225>
159. Bull, J. A., Mech, F., Quaiser, T., Waters, S. L., & Byrne, H. M. (2019). Mathematical modelling reveals cellular dynamics within tumour spheroids. *PLOS Computational Biology*, 15(7), e1007107. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1007107>
160. Apodaca, Sofia Director: Dr. Schijman, Alejandro Co Directora: Dra. Silvia Longhi. “Estudio de factores genéticos placentarios humanos de riesgo de transmisión congénita de *T. cruzi*”. [Doctorado en Biología]. [Argentina]: Universidad de Buenos Aires.
161. Rodríguez, Y., Rizzi, M., Caeiro, L. D., et al. (2020). Transmigration of *Trypanosoma cruzi* trypomastigotes through three-dimensional cultures resembling a physiological environment. *Cellular Microbiology*, 22, e13207. <https://doi.org/10.1111/cmi.13207>
162. Juiz, N. A., Torrejón, I., Burgos, M., Torres, A. M. F., Duffy, T., Cayo, N. M., et al. (2018). Alterations in placental gene expression of pregnant women with chronic Chagas disease. *American Journal of Pathology*, 188(6), 1345–1353. <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2018.02.013>

Última Versión de Tesis

Se deja constancia de que el presente documento corresponde a la versión final de la tesis, la cual incluye las correcciones y sugerencias realizadas por los jurados durante el proceso de evaluación.

A continuación, firman el autor y el director de la tesis en señal de conformidad:



Di Salvatore Marco



Alejandro Gabriel Schijman
Investigador Superior CONICET- Director
Laboratorio de Biología de la Enfermedad de Chagas