



**Facultad de Medicina  
Centro de Investigaciones Biomédicas**

**“ROL DE LOS RECEPTORES TIPO *TOLL* EN LA RESPUESTA  
INMUNE INNATA DEL TROFOBLASTO ANTE LA INFECCIÓN  
POR *Toxoplasma gondii*”**

**Tesis para optar al grado de Magíster en Ciencias Médicas, mención en  
Biología Celular y Molecular**

**Lorena Soledad Muñoz Villanueva**

**Realizado en**

Laboratorio “Mecanismos de Infección Parasitaria”  
Instituto de Ciencias Biomédicas, Universidad de Chile



**Directora de Tesis: Dra. Ulrike Kemmerling**



Facultad de Medicina  
Escuela de Medicina  
Magíster en Ciencias Médicas Mención Biología Celular y Molecular

**“ROL DE LOS RECEPTORES TIPO *TOLL* EN LA RESPUESTA INMUNE INNATA DEL TROFOBLASTO ANTE LA INFECCIÓN POR *Toxoplasma gondii*”**

**Lorena Soledad Muñoz Villanueva**

Este trabajo se realizó bajo la supervisión de la Directora de Tesis Dra. Ulrike Kemmerling en el laboratorio de “Mecanismos de Infección Parasitaria” del Instituto de Ciencias Biomédicas de la Universidad de Chile y ha sido aprobado por los miembros de la Comisión:

Dr. Sebastián San Martín Henríquez  
Comisión Evaluación Tesis  
Profesor Patrocinante

Dr. Juan Diego Maya Arango  
Comisión Evaluación Tesis  
Profesor Informante

Dr. Carlos Escudero Orozco  
Comisión Evaluación Tesis  
Profesor Informante

**Valparaíso, Chile  
2016**

# ÍNDICE

ABREVIATURAS	4
RESUMEN	5
INTRODUCCIÓN	6
- Toxoplasmosis	6
- Toxoplasmosis Congénita	8
- <i>T. gondii</i>	9
- Respuesta inmune ante <i>T. gondii</i>	10
- Rol de los TLRs en la respuesta inmune ante <i>T. gondii</i>	12
- <i>T. gondii</i> es reconocido por TLR-2, TLR-4, TLR-7 y TLR-9	12
- Respuesta inmune durante el embarazo	12
- Rol de la placenta en la respuesta inmune contra patógenos	13
- Modelos de estudio de trofoblasto	15
HIPÓTESIS DE TRABAJO	16
MATERIAL Y MÉTODO	17
RESULTADOS	23
- Objetivo específico Nº 1	23
- Objetivo específico Nº 2	31
- Objetivo específico Nº 3	42
DISCUSIÓN	44
CONCLUSIONES	49
BIBLIOGRAFÍA	50

## ABREVIATURAS UTILIZADAS

ANDEVA:	Análisis de Varianza.
ARN:	Ácido Ribonucleico.
CT :	Citotrofoblasto.
DAB:	Diaminobencidina.
DALY:	<i>Disability-Adjusted Life Years</i> : años de vida ajustados por discapacidad.
DAPI	4',6-diamino-2-fenilindol.
DNA:	<i>Deoxyribonucleic acid</i> : Ácido Desoxirribonucleico.
EDTA:	Ácido etilendiaminetetraacético
GAPDH:	Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa.
GPI:	Glicofosfatidilinositol.
HPCVE:	<i>Human Placental Chorionic Villi Explants</i> : Explantes de vellosidades coriónicas de placentas humanas.
IgG:	Inmunoglobulina G.
IgM:	Inmunoglobulina M.
IL:	Interleuquina.
IFN:	Interferón.
IRFs:	Proteínas reguladoras de IFN.
LPS:	Lipopolisacáridos.
MAPKs:	Proteína quinasas activadas por mitógenos.
ml:	mililitro.
mM:	milimolar.
MyD88:	Factor 88 de diferenciación mieloide.
NF-kB:	Factor nuclear-kappa Beta.
NK:	<i>Natural Killer</i>
ODN:	Oligodeoxynucleotido
PAMPs:	<i>Pathogen Associated Molecular Patterns</i> : Patrones Moleculares Asociados a Patógenos.
PBS:	<i>Phosphate buffered saline</i> : Buffer fosfato salino.
PBST:	<i>Buffer fosfato salino- Tween</i> .
PRR:	<i>Pattern Recognition Receptors</i> : Receptor de reconocimiento de patrones.
PSA:	Persulfato de Amonio.
RPMI:	<i>Roswell Park Memorial Institute Medium</i> .
SDS:	Dodecilsulfato sódico.
SFB:	Suero Fetal Bovino.
ST:	Sinsiciotrofoblasto.
Th 1:	<i>T Helper 1</i> .
Th 2:	<i>T Helper 2</i> .
TIR:	<i>toll</i> /interleukin-1 receptor.
TLR:	Receptores tipo <i>Toll</i> .
TNF:	<i>Tumor Necrosis Factor</i> : Factor de Necrosis Tumoral.
TRIF:	Proteína adaptadora e inductora de IFN- $\gamma$
$\mu$ m:	micrómetro.

## RESUMEN

*Toxoplasma gondii* (*T. gondii*) es un protozoo intracelular y agente causal de la Toxoplasmosis, una de las principales zoonosis que afecta aproximadamente a un tercio de la población mundial.

La toxoplasmosis puede provocar efectos severos e incluso letales cuando se desarrolla en inmunocomprometidos o cuando es adquirida de forma congénita. Durante la transmisión vertical, *T. gondii* debe traspasar la barrera placentaria, cuyo primer componente es el trofoblasto, un epitelio bi-estratificado que expresa receptores que reconocen a patrones macromoleculares de patógenos, entre los que destacan los receptores tipo *Toll* (TLRs).

Los TLR-2, 4 y 9, presentes en el trofoblasto, reconocen a *T. gondii*, y su activación lleva a la secreción de citoquinas que pueden participar en la defensa placentaria ante el parásito.

Se estudió en un modelo de infección *ex vivo* de explantes de vellosidades coriónicas de placentas humanas (HPCVE) y en una línea celular de trofoblasto (células BeWo), la expresión de los TLR-2, 4 y 9, la secreción de citoquinas mediadas por estos TLRs, específicamente a citoquinas IL-1 $\beta$ , IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, IFN- $\gamma$  y TNF- $\alpha$ , así como el efecto de la inhibición de estos receptores sobre la infectividad del parásito, para poder estudiar parte de los mecanismos antiparasitarios locales de la placenta ante la presencia del parásito.

La expresión de TLRs fue evaluada mediante western blot e inmunofluorescencia, la secreción de citoquinas fue determinada mediante ensayos de ELISA. La infección de *T. gondii* fue evaluada mediante qPCR utilizando el método de control comparativo ( $\Delta\Delta\text{Ct}$ ). Los resultados fueron concluyentes en HPCVE no así en células BeWo.

En HPCVE, *T. gondii* induce la expresión proteica de TLR-2 y TLR-4 y modula la secreción de citoquinas pro y anti-inflamatorias. La inhibición de los TLR-4 y TLR-9 aumenta la infección con el parásito. Estos resultados sugieren que los TLRs estudiados así como el perfil de citoquinas asociado, son modulados por el parásito y que forman parte de los mecanismos antiparasitarios de la placenta humana.

# INTRODUCCIÓN

## **Toxoplasmosis**

La toxoplasmosis es una enfermedad causada por el protozoo *Toxoplasma gondii* (*T. gondii*), siendo la infección parasitaria más prevalente en humanos. Así, *T. gondii* ha sido capaz de infectar a aproximadamente un tercio de la población mundial<sup>1,2,3</sup>.

La seroprevalencia mundial del parásito medida por anticuerpos específicos anti-Toxoplasma IgG varía entre el 1% y el 100%, dependiendo de las condiciones ambientales y socioeconómicas, incluyendo los hábitos alimentarios y las prácticas de salud, el nivel de higiene, la susceptibilidad del huésped, la ubicación geográfica y la humedad del suelo. La incidencia de infección es mayor en climas cálidos y húmedos y aumenta con la edad<sup>3</sup>. En Estados Unidos, el Centro para el Control y Prevención de Enfermedades (CDC), periódicamente testea muestras desde el "National Health and Nutrition Examination Survey" (NHANES) para estimar la prevalencia de *T. gondii*, siendo, en su última evaluación (2009-2010) de 13.2% en personas  $\geq$  de 6 años y la prevalencia ajustada por edad en mujeres entre los 15 y los 44 años de 9.1%<sup>4</sup>. En Chile los datos existente corresponden a una investigación realizada entre los años 1982 y 1994, utilizando la reacción de hemaglutinación indirecta. El estudio incluyó a 76.317 personas sanas de diferentes edades procedentes de 309 localidades urbanas y rural-periurbanas, resultando positivo en el 36.9%. Dentro de este estudio destaca el hecho que se estudiaron 19.426 mujeres parturientas de zona urbana, en donde 38,8% resultaron positivas.<sup>5</sup>

El éxito de la infección de *T. gondii* depende de la capacidad de establecer un delicado balance entre la respuesta inmune del hospedero, que intenta la eliminación del parásito, y las estrategias de evasión inmune o de inmunomodulación iniciadas por el parásito, permitiendo así la supervivencia tanto del parásito como del huésped<sup>6</sup>.

*T. gondii* fue descrito por primera vez en 1908 por Charles Jules Henry Nicolle y Louis Herbert Manceaux en roedores del norte de África (*Ctenodactylus gondii*) y por Alfonso Splendore en conejos de laboratorios en Brasil<sup>7</sup>. La infección con *T. gondii* en estos animales fue descrito como letal<sup>8</sup>, sin embargo no fue hasta 1965 en que se asocia la infección por *T. gondii* y las heces de gato. Previamente fue descrita la transmisión congénita en humanos (1939) y en muchas otras especies de animales como ovejas y roedores (1957), además fue sugerida la transmisión por carne infectada y poco cocida (1954 y 1960)<sup>9</sup>.

La infección en humanos es producida de manera accidental por la ingestión de carne deficientemente cocinada, con presencia de quistes de *T. gondii* en su tejido o por la ingestión de comida y/o agua contaminada por ooquistes, la forma celular de resistencia en el medio ambiente.

La toxoplasmosis es una enfermedad asintomática en individuos inmunocompetentes, estableciéndose como una infección crónica que raramente causa una sintomatología aguda en estos individuos, pero puede ser severa y fatal bajo dos circunstancias: en los casos de toxoplasmosis congénita y en pacientes inmunocomprometidos<sup>6</sup>.

### **Infecciones Congénitas**

El ser humano, durante su ciclo biológico se ve expuesto a una gran variedad de patógenos como virus, bacterias, hongos y parásitos que pueden desencadenar una gran variedad de enfermedades infecciosas. Sin embargo, algunas de estas, son mucho más peligrosas cuando ocurren en la mujer embarazada por su potencial riesgo de transmisión vertical, es decir, desde la madre al feto/recién nacido<sup>10,11</sup>.

Los parásitos conocidos por ser transmitidos congénitamente son principalmente protozoos, dentro de los cuales encontramos a *T. gondii*. Las infecciones parasitarias afectan anualmente a un millón de mujeres embarazadas a nivel mundial y pueden afectar directa o indirectamente al feto provocando retardo del crecimiento intrauterino, diversas malformaciones congénitas, abortos espontáneos o mortinatos<sup>12</sup>.

