

## 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- $\alpha$*  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  $341,30 \pm 24,52$   $\mu\text{m}$  para los *large* (1000 células por micropocillo) y  $163,28 \pm 6,98$   $\mu\text{m}$  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.

## Palabras claves

*Trypanosoma cruzi*, enfermedad de Chagas, transmisión congénita, Chagas congénito, transmisión vertical, placenta, trofoblasto, vellosidades coriónicas, infección placentaria, unidades discretas de tipificación (UDT), modelos *in vitro*, cultivos bidimensionales (2D), cultivos tridimensionales (3D), línea celular BeWo, células HeLa, células Vero, carga parasitaria, PCR cuantitativa en tiempo real, esferoides 3D, infectividad, tropismo placentario, microambiente placentario, 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- $\alpha$  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  $\mu\text{m}$  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.

## Keywords

*Trypanosoma cruzi*, Chagas disease, congenital transmission, congenital Chagas, vertical transmission, placenta, trophoblast, chorionic villi, placental infection, discrete typing units (DTUs), *in vitro* models, two-dimensional (2D) cultures, three-dimensional (3D) cultures, BeWo cell line, HeLa cells, Vero cells, parasite load, quantitative real-time PCR, 3D spheroids, infectivity, placental tropism, placental microenvironment, transplacental transmission.