Las infecciones durante el embarazo se relacionan con un alto riesgo de presentar partos prematuros (nacimiento entre las 20 y 37 semanas de gestación), producto de la respuesta inflamatoria desencadenada que conlleva al inicio del trabajo de parto prematuro y lesiones en el desarrollo pulmonar y cerebral del feto. La prematuridad es la principal causa a nivel mundial de morbi-mortalidad neonatal. A nivel mundial cada año 15 millones de recién nacidos son prematuros, correspondiendo a aproximadamente el 11% de todos los partos. Las infecciones durante el embarazo han sido considerada uno de los mayores factores de riesgos para partos prematuros, contribuyendo en al menos un 25% de estos.

Las infecciones perinatales causan el 2% a 3% de todas las anomalías congénitas. Entre estas, encontramos un grupo que causan similares efectos teratogénicos en el feto/recién nacido y fueron agrupadas bajo el acrónimo de TORCH (**T**oxoplasmosis; **O**tros como por ejemplo la sífilis, el virus de la varicela zoster y parvovirus B19; **R**ubéola; **C**itomegalovirus; **H**erpes Simple). Las infecciones TORCH son las principales contribuyentes en la morbi-mortalidad pre-natal, peri-natal y post-natal<sup>12,13</sup>.

Es importante destacar que las tasas de infección de algunos de estos parásitos son relativamente bajas, así por ejemplo la tasa de transmisión de *Trypanosoma cruzi* es entre el 1 y el 12%<sup>14</sup>, pero en contraste *T. gondii* presenta altas tasas que varían entre el 22 y 72%<sup>10</sup>. Estos hechos indican la presencia de distintos mecanismos de infección de los patógenos así como de susceptibilidad diferencial de la placenta humana<sup>15,16</sup>.

La transmisión congénita de patógenos es consecuencia de una compleja interacción

entre el parásito, la respuesta inmune materna y del feto/recién nacido y factores placentarios<sup>15</sup>.

### **Toxoplasmosis Congénita**

La infección congénita es la consecuencia de la transmisión de los patógenos vivos desde la mujer embarazada infectada al feto y que persiste en él después del nacimiento. Esta transmisión puede suceder antes del nacimiento (pre-natal), es decir *in útero* o durante el momento del parto (peri-natal)<sup>10</sup>.

La transmisión vertical por *T. gondii* se produce sólo cuando la infección primaria ocurre cuando la mujer está embarazada. El periodo gestacional en que ocurra esta primera infección es determinante para que ocurra la infección transplacentaria del feto y la consecuente morbi-mortalidad en éste. Así, cuando la infección ocurre al inicio del embarazo, la tasa de transmisión será menor, pero aumenta el riesgo de severidad de las secuelas y abortos. Por otra parte, cuando la seroconversión ocurre entre las 24 y 30 semanas de gestación el riesgo de transmisión es mayor. Por lo tanto, si la infección materna ocurre en el primer o segundo trimestre de la gestación hay una baja tasa de infección fetal (de 9% a 27%), si la infección ocurre en el tercer trimestre la probabilidad de infección fetal alcanza niveles sobre el 60%<sup>17</sup>. La mujer gestante, igual a lo que se observa en el adulto inmunocompetente, será asintomática o tendrá una leve sintomatología que hará difícil establecer su diagnóstico. Sin embargo, en el recién nacido infectado se describen procesos como corioretinitis, calcificaciones intracraneales e hidrocefalia, las cuales se consideran como triada clásica de signos sugerentes de toxoplasmosis congénita<sup>2,18</sup>.

La toxoplasmosis congénita se manifiesta con cuatro posibilidades de presentación clínica: 1.- neonato sintomático, en el cual la corioretinitis es el signo más común observado en el recién nacido; 2.- leves o severas manifestaciones de la enfermedad en el primer mes de vida; 3.- secuelas observadas durante la niñez o adolescencia de una infección previa no diagnosticada ó 4.- infección subclínica<sup>17</sup>.

La incidencia anual de la toxoplasmosis congénita a nivel mundial es de 190.100 casos. Esto equivale a una tasa de incidencia de aproximadamente 1,5 casos de toxoplasmosis congénita por cada 1000 nacidos vivos. Lo que equivale a una carga de 1,20 millones de años de vida ajustados por discapacidad (DALYs). En Sudamérica se observan tasas elevadas y esto se debería a la presencia de los genotipos más patógenos que circulan en esta zona. Se considera que en alrededor del 30% de las mujeres que presenten la infección primaria durante la gestación transmiten la infección al feto<sup>18</sup>.

## **T. gondii**

*T. gondii* es un protozoo intracelular obligado, perteneciente al *Phylum* Apicomplexa caracterizado por una estructura celular polarizada, con la presencia de un complejo apical que contiene elementos de citoesqueleto (conoide y anillo polar) y organelos secretorios tales como micronemas, rhoptrias y gránulos densos que cumplen un rol fundamental para el reconocimiento, la adhesión, invasión, la sobrevivencia intracelular y proceso de replicación al interior de la célula hospedera del parásito y su final liberación. El completar con éxito estos procesos depende de gran manera del funcionamiento coordinado y exacto de estos organelos<sup>19</sup>.

*T. gondii* ha sido clasificado en tres predominantes linajes (tipo I, II y III), de los cuales el tipo I es el más virulento y el principal responsable de la transmisión congénita en América del Sur. En Europa y América del Norte, el linaje tipo II es responsable del 80% de las infecciones congénitas<sup>20</sup>.

*T. gondii* presenta un ciclo biológico complejo, en el cual se identifican tres estados celulares básicos: esporozoitos, taquizoitos y bradizoitos. Todas las formas celulares presentan una forma de media luna, de aproximadamente 2 a 6 µm de ancho y 4 a 8 µm de longitud. Su ciclo biológico posee dos fases, una fase sexual y otra asexual. La fase sexual se desarrolla en el intestino del hospedero definitivo que son todos mamíferos de la familia de los felinos, incluido el gato doméstico. La reproducción sexuada ocurre en las células enteroepiteliales en las cuales se desarrollan los gametos, los que posteriormente forman los ooquistes<sup>21</sup>. En el ooquiste se forman los esporozoitos y éste constituye la única forma celular del parásito capaz de sobrevivir en el medio ambiente. Los ooquistes contaminan el suelo y por ende agua y/o los vegetales y pueden ser consumidos directamente por mamíferos, incluido el hombre, que constituyen los hospederos intermediarios. En los hospederos intermediarios se generan quistes con bradizoitos en sus tejidos. El ser humano puede infectarse también indirectamente al consumir carne mal cocida de un hospedero intermediario. Luego del consumo, tanto el ooquiste como los quistes de tejido se romperán liberándose los esporozoitos o bradizoitos, respectivamente. En el intestino delgado tanto esporozoito como bradizoito penetran el epitelio y se diferencian inmediatamente a taquizoitos, que son de proliferación rápida, capaz de infectar a cualquier célula nucleada y diseminarse por todo el organismo<sup>22</sup>.

El taquizoito es la forma celular predominante durante la infección aguda, los parásitos se replican cada 6 a 8 horas en un proceso llamado endodiogenia. La multiplicación de los taquizoitos ocurre dentro de un compartimiento intracelular denominado vacuola parasitófora. Esta vacuola evita la fusión con la vía endo-lisosomal de la célula huésped y es esencial para el crecimiento intracelular del parásito. El parásito induce cambios en la expresión génica del huésped que facilitan la supervivencia del parásito en las células huésped, incluyendo

moléculas implicadas en las vías de transducción de señales, de defensas inmunitarias y de la apoptosis<sup>22</sup>.

La fase aguda de la infección ocurre los primeros 8 a 12 días, y es generalmente asintomática. Los taquizoitos migran a los diversos tejidos y órganos blanco (tejidos musculares, cerebro y ojo), en los cuales se diferenciarán a bradizoitos formando quistes, los que pueden permanecer como tales durante toda la vida del hospedero intermediario<sup>2</sup>. Su manifestación clínica incluye alteración del estado mental, convulsiones, astenia, alteración en los nervios craneales, anormalidad sensorial, disfunción cerebelosa, meningitis, desordenes del movimiento y alteraciones neuropsiquiátricas<sup>23,24</sup>. En los casos de toxoplasmosis congénita puede ocurrir la muerte fetal y abortos, así como diversas manifestaciones clínicas en el recién nacido<sup>22,18</sup>.

En caso de primoinfección en una mujer embarazada, el parásito puede alcanzar a la placenta y así infectar al feto o inducir aborto en etapas más tempranas del embarazo. La probabilidad de traspasar la barrera placentaria depende del linaje del parásito, respuesta inmune de la madre y feto en desarrollo así como la placenta, siendo la placenta el factor menos estudiado<sup>15</sup>.

### **Respuesta inmune ante *T. gondii***

La infección con *T. gondii* activa tanto a la respuesta inmune innata como adaptativa, implicando una serie coordinada de interacciones celulares entre los parásitos, los enterocitos, los monocitos, células dendríticas, macrófagos, células *natural killer* (NK), neutrófilos, entre otros. Las células dendríticas juegan un papel central en la estimulación de la respuesta inmune innata e iniciación de la respuesta inmune adaptativa<sup>25</sup>.

El parásito luego de ser ingerido por el hospedero intermediario, ya sea en ooquistes o en quistes tisulares, debe enfrentar la primera línea de defensa del sistema innato: las células epiteliales del intestino. Una vez que invade los enterocitos en el intestino delgado, el parásito se replicará rápidamente. La replicación del parásito en el intestino conduce a la lisis celular en el hospedero y la liberación de los taquizoitos. Adicionalmente, los parásitos también pueden atravesar el epitelio, sin la ruptura de la capa endotelial e infectar directamente a células de la lámina propia. Los enterocitos infectados con parásitos secretan quimioquinas que reclutan células dendríticas en la lámina propia. En la lámina propia, el parásito puede invadir a las células dendríticas, a los macrófagos o entrar directamente en el sistema linfático y/o circulatorio. El parásito alcanza eficazmente a todos los órganos del cuerpo a través de su capacidad de sobrevivir en los macrófagos y las células dendríticas tomando ventaja de la propiedad migratoria de estos.

La respuesta inmune innata corresponde a la primera línea de defensa frente a las

infecciones. Las barreras epiteliales forman parte del sistema inmune innato, estableciendo una barrera física<sup>26</sup> y que junto a la producción de péptidos antimicrobianos locales previenen la entrada y destruyen al microorganismo<sup>27</sup>.

Un número limitado de patógenos, incluyendo parásitos, bacterias, virus y hongos, son capaces de atravesar las barreras biológicas que fisiológicamente son no permisivas, tales como las barreras hemato-encefálica, placentaria e intestinal. Cuando *T. gondii* infecta a su hospedero intermediario, debe cruzar primero el epitelio intestinal, para difundir en los tejidos profundos y atravesar luego las barreras placentaria y hemato-encefálica para llegar a los sitios inmunológicamente privilegiados.

La infección primaria con *T. gondii* estimula la producción de altos niveles de Interleuquina 12 (IL-12) y de interferón  $\gamma$  (INF- $\gamma$ )<sup>6</sup> por células del sistema inmune innato. Los efectos de estas dos citoquinas provocan una fuerte respuesta inmune adaptativa mediada por células tipo Th1, CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup>. Células dendríticas, macrófagos y neutrófilos infectados por el parásito sintetizan a IL-12 e inducen la síntesis de INF- $\gamma$  por células NK y linfocitos T<sup>28</sup>. INF- $\gamma$  es la citoquina principal que controla tanto las fases aguda y crónica de la infección, activando mecanismos anti-parasitarios tanto en células hematopoyéticas, por ejemplo macrófagos, como no hematopoyética, siendo células endoteliales, fibroblastos, y astrocitos ejemplos de éstos últimos<sup>29</sup>.

La respuesta inflamatoria inducida por IL-12 e INF- $\gamma$  requiere de un mecanismo que disminuya los potenciales daños provocados por los altos niveles de éstas citoquinas en respuesta a la infección y es así que citoquinas anti-inflamatorias, principalmente IL-10, juegan un rol fundamental en la amortiguación de la respuesta<sup>6</sup>.

El reconocimiento de organismos patógenos y por consiguiente, la activación de las células de la respuesta inmune innata, ocurre gracias a la acción de PRRs (receptores de reconocimiento de PAMPs)<sup>30</sup>, dentro de los cuales se encuentran los receptores tipo *Toll* (TLRs), *C-type lectin receptors*, *NOD like receptors* y *RIG-I-Like receptors*. Los PAMPs (patrones macromoleculares de patógenos) son ligandos presentes en la superficie del parásito y se caracterizan por no expresarse en las células del hospedero, ser muy conservadas y ser esenciales para la supervivencia del patógeno. La unión de los PAMPs a los PRRs desencadena la activación de vías de señalización intracelular que resultan en la inducción de la respuesta inmune<sup>30,31</sup>.

De los receptores anteriormente nombrados, los (TLRs) son los PRRs más estudiados<sup>31</sup>. El trofoblasto expresa todos los tipos de TLRs humanos (10) descritos hasta este momento<sup>32</sup>. La activación de los TLRs por patógenos lleva a la producción de citoquinas y factores antimicrobianos, además, la señalización por TLR regula la expresión de moléculas co-estimuladoras que contribuyen al establecimiento de la inmunidad adaptativa<sup>33,34</sup>.

## **Rol de los TLRs en la respuesta inmune ante *T. gondii***

Los TLRs constituyen proteínas trans-membranas de tipo I, que se expresan tanto en células del sistema inmune como en células no inmunes<sup>35</sup>, incluyendo a células epiteliales de las mucosas intestinal y del sistema reproductor femenino<sup>36</sup>.

Los TLRs poseen en su extremo amino-terminal repeticiones ricas en Leucina que reconocen a los PAMPs y en su extremo carboxilo-terminal un dominio, que es compartido con los receptores que reconocen a IL-1, denominado TIR (*toll*/interleukin-1 receptor). TIR inicia cascadas de señalización intracelular, uniéndose y activando proteínas adaptadoras para el dominio TIR como es el factor 88 de diferenciación mielóide (MyD88) y proteína adaptadora e inductora de IFN- $\gamma$  (TRIF). La activación de estas vías culmina en la activación del factor nuclear  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B), proteínas reguladoras de IFN (IRFs) y proteína quinasas activadas por mitógenos (MAPKs) que regulan la expresión de citoquinas, quimioquinas e IFN de tipo I<sup>30,35</sup>.

Interesantemente, diferentes tipos celulares ya sea del sistema inmune u otros tejidos expresan diferentes repertorios de TLRs, que pueden resultar en respuestas distintas frente a un mismo ligando.

## ***T. gondii* es reconocido por TLR-2, TLR-4, TLR-7 y TLR-9**

TLR-2 y TLR-4 son receptores de membrana citoplasmática, que reconocen lípidos unidos a glicofosfatidilinositol (GPI) de la membrana plasmática del parásito. TLR-7 y TLR-9 son receptores intracelulares que reconocen a RNA de una hebra y DNA rico en CpG no metilado, respectivamente<sup>37,38</sup>.

La unión de *T. gondii* a TLR-2 induce la activación de macrófagos y la consiguiente producción de óxido nítrico y la secreción de algunas quimioquinas.

El reconocimiento del parásito por TLR-4 activa vías de transducción de señales tanto MyD88 como TRIF-dependientes. La activación de estas vías es controlada por varias moléculas para inducir las respuestas apropiadas para la producción equilibrada de citoquinas inflamatorias y IFN de tipo I, por activación de IRF3, NF- $\kappa$ B y MAPKs<sup>35</sup>.

TLR-9 es un activador importante de la expresión de IL-12 y TNF- $\alpha$  por las células dendríticas. La unión de DNA con TLR-9 ocurre en endosomas a nivel intracelular.

## **Respuesta inmune durante el embarazo**

El embarazo es un evento de tolerancia inmunológica, caracterizado por la habilidad de la madre de permitir la implantación del embrión en su útero. Actualmente, es apropiado referirse al embarazo como una etapa en la cual el estado inmune se encuentra modulado,

pero no suprimido<sup>39</sup>. Se han caracterizado tres fases inmunológicas definidas durante la preñez en humano. En la primera fase los procesos de implantación y placentación, que ocurren durante las primeras dos semanas del embarazo, asemejan a un proceso de herida abierta, por lo que se caracterizan por una respuesta inflamatoria potente. Durante esta primera etapa, el blastocisto debe atravesar las capas epiteliales del útero para la implantación y romper el tejido endometrial para invadir, proceso que es seguido por el reemplazo del endotelio y el músculo liso de los vasos sanguíneos por trofoblasto para asegurar una adecuada irrigación placentaria. Durante este proceso, un ambiente inflamatorio es requerido para asegurar la adecuada reparación del epitelio uterino y la remoción de los desechos celulares. La segunda fase inmunológica se caracteriza por un período de rápido desarrollo pre-natal, en el cual la madre, la placenta y el embrión/feto están en un estado simbiótico caracterizado por la predominancia de un estado inmunológico anti-inflamatorio. La última fase ocurre previa al parto, en donde los órganos del feto están funcionalmente maduros y preparados para la vida extra-uterina. Durante el parto, hay una gran migración de células inmunes hacia el miometrio para promover la re-activación del proceso inflamatorio, el cual promueve la contracción del útero, la expulsión del bebé y luego la expulsión de la placenta<sup>40,41</sup>

Durante el embarazo los cambios inmunológicos están diseñados para favorecer la tolerancia materna a los aloantígenos paternos, ayudar a la implantación exitosa de la placenta y, posteriormente, asegurar la supervivencia y desarrollo del feto, y estos cambios se ven potenciados por una serie de hormonas que alteran su concentración durante la gestación como el estrógeno, la testosterona y, la más significativa, la progesterona<sup>42</sup>. Actualmente se conoce que la progesterona inhibe a IL-12, TNF y la producción de óxido nítrico por los macrófagos, aumenta la producción de IL-10 por las células dendríticas, reduce la actividad de las células NK, inhibe el desarrollo de respuestas de las células T-Th1 y fomenta el desarrollo de una respuesta Th2<sup>42</sup>. Estas alteraciones se deben a que, por lo general, una respuesta inmune pro-inflamatoria de tipo Th1 es incompatible con el éxito del embarazo<sup>39</sup>. Esto, por supuesto, puede comprometer la capacidad del huésped para controlar las infecciones intracelulares y, de hecho, la gravedad de varias enfermedades infecciosas puede ser mayor durante el embarazo incluyendo las causadas por *Plasmodium chabaudi*, *Leishmania major*, *Leishmania donovani* y *T. gondii*, entre otros.

### **Rol de la placenta en la respuesta inmune contra patógenos**

La placenta está formada por una zona de origen fetal (corion frondoso) y otra de origen materno (decidua basal); cumple diferentes funciones fisiológicas como de síntesis de hormonas (proteicas y esteroideas), secreción y de transporte, facilitando así el intercambio de gases y nutrientes entre la madre y el feto.

La placenta humana se clasifica como discoidal, vellositaria y hemocorial con capilares continuos, siendo su unidad morfo-funcional las vellosidades coriónicas libres, en la cuales se ubica la barrera placentaria. Esta barrera, considerada tanto física como biológica<sup>26</sup>, se compone de trofoblasto, tejido conectivo fetal (estroma vellositario) y láminas basales. Estas últimas rodean el endotelio de los vasos fetales y separan el trofoblasto del tejido conectivo adyacente<sup>43,44</sup>.

El trofoblasto es un epitelio bi-estratificado, compuesto por citotrofoblasto (CT) y sincitiotrofoblasto (ST), que recubre las vellosidades placentarias y por lo tanto, el primer tejido y la primera barrera que está en contacto con el patógeno. El ST es una capa de células multinucleadas, parte del que forma una superficie de aproximadamente 12m<sup>2</sup> que está en contacto directo con la sangre materna presente en el espacio intervillositario<sup>12</sup>. La capa interna, el CT es una capa discontinua que presenta un decreciente número de células a medida que la gestación progresa. Además se acercan los capilares fetales, presentes en el estroma vellositario al trofoblasto, de tal manera que al final del embarazo la barrera placentaria está compuesta en la mayoría de su extensión, por ST, láminas basales y endotelio de los capilares fetales.

Como epitelio de revestimiento experimenta un proceso de recambio epitelial constante, en el cual se ven involucrado diferentes procesos celulares como proliferación, diferenciación y muerte celular. El recambio epitelial se considera parte de la respuesta inmune innata, ya que los agentes patógenos antes de ingresar a la célula deben adherirse a la superficie de éstas, y como estas células son continuamente eliminadas el patógeno adherido se elimina junto con ellas<sup>15</sup>. Múltiples patógenos, incluyendo parásitos, son capaces de atravesar la barrera placentaria e infectar tanto a la placenta como al feto. Entre los parásitos descritos se encuentran: *T. gondii*, *Trypanosoma cruzi* y *Plasmodium falciparum*, y ocasionalmente, *Trichomonas vaginalis*, *Trypanosoma brucei* y especies de *Leishmania*<sup>45,46,10</sup>, mientras que la transmisión de los helmintos ocurre raramente en humanos<sup>16</sup>. Es importante destacar que las tasas de infección de algunos de estos parásitos son relativamente bajas, lo que hace sospechar la existencia de mecanismos antiparasitarios placentarios<sup>16</sup>.

En el trofoblasto se ha descrito la expresión de los 10 tipos de TLRs presentes en humano, como también varios de sus co-receptores y proteínas accesorias<sup>37</sup>. Como fue descrito más arriba, la activación de los TLRs por patógenos lleva a la producción de citoquinas y factores antimicrobianos. Existe una expresión diferencial de TLRs dependiendo del tipo celular en la placenta como también de la edad gestacional<sup>30</sup>.

## **Modelos de estudio de trofoblasto**

Existen diversas aproximaciones experimentales para estudiar los mecanismos de infección transplacentaria, que van desde modelos celulares *in vitro* hasta estudios *in vivo*. A través de líneas celulares de trofoblasto, entre ellas las células BeWo, se obtiene información sobre procesos moleculares y celulares<sup>15</sup>. Otro modelo se basa en la utilización de cultivos primarios de células de los tejidos placentarios. Sin embargo, estos requieren preferentemente placentas del primer trimestre del embarazo y en Chile existen limitaciones legales para la obtención de estos órganos (Código Penal, "Crímenes y Delitos contra el orden Familiar y la Moralidad Pública"). Para obtener información sobre procesos tisulares, se requiere de modelos que permitan incorporar compartimientos tisulares adyacentes al trofoblasto, como el estroma vellositario, que como tejido conectivo presenta matriz extracelular y contiene los capilares fetales. Un buen modelo *ex vivo* es la utilización de explantes de vellosidades coriónica de placenta humanas (HPCVE), que se obtienen de placentas de término durante el alumbramiento. En este sistema, las células de los tejidos placentarios se encuentran en un estado más fisiológico al que sus homólogos aislados. Una ventaja de este modelo es que las células mantienen el contacto físico con la lámina basal, y continúan recibiendo señales de factores de crecimiento paracrinos desde el estroma vellositario subyacente<sup>47</sup>. El uso de HPCVE ha sido ampliamente utilizado y con la realización previa de estudios en el laboratorio, se logró establecer un protocolo para su utilización en condiciones óptimas y determinar la cantidad de parásitos a utilizar y los tiempos de cultivos para poder determinar distintas etapas de la invasión del patógeno.

Tanto HPCVE como líneas celulares de trofoblasto son capaces de responder ante la estimulación con agonistas específicos con secreción de distintos perfiles de citoquinas.

Considerando la poca información existente sobre la respuesta placentaria ante la infección con *T. gondii* así como los métodos de estudio disponibles, en la presente tesis se propuso estudiar la respuesta inmunológica placentaria mediada por la activación de TLRs en HPCVE así como en células BeWo.

## **HIPÓTESIS DE TRABAJO**

*T. gondii* induce aumento de la expresión proteica de TLR-2, 4 y 9 así como de citoquinas asociadas a la activación de estos receptores en células BeWo y HPCVE. La activación de los TLRs está relacionada con la infección del parásito.

## **OBJETIVOS DEL TRABAJO**

### **OBJETIVO GENERAL**

Estudiar el rol de los TLR-2, 4 y 9 y de las citoquinas asociadas en la respuesta inmune ante *T. gondii* de la placenta humana y su rol en la infección del parásito.

### **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

Determinar en células BeWo y HPCVE el efecto de la infección de *T. gondii* sobre:

1. Expresión proteica de TLR-2, 4 y 9
2. Expresión de las citoquinas IL-1 $\beta$ , IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, IFN- $\gamma$  y TNF- $\alpha$ .
3. Determinar el efecto de la inhibición de los TLR-2, 4 y 9 sobre la infección del parásito.

## MATERIAL Y MÉTODO

**Obtención de formas infectivas de *T. gondii*:** Taquizoitos de la cepa RH (tipo I) fueron obtenidos desde cultivos de células VERO (ATCC® CCL-81) infectadas con el parásito. Las células VERO fueron cultivadas en medio RPMI enriquecido con suero fetal de bovino (SFB) al 5% y antibióticos (penicilina-streptomicina) a 37°C en un ambiente húmedo con 5% de CO<sub>2</sub> por 96 horas, reemplazando el medio cada 24 horas. En semi-confluencia, las células VERO fueron incubadas con taquizoitos provenientes de un cultivo anterior, que invadieron a las células y se replicaron intracelularmente. Luego de 48-72 horas, los taquizoitos lisaron a las células hospederas y los detritus celulares fueron eliminados por centrifugación a baja velocidad (500 x g) y los parásitos se recuperaron desde el sobrenadante. El medio con los parásitos fue pasado por membrana de policarbonato de 3 µm (Isopore™ Membrane Filters, Merck Millipore®) para la eliminación de restos celulares y los taquizoitos fueron sedimentados a 5000 x g, re-suspendidos en medio libre de rojo fenol y cuantificados mediante conteo en una cámara de Neubauer<sup>48</sup>.

**Cultivo de células BeWo e infección con taquizoitos de *T. gondii*:** Células BeWo (ATCC® CCL-98) fueron cultivadas en medio DMEM-F12 enriquecido con SFB al 10%, L-glutamina y antibióticos (penicilina-estreptomicina) a 37°C en un ambiente húmedo con 5% de CO<sub>2</sub>. Para realizar los experimentos, las células fueron cosechadas por tripsinización, sedimentadas y suspendidas en medio de cultivo fresco. Luego, 1x10<sup>5</sup> ó 3 x10<sup>4</sup> células fueron sembradas, se les permitió adherirse al fondo de la placa durante tres horas para luego ser incubadas con los taquizoitos en la relación de 1:0,1 célula:parásito durante 2 horas y fueron procesadas para los experimentos correspondientes.

**Obtención de placentas:** Se obtuvieron placentas humanas de gestaciones a término (mayor a 37 semanas de gestación) a partir de partos por cesárea, para asegurar la asepsia y preservación de la muestra, de madres sanas y fetos con desarrollo normal, desde el Servicio de Obstetricia y Ginecología del Hospital San José, Servicio de Salud Metropolitano Norte. Los criterios de exclusión para la obtención de placentas fueron embarazos múltiples, cualquier patología materna, placentaria o fetal. El consentimiento informado para el uso experimental de la placenta fue firmado por cada paciente según las regulaciones del Comité de Ética Humana de la Facultad de Medicina, Universidad de Chile (Aprobación Nº 041-2011). Los órganos fueron recolectados en condiciones de esterilidad y se procesaron dentro de los primeros treinta minutos de ocurrido el alumbramiento. La cara materna y fetal placentaria fueron descartadas y se obtuvieron los HPCVE de 0,5 cm<sup>3</sup> a partir del centro de los cotiledones. Los HPCVE fueron lavados con PBS para la remoción de la sangre y posteriormente co-cultivados con los taquizoitos de la cepa RH de *T. gondii*<sup>49</sup>. Las madres fueron serológicamente negativas para toxoplasmosis (IgG e IgM).

**Infección ex vivo de vellosidades coriónicas con *T. gondii*:** Los HPCVE fueron co-cultivados en presencia o ausencia de taquizoitos de *T. gondii* en una concentración de  $10^5$  parásitos/ml durante 2 horas en medios de cultivo RPMI<sup>49</sup>.

**Estudio de la expresión de receptores tipo Toll ante la infección por *T. gondii* en células BeWo y HPCVE:** Los niveles de expresión de los TLR 2,4 y 9 fueron confirmados por Inmunohistoquímica, Inmunofluorescencia y western blotting de los cultivos celulares y explantes infectados según la metodología descrita anteriormente. Se utilizó como control positivo LPS (10 ng/ml) como ligando sintético. Se utilizaron anticuerpos monoclonales anti TLR-2, 4 ó 9 (ab9100, ab22048, ab12121, Abcam®) y anticuerpos secundarios específicos conjugado con peroxidasa: anti-conejo IgG-HRP (sc-2004, Santa Cruz Biotechnology®) y anti-ratón IgG-HRP (sc-2055, Santa Cruz Biotechnology®) .

**a) Inmunohistoquímica:** Los HPCVE fueron fijados en formaldehído al 4% en 0,1 M de PBS (pH 7.3) por 24 horas. Posteriormente fueron lavados durante 2 horas en agua corriente, se deshidrataron mediante inmersión en concentraciones crecientes de etanol (80%, 90%, 95%, 100%, 100%, 100%) por 10 minutos cada vez, se aclararon en xilol 100% 3 veces durante 15 minutos y se incluyeron en parafina fundida a 60°C. Se obtuvieron cortes de 5 µm de espesor que fueron colocados en portaobjetos silanizados con carga positiva (Superfrost plus, Thermo Scientific®). Posteriormente fueron desparafinados en xilol 100%, tres veces por 15 minutos, e hidratados en concentraciones decrecientes de etanol (100%, 100%, 100%, 95%, 80%, 70% y agua destilada) por 10 minutos cada vez. Se realizó recuperación antigénica mediante la incubación en tampón citrato de sodio (Antigen Unmasking Solution (ScyTek®, ACA)) a 100 °C durante 30 minutos en una vaporera Oster® (Modelo 5711-052, Oster®). La inmunodetección se realizó mediante el kit comercial R.T.U. Vectastain (Vector Laboratories®). Los cortes desparafinados fueron incubados con bloqueador de peroxidasas endógenas (ScyTek®, ACA) por 30 minutos y luego 3 lavados de 3 minutos con PBS para posteriormente bloquear con suero normal equino R.T.U al 2,5% v/v. La dilución de los anticuerpos, tiempo y temperatura óptima de incubación fueron determinados experimentalmente en el laboratorio. Las muestras fueron incubadas con los anticuerpos primarios anti-TLR-2, 4 ó 9 (ab9100, ab22048, ab12121, Abcam®), dilución 1:1000 v/v, durante toda la noche a 4°C. Posteriormente, las muestras fueron lavadas 3 veces con PBS por 3 minutos cada vez, e incubadas con un anticuerpo secundario biotinilado y conjugado con estreptavidina R.T.U. Vectastain (Vector Laboratories®) y el complejo antígeno-anticuerpo revelado con el cromógeno diamino benzidina (DAB) y el contraste nuclear se realizó con Hematoxilina de Mayer. Los controles negativos de la técnica inmunohistoquímica fueron realizados mediante la sustitución de los anticuerpos primarios con PBS. Los preparados se montaron en medio Entellan (Merck®) y se examinaron 90 campos al azar en los HPCVE

mediante microscopía de luz (Motic® BA310) y las imágenes se capturaron con un equipo de digitalización (Moticam® 5) acoplado al microscopio y procesadas utilizando el *software* Motic imagen plus 2.0. La inmunoreactividad fue determinada cualitativamente y considerados los siguientes parámetros: ausente (-), escasa (+/-), leve (+), moderada (++) y marcada (+++) <sup>50</sup>.

**b) Inmunofluorescencia:** Las células BeWo previamente cultivadas sobre cubreobjetos redondos de 12 mm de diámetro, fueron fijadas con metanol frío (-20°C) por 10 minutos, luego lavadas 3 veces con PBS por 3 minutos e incubadas durante 2 horas a 37°C con PBST-BSA 5% para evitar marcas inespecíficas. Posteriormente se lavó con PBST-0,05% (PBS, Tween-20) 3 veces por 3 minutos cada una, para luego incubar con el anticuerpo primario anti-TLR-2, 4 ó 9 (ab9100, ab22048, ab12121, Abcam®) a una concentración 1:1000 por 2 horas a 37°C. Posteriormente, se retiró el anticuerpo primario lavando con PBS 3 veces por 3 minutos cada uno. El complejo antígeno-anticuerpo fue detectado mediante el anticuerpo secundario anti-conejo IgG conjugado con FITC (115-545-003, Jackson ImmunoResearch®) y el anti-ratón IgG conjugado con Alexa Fluor (111-095-045, Jackson ImmunoResearch®) en concentraciones 1:100 por 1 hora a temperatura ambiente. Posteriormente las células fueron lavadas 3 veces con PBS y teñidas con el colorante nuclear DAPI (4',6- diamidino-2-fenilindol dicloridrato, Molecular Probes®), a una concentración de 1:1000 e incubado a temperatura ambiente por 5 minutos, seguido de 3 lavados con PBS por 5 minutos. Luego se le agregó una gota de medio de montaje Prolong Diamod (Life Technologies®) dejando durante 24 horas protegido de la luz y a temperatura ambiente. Las muestras fueron observadas en un microscopio de epifluorescencia (Motic® BA310). Las imágenes fueron capturadas, en diferentes campos al azar, con la cámara acoplada al microscopio (Moticam® 5) y procesadas utilizando el *software* Motic imagen plus 2.0. La inmunoreactividad fue analizada como de la manera descrita más arriba.

**c) Western blot:** Las HPCVE fueron homogeneizadas con 0,6 ml de buffer de lisis (Tris 10 mM pH 8,0; dodecil sulfato de sodio (SDS) 1% p/v) en presencia de una mezcla de inhibidores de proteasas (Complete Mini (Roche®)) con un homogeneizador Potter-Elvehjem a 4 °C. Las células BeWo fueron lisadas con buffer RIPA (Radio inmunoprecipitation Assay Buffer, 25 mM TRIS HCl pH 7,6, 150 mM NaCl, 1% deoxicolato de sodio, 0.1% SDS, inhibidores de proteasas Complete Mini (Roche®)) y sonicadas por 1 minuto seguidas por incubación en hielo con agitación continua por 20 minutos. Tanto los HPCVE como las células BeWo lisadas fueron centrifugadas a 15.000 g por 20 minutos, para remoción de restos celulares. La concentración de proteínas fue determinada mediante el kit BCA Protein Assay (Pierce®), con albúmina de suero bovino como estándar. Se utilizaron 75 µg de proteínas para la detección de TLR-2 y TLR-4 y 50 µg para la detección de TLR-9. Los sobrenadantes de los homogeneizados fueron

diluidos en un buffer de carga denaturante (glicerol 10%, SDS, 4,5%,  $\beta$ -mercaptoetanol 5%, 62,5 mM Tris-HCl (pH 6,8) 1,5 mM EDTA y 0,1% azul de bromofenol) y sometidos a un baño de agua a 100°C durante 10 minutos. Para la electroforesis se prepararon geles de poliacrilamida al 7,5% de 1,5 mm de grosor en presencia de SDS (SDS-PAGE). Como gel separador se utilizó una solución de acrilamida-bisacrilamida al 30% p/v, agua desionizada, solución tampón Tris-HCl (pH 8,8), persulfato de amonio (PSA) al 10% p/v y N,N,N',N'-Tetrametiletilendiamina (TEMED) 0,065% v/v. Una vez polimerizado este, a temperatura ambiente, se preparó sobre él, el gel concentrador al 4%, utilizando los mismos reactivos anteriormente mencionados, pero a pH 6,8. La electroforesis se realizó en una cámara Bio-Rad a 100 V, a temperatura ambiente.

Las proteínas separadas mediante la electroforesis fueron transferidas a una membrana de fluoruro de polivinilideno (PVDF, Milipore Corp.®) en un sistema húmedo estándar durante 120 min a 100 V, a 4°C (Bio-Rad®). Luego, las membranas fueron bloqueadas durante dos horas a temperatura ambiente con leche descremada al 5% en PBST-0,05% y posteriormente incubadas con los anticuerpos anti TLR-2, 4 ó 9 (ab9100, ab22048, ab12121, Abcam®) a 4°C durante toda la noche. Al día siguiente las membranas fueron lavadas con PBST-0,05%, 3 veces durante 10 minutos cada vez, para posteriormente ser incubadas con el anticuerpo secundario conjugado con la peroxidasa durante 90 minutos. Las proteínas inmunoreactivas fueron detectadas mediante quimioluminiscencia (Western Blotting Luminol Reagent, Santa Cruz Technologies®, sc-2048) según las instrucciones del fabricante. Posteriormente las membranas se incubaron en una solución de "stripping" (62.5 mM Tris-HCl, pH 6.8, 2% SDS y 50 mM  $\beta$ -mercaptoetanol) a 50°C durante 30 minutos. Después las membranas fueron lavadas 3 veces durante 10 minutos en PBST-0,05%, bloqueadas en PBST-leche 5%, incubadas con el anticuerpo primario contra la proteína Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH, sc-51905, Santa Cruz Biotechnology®) durante toda la noche a 4°C como control de carga. El tratamiento para la detección de GAPDH fue el mismo que el descrito anteriormente.

Las películas fueron digitalizadas en un sistema automático de barrido y se utilizó el programa ImageJ v1.34 (National Institute of Health, Bethesda, Maryland, EE.UU) para el análisis densitométrico de las bandas. Los resultados se expresaron como la razón del TLR estudiado versus GAPDH y fueron normalizados respecto a los controles.

**Análisis patrones de secreción de citoquinas por células del trofoblasto:** Los niveles de secreción de citoquinas liberadas al sobrenadante como consecuencia de la activación de los TLR (IL-1 $\beta$ , IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ ) fueron analizadas por método ELISA con los siguientes kits comerciales: KAC1191, KHC0041, KHC0062, KHC0081, KHC0101, KAC1201,

KAC1231 (LifeTechnologies®) siguiendo las indicaciones del fabricante.

**Inhibición activación TLR:** Para la inhibición de la activación de los TLR las muestras de HPCVE y células BeWo fueron incubados con anticuerpos específicos neutralizantes para TLR-2 (Pab-hTLR2; Invivogen®) y TLR-4 (PAb-hTLR4 Invivogen®). TLR-9 fue inhibido utilizando oligonucleótidos supresivos mediante CpGs inhibitorios (ODN TTAGGG, Invivogen®).

La dilución de los anticuerpos, tiempo y temperatura óptima de incubación fueron estandarizados en el laboratorio. Se utilizaron concentraciones de 5µg/ml de PAbh-TLR2, 1µg/ml de PAb-hTLR4 y 5 µg/ml de ODN TTAGGG. Las muestras fueron incubadas durante 30 minutos en RPMI suplementado con SFB al 10% para los HPVCE o 30 minutos en DMEM-F12 con SFB al 10% para el cultivo de células BeWo ya adherido al fondo de la placa. Posteriormente se les retiró el medio con los inhibidores para proseguir con el protocolo de infección tanto de los HPVCE como de las células BeWo.

**Efecto Inhibición TLR sobre Infectividad:** La infección por *T. gondii* en células BeWo como en HPCVE fue determinada mediante la cuantificación de DNA parasitario intracelular o intratisular. Las muestras fueron lavadas al menos 5 veces en PBS estéril para luego ser procesadas mediante el Kit Wizard Genomic DNA Purification kit (Promega®), siguiendo las instrucciones del fabricante, y la cuantificación del DNA se realizó mediante el sistema de cuantificación de µDrop Plate en Varioskan Flash Multimode Reader (Thermo Scientific®) y se analizaron los niveles relativos de DNA parasitario mediante qPCR de doble control<sup>51</sup>. Para la detección de *T. gondii* se amplificó una secuencia de 98 pb de DNA correspondiente al gen B1 del parásito mediante el uso de los siguientes partidores<sup>52</sup>:

TOXO-F: 5´-AGCGTTCGTCCTCAACTATCGATTG-3´ y

TOXO-R: 5´-TCCCCTCTGCTCGCGAAAAGT-3

Además de un segmento de 100 pb de la GAPDH humana como housekeeping

hGDH-F: 5´-TGATGCGTGTACAAGCGTTTT-3 y

hGDH-R: 5´-ACATGGTATTCACCACCCCACTAT-3

Para un volumen total de 25 µL se mezclaron 5 µl de DNA genómico en una concentración de 1 ng/µl , 12,5 µl de SensiMix SYBR® Hi-ROX Kit, (Bioline®) 0,5 µl de cada uno de los partidores a 10 nanomoles y 6,5 µl de H<sub>2</sub>O libre de DNAsas.

Se utilizó el termociclador 7300 Real-Time PCR System (Applied Biosystems®) con los siguientes ciclos termales:

- 1º paso: 50°C por 2 minutos
- 2º paso: 95°C por 10 minutos
- 3º paso: 40 ciclos de:
  - o 90°C por 15 segundos
  - o 60°C por 15 segundos
  - o 72°C por 30 segundos

Seguido por un ciclo de disociación y la recolección de los datos se realizó en la tercera etapa del tercer paso. El análisis de los datos se realizó con 7300 System SDS RQ Study Software (Applied Biosystems®). La cuantificación relativa fue expresada como valor RQ mediante el método de control comparativo ( $\Delta\Delta Ct$ )<sup>51</sup>.

**Análisis estadístico:** Cada experimento fue realizado en triplicado y al menos en tres oportunidades distintas. Los resultados se expresaron como promedio más desviación estándar. La significancia de las variables cuantitativas se evaluó mediante ANDEVA seguido de Dunnett´s post test. Se consideró un  $p \leq 0.05$  como estadísticamente significativo.

## RESULTADOS

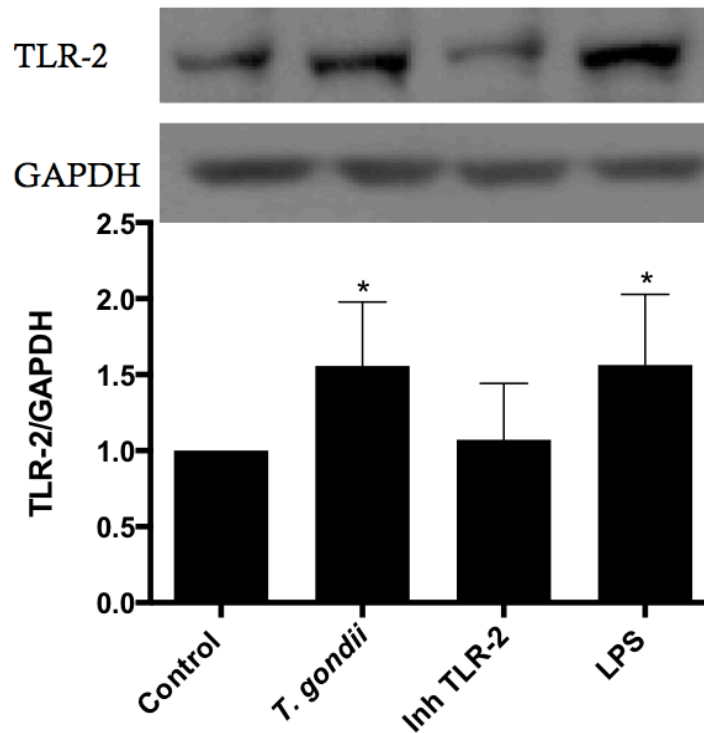
### **1. *T. gondii* induce un incremento en la expresión proteica de TLR-2, TLR-4 y TLR-9 en HPCVE y células BeWo.**

HPCVE fueron incubados en presencia o ausencia de taquizoitos de *T. gondii* (cepa RH) en concentración de  $10^5$  parásitos/ml, en presencia o ausencia de LPS u ODN (control positivo) así como en presencia o ausencia de los respectivos inhibidores específicos, durante dos horas. El parásito aumenta en un  $56\% \pm 4.2\%$  ( $p \leq 0.05$ ) los niveles de expresión de TLR-2 (Fig. 1), en un  $31\% \pm 2.0\%$  ( $p \leq 0.05$ ) los niveles de expresión de TLR-4 (Fig. 2) y en un  $33\% \pm 1.3\%$  (no estadísticamente significativo  $p=0.18$ ) los niveles de expresión de TLR-9 (Fig. 3). Asimismo el aumento de la expresión de los TLRs inducido por el parásito es prevenido ó incluso disminuido por los inhibidores específicos. Así la expresión de TLR-2 y TLR-9 en presencia del parásito y del anticuerpo neutralizante u oligonucleótidos supresivos es similar al nivel control (Fig. 1 y Fig. 3). Por otra parte, la expresión de TLR-4 en estas mismas condiciones disminuye en un  $73\% \pm 1.7\%$  ( $p \leq 0.0001$ ).

El aumento de la expresión de los TLRs fue comprobado mediante inmunohistoquímica en los HPCVE (Fig 4). Así, la inmunoreactividad (flechas) de los distintos de TLRs en presencia de *T. gondii* (+++) y LPS (+++) aumenta respecto a la inmunorreactividad observada en los controles (+) (Fig 4). Interesantemente, el aumento de la expresión de los TLRs es más marcada a nivel de trofoblasto (punta de flechas) que en el estroma vellositario.

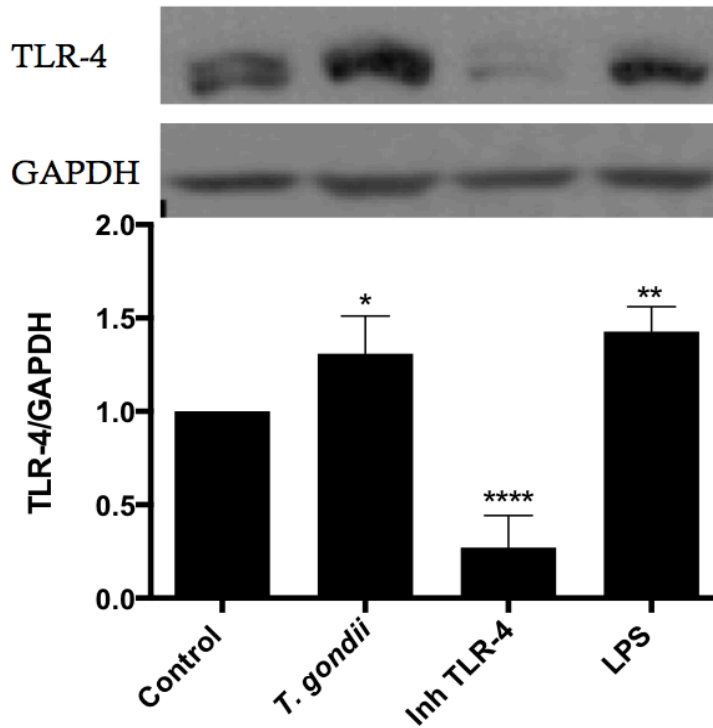
La expresión de los TLRs fue analizada por inmunofluorescencia en las células BeWo. Se observa un franco aumento (+++) de la inmunorreactividad de TLR-2 (Fig. 5), TLR-4 (Fig. 6) y TLR-9 (Fig. 7) respecto a los controles (-/+) en células incubadas con el parásito.

**Fig. 1**



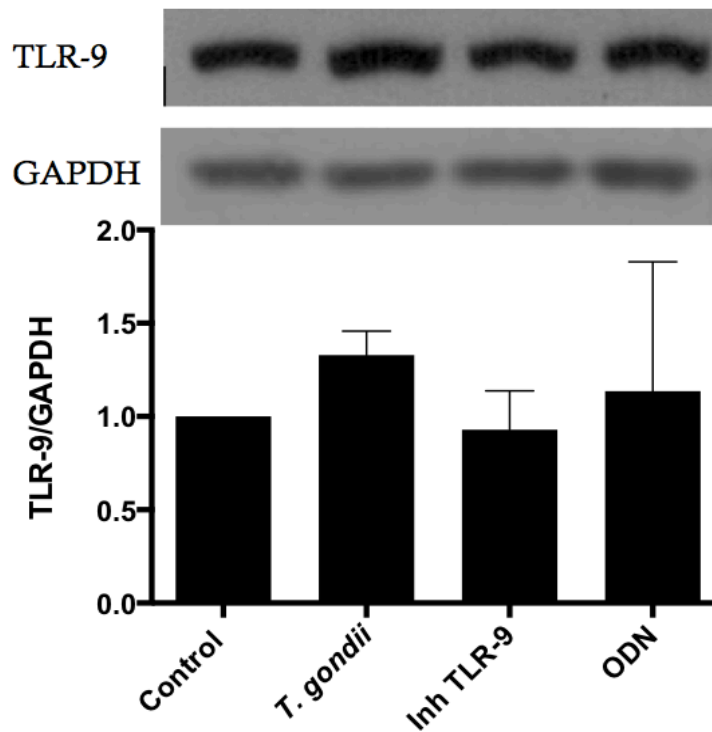
***T. gondii* induce un incremento en la expresión proteica de TLR-2 en HPCVE.** HPCVE fueron co-cultivados con taquizoitos de *T. gondii* (cepa RH) en concentración de  $10^5$  parásitos/ml, así como en presencia o ausencia del anticuerpo específico neutralizante para TLR-2 (PAb-hTLR2; Invivogen®) (5 $\mu$ g/ml), ó de LPS (10 ng/ml) durante 2 horas. La expresión de TLR-2 aumenta significativamente en presencia de *T. gondii* ( $p \leq 0.05$ ). El inhibidor no altera la expresión de TLR-2. Los niveles de expresión proteica de TLR-2 fueron obtenidas mediante análisis densitométrico de las bandas observadas en los western blots, de los cuales se muestra uno representativo. Las columnas corresponden a los promedios, con su desviación estándar, de la razón TLR-2/GAPDH. Todos los valores fueron normalizados respecto a sus controles. Se utilizó el test estadístico ANDEVA seguido por "Dunnett´s post-test". \* $p \leq 0.05$ .

**Fig. 2**



***T. gondii* induce un incremento en la expresión proteica de TLR-4 en HPCVE.** HPCVE fueron co-cultivados con taquizoitos de *T. gondii* (cepa RH) en concentración de  $10^5$  parásitos/ml, así como en presencia o ausencia del anticuerpo específico neutralizante para TLR-4 (PAb-hTLR4; Invivogen®) (1 $\mu$ g/ml), ó de LPS (10 ng/ml) durante 2 horas. La expresión de TLR-4 aumenta significativamente en presencia de *T. gondii* ( $p \leq 0.05$ ). El inhibidor disminuyó la expresión proteica de TLR-4 en presencia de *T. gondii*. Los niveles de expresión proteica de TLR-4 fueron obtenidas mediante análisis densitométrico de las bandas observadas en los Western blots, de los cuales se muestra uno representativo. Las columnas corresponden a los promedios con su desviación estándar, de la razón TLR-4/GAPDH. Todos los valores fueron normalizados respecto a sus controles. Se utilizó el test estadístico ANDEVA seguido por "Dunnett's post-test". \* $p \leq 0.05$  ; \*\* $p \leq 0.01$  ; \*\*\*\* $p \leq 0.0001$

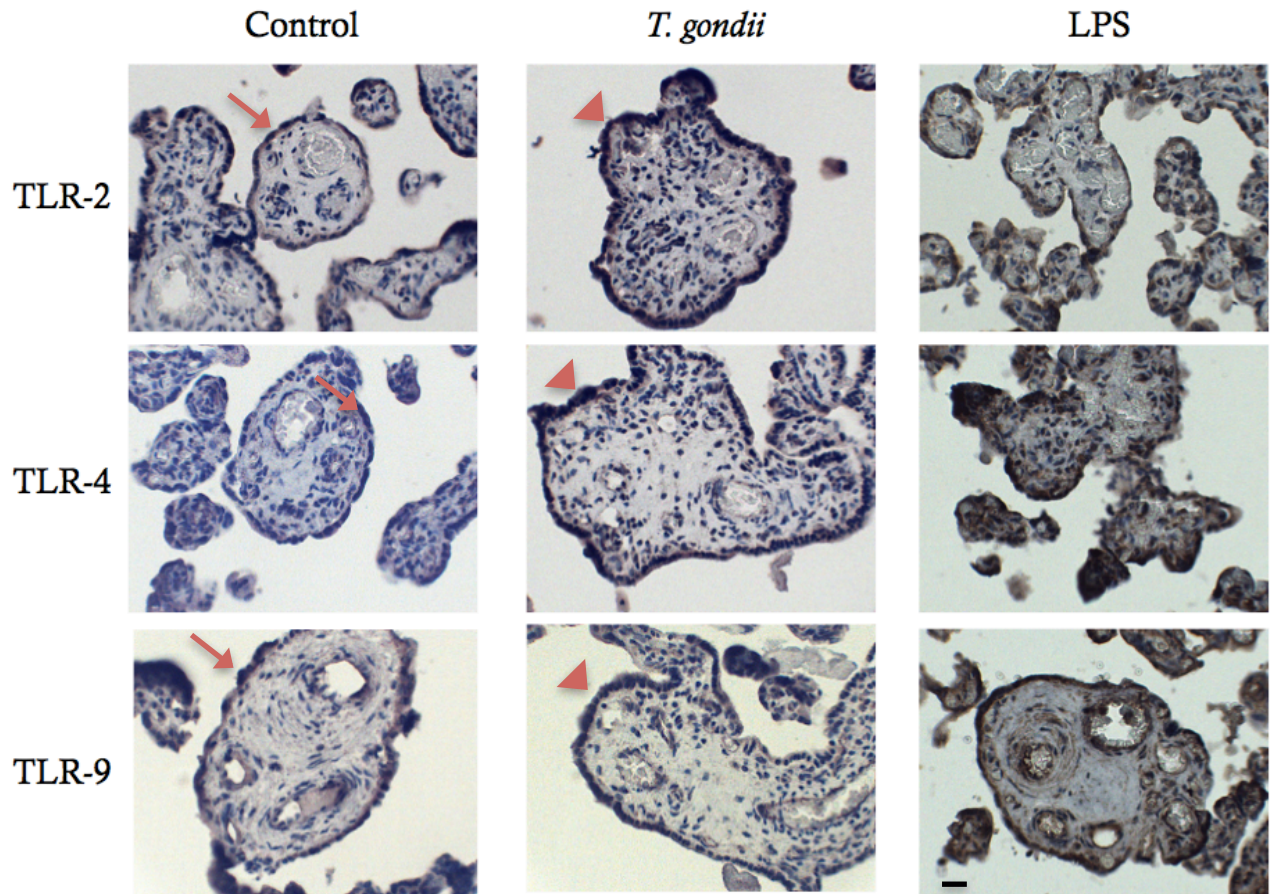
**Fig. 3**



***T. gondii* tiende a inducir un incremento de la expresión proteica de TLR-9 en HPCVE.**

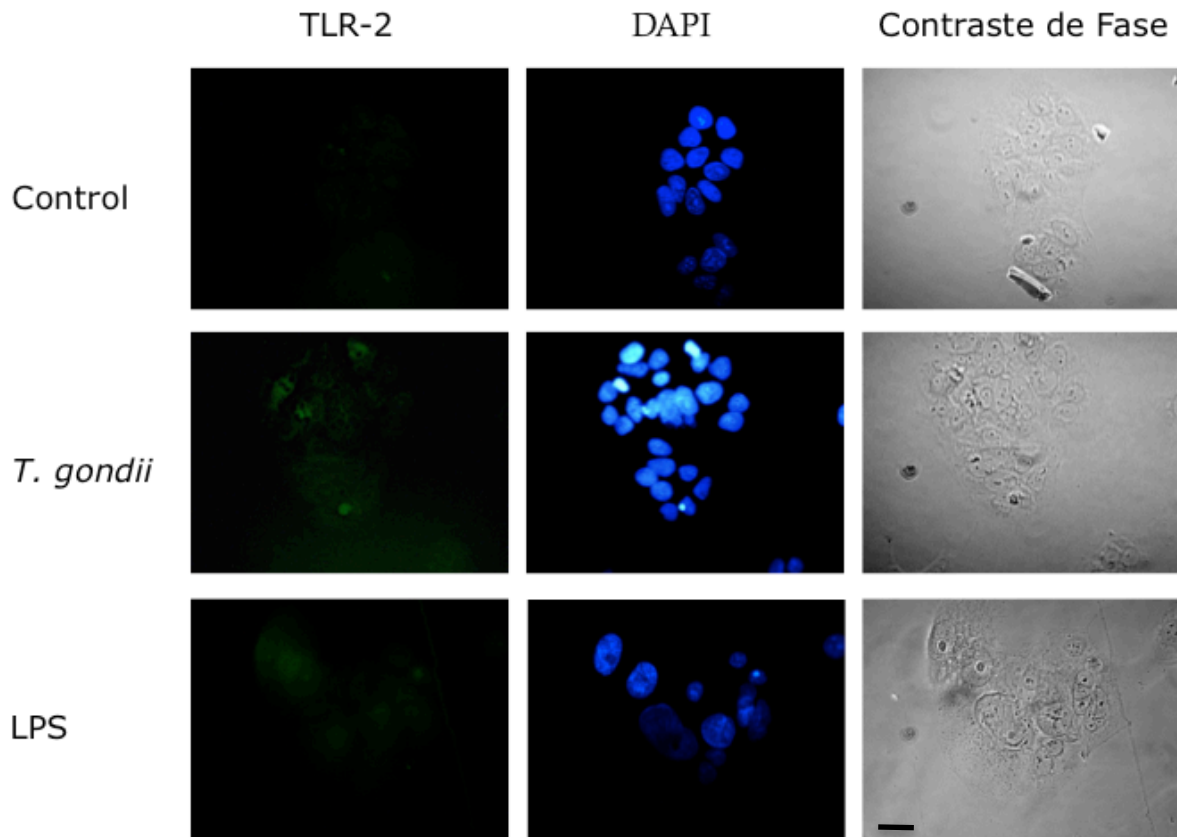
HPCVE fueron co-cultivados con taquizoitos de *T. gondii* (cepa RH) en concentración de  $10^5$  parásitos/ml, así como en presencia o ausencia del oligonucleótido supresivo (ODN TTAGGG, Invivogen®) ( $5\mu\text{g/ml}$ ), ó de ODN ( $10\text{ ng/ml}$ ) durante 2 horas. La expresión proteica de TLR-9 aumenta no significativamente en presencia de *T. gondii* ( $p\ 0.18$ ). El inhibidor no altera la expresión de TLR-9. Los niveles de expresión proteica de TLR-9 fueron obtenidas mediante análisis densitométrico de las bandas observadas en los Western blots, de los cuales se muestra uno representativo. Las columnas corresponden a los promedios con su desviación estándar, de la razón TLR-9/GAPDH. Todos los valores fueron normalizados respecto a sus controles. Se utilizó el test estadístico ANDEVA seguido por "Dunnett´s post-test".

**Fig. 4**



***T. gondii* induce un aumento de la inmunorreactividad de TLR-2, TLR-4 y TLR-9 en HPCVE.** Los HPCVE fueron incubados en presencia o ausencia de  $10^5$  taquizoitos/ml y en presencia o ausencia de LPS (10 ng/ml) como control positivo durante dos horas a 37°C. Se observa un aumento de la inmuno-reactividad de los TLRs (flechas) que es más marcada a nivel del trofoblasto (punta de flechas). Las muestras fueron procesadas para inmunohistoquímica de rutina, el complejo Antígeno-anticuerpo fue revelado con DAB. Barra: 25µm.

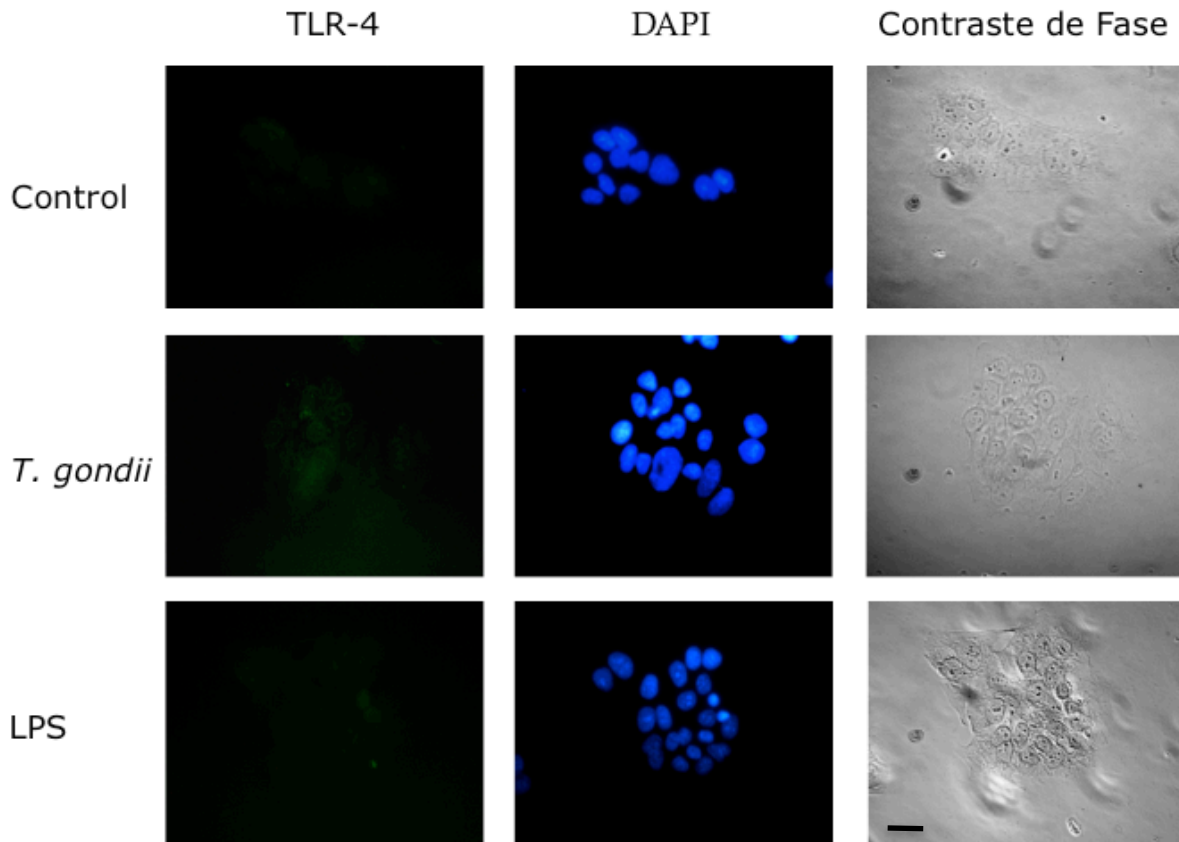
**Fig. 5**



***T. gondii* induce un aumento de la inmunofluorescencia de TLR-2 en células BeWo.**

$3 \times 10^4$  células BeWo fueron sembradas y luego incubadas en presencia o ausencia de taquizoitos de *T. gondii* (cepa RH) en una relación célula:parásito 1:0,1 y en presencia o ausencia de LPS. Ante la presencia de *T. gondii* se observa un aumento franco de la inmunofluorescencia. Las muestras fueron procesadas dos horas post-infección para inmunofluorescencia convencional. Barra de aumento 10  $\mu\text{m}$ .

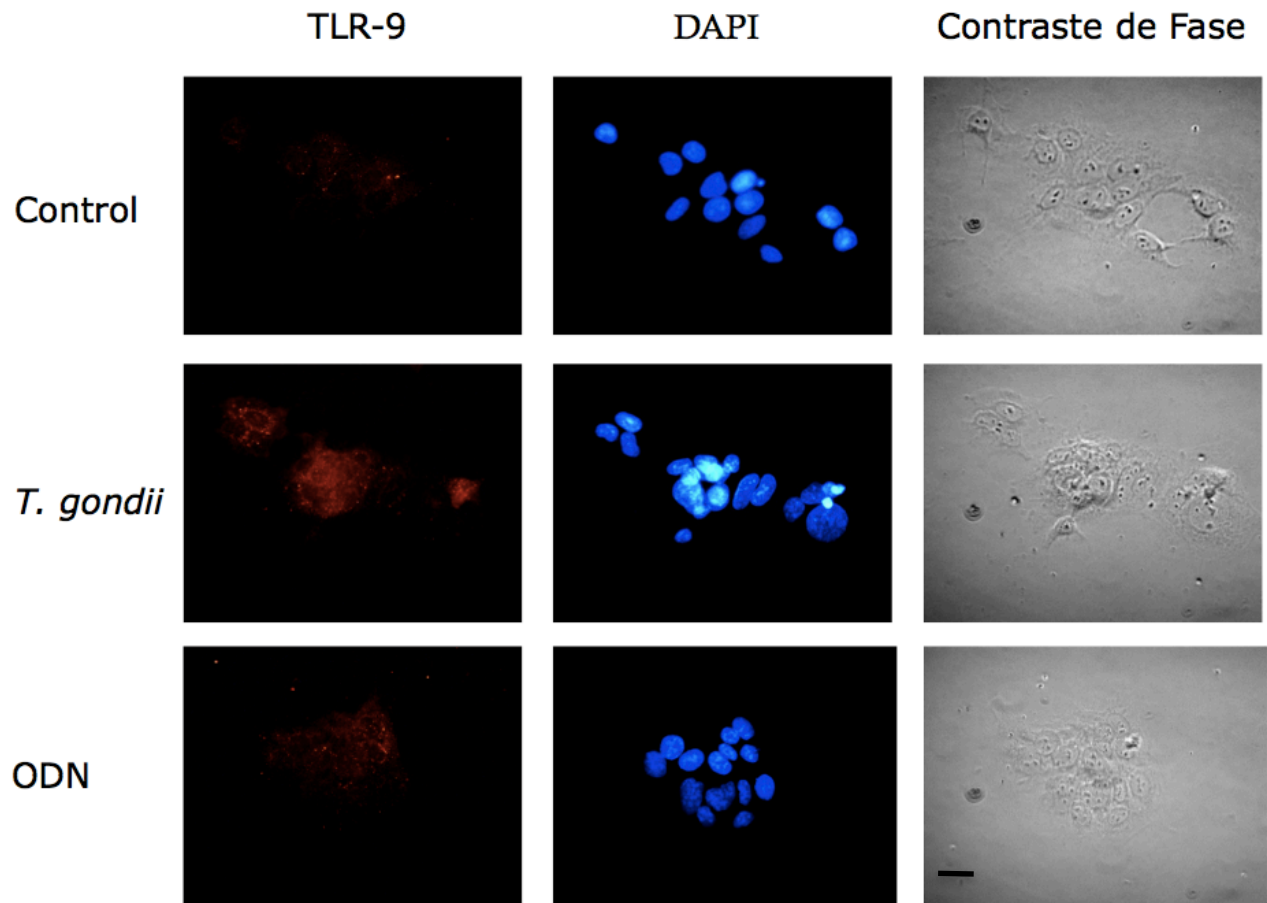
**Fig. 6**



***T. gondii* induce un aumento de la inmunofluorescencia de TLR-4 en células BeWo.**

$3 \times 10^4$  células BeWo fueron sembradas y luego incubadas en presencia o ausencia de taquizoitos de *T. gondii* (cepa RH) en una relación célula:parásito 1:0,1 y en presencia o ausencia de LPS. Ante la presencia de *T. gondii* se observa un leve aumento de la inmunofluorescencia. Las muestras fueron procesadas dos horas post-infección para inmunofluorescencia convencional. Barra de aumento 10  $\mu\text{m}$ .

**Fig. 7**



***T. gondii* induce un aumento de la inmunofluorescencia de TLR-9 en células BeWo.**

3 x10<sup>4</sup> células BeWo fueron sembradas y luego incubadas en presencia o ausencia de taquizoitos de *T. gondii* (cepa RH) en una relación célula:parásito 1:0,1 y en presencia o ausencia de ODN. Ante la presencia de *T. gondii* se observa un aumento moderado de la inmunofluorescencia. Las muestras fueron procesadas dos horas post-infección para inmunofluorescencia convencional. Barra de aumento 10 µm.

## **2.- *T. gondii* modula la secreción de citoquinas pro-inflamatorias, anti-inflamatorias y quimioquinas en HPCVE.**

### ***T. gondii* modula la secreción de citoquinas pro-inflamatorias en HPCVE.**

HPCVE fueron incubados en presencia o ausencia de taquizoitos de *T. gondii* (cepa RH) en concentración de  $10^5$  parásitos/ml, en presencia o ausencia de LPS u ODN (control positivo) así como en presencia o ausencia de los respectivos inhibidores específicos, durante dos horas. Los niveles de secreción de las diferentes citoquinas fue determinado mediante test de ELISA.

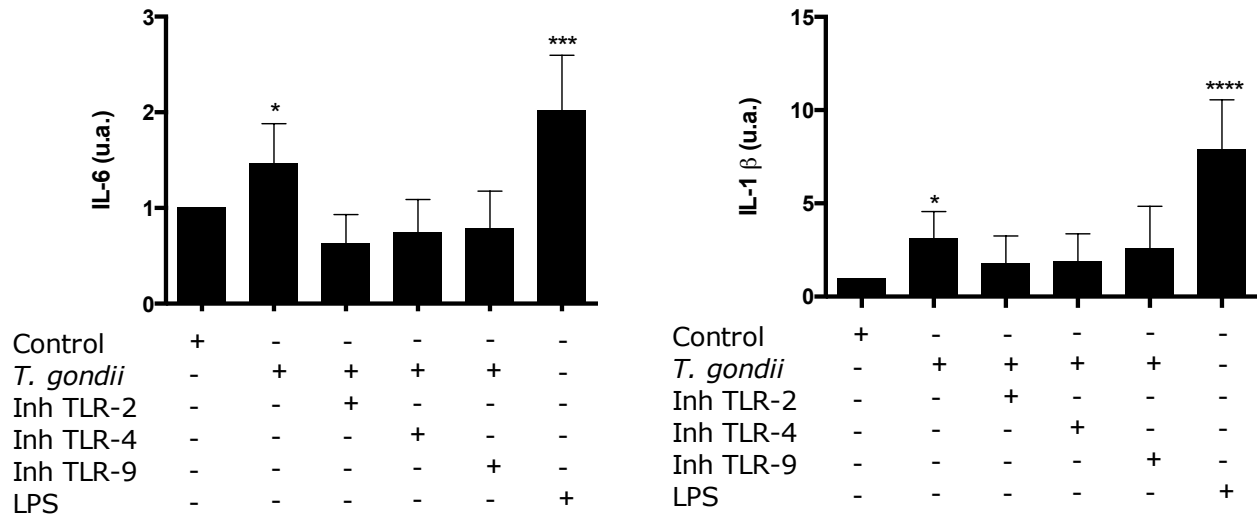
El parásito aumenta en un  $47\% \pm 4.1\%$  ( $p \leq 0.05$ ) los niveles de secreción de IL-6 (Fig. 8, panel izquierdo), en un  $212\% \pm 14.4\%$  ( $p \leq 0.05$ ) los niveles de secreción de IL-1 $\beta$  (Fig. 8, panel derecho), en un  $499\% \pm 12.6\%$  ( $p \leq 0.05$ ) los niveles de secreción de TNF- $\alpha$  (Fig. 9). Por otra parte, la secreción de IFN- $\gamma$  disminuyó en un  $18\% \pm 0.6\%$  ( $p 0.95$ ) (Fig. 10); sin embargo esta disminución no fue estadísticamente significativa.

Ante la presencia de los inhibidores para TLR-2, TLR-4 y TLR-9, la secreción de IL-6 e IL-1 $\beta$  fue similar a la secreción observada en los controles sin parásito (Fig. 8).

TNF- $\alpha$  paradójamente presentó un aumento en su secreción en presencia del parásito y frente a los inhibidores en un  $640\% \pm 16.8\%$  ( $p \leq 0.01$ ),  $570\% \pm 52.3\%$  ( $p \leq 0.01$ ),  $1600\% \pm 25\%$  ( $p \leq 0.001$ ) en presencia de los inhibidores para TLR-2, TLR-4 y TLR-9, respectivamente. (Fig. 9)

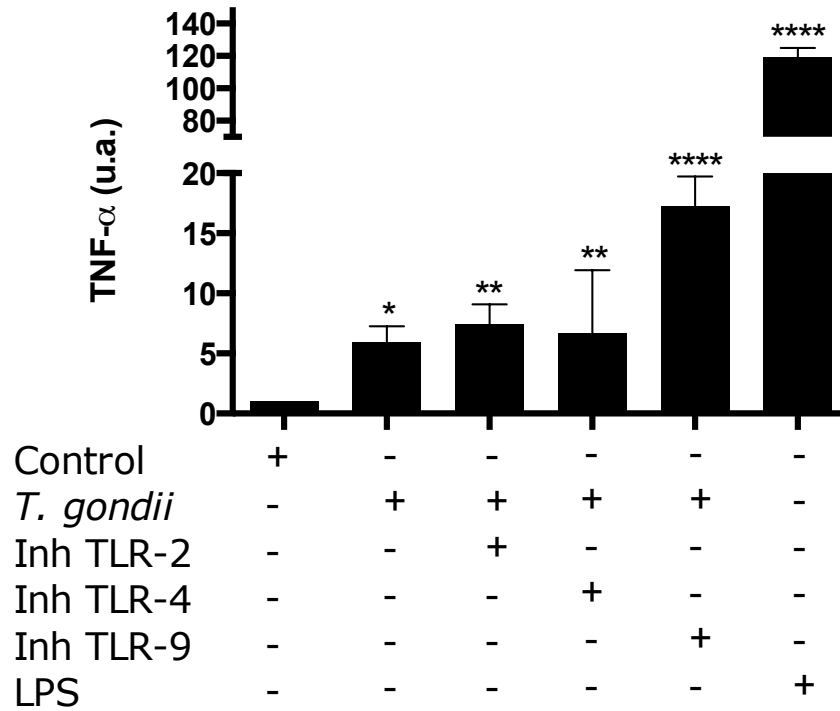
Interesantemente, la presencia de *T. gondii* sólo o con la presencia de los inhibidores, no altera la secreción de IFN- $\gamma$ . (Fig. 10)

**Fig. 8**



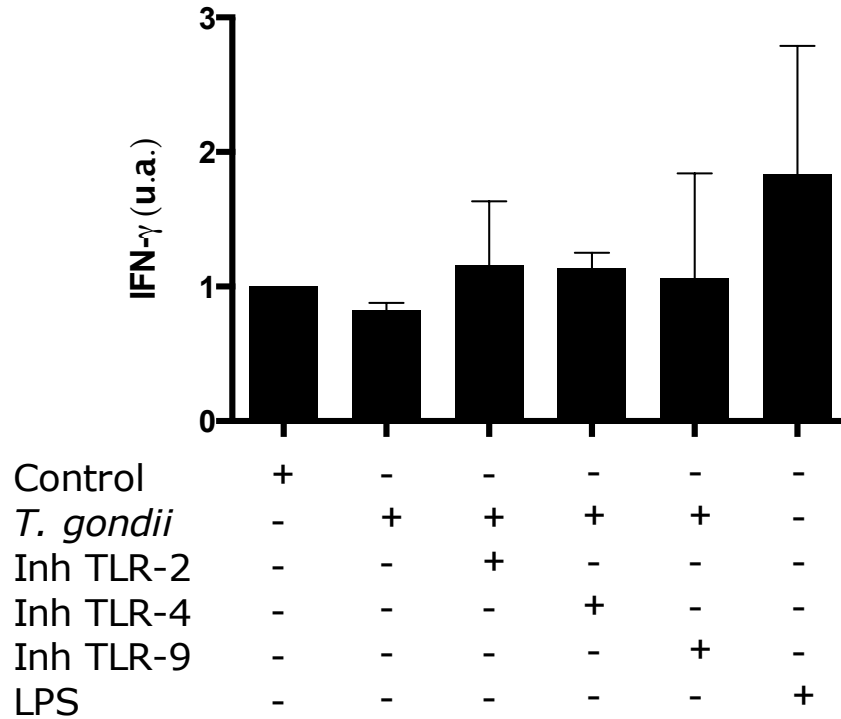
***T. gondii* incrementa significativamente la secreción de Interleuquina 6 e Interleuquina 1β en HPCVE.** HPCVE fueron co-cultivados durante dos horas con taquizoitos de *T. gondii* (cepa RH) en concentración de  $10^5$  parásitos/ml ó LPS (10 ng/ml) (control positivo), así como en presencia o ausencia de los anticuerpos específicos neutralizantes para TLR-2 (Pab-hTLR2; Invivogen®) (5µg/ml) y TLR-4 (PAb-hTLR4 Invivogen®) (1µg/ml). TLR-9 fue inhibido utilizando oligonucleótidos supresivos mediante CpGs inhibitorios (ODN TTAGGG, Invivogen®) (5µg/ml). Los niveles de la IL-6 e IL-1β fueron determinados en el sobrenadante mediante test de ELISA. Las columnas corresponden a los promedios con su desviación estándar. Todos los valores fueron normalizados respecto a sus controles. Se utilizó el test estadístico ANDEVA seguido por "Dunnett´s post-test". \* $p \leq 0.05$  ; \*\* $p \leq 0.01$  ; \*\*\* $p \leq 0.001$  ; \*\*\*\* $p \leq 0.0001$

**Fig. 9**



***T. gondii* incrementa significativamente la secreción de TNF- $\alpha$  en HPCVE.** HPCVE fueron co-cultivados durante dos horas con taquizoitos de *T. gondii* (cepa RH) en concentración de  $10^5$  parásitos/ml ó LPS (10 ng/ml) (control positivo), así como en presencia o ausencia de los anticuerpos específicos neutralizantes para TLR-2 (Pab-hTLR2; Invivogen®) (5 $\mu$ g/ml) y TLR-4 (PAb-hTLR4 Invivogen®) (1 $\mu$ g/ml). TLR-9 fue inhibido utilizando oligonucleótidos supresivos mediante CpGs inhibitorios (ODN TTAGGG, Invivogen®) (5 $\mu$ g/ml). Los niveles de TNF- $\alpha$  fueron determinados en el sobrenadante mediante test de ELISA. Frente a los diferentes inhibidores, aumenta significativamente la secreción de TNF- $\alpha$ . Las columnas corresponden a los promedios, con su desviación estándar, todos los valores fueron normalizados respecto al control. Se utilizó el test estadístico ANDEVA seguido por "Dunnett´s post-test". \* $p \leq 0.05$  ; \*\* $p \leq 0.01$  ; \*\*\* $p \leq 0.001$  ; \*\*\*\* $p \leq 0.0001$

**Fig. 10**



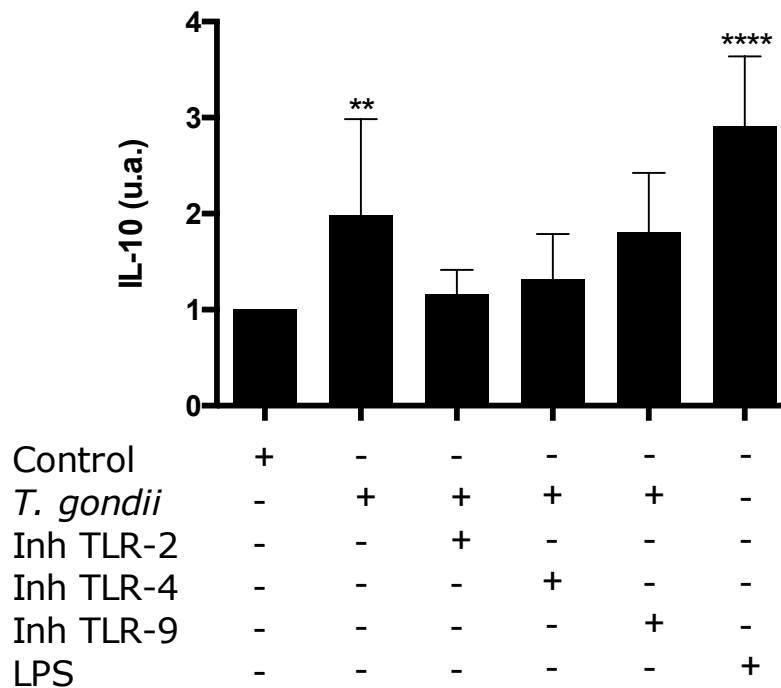
***T. gondii* no altera la secreción de IFN- $\gamma$  en HPCVE.** HPCVE fueron co-cultivados durante dos horas con taquizoitos de *T. gondii* (cepa RH) en concentración de  $10^5$  parásitos/ml ó LPS (10 ng/ml) (control positivo), así como en presencia o ausencia de los anticuerpos específicos neutralizantes para TLR-2 (Pab-hTLR2; Invivogen®) (5 $\mu$ g/ml) y TLR-4 (PAb-hTLR4 Invivogen®) (1 $\mu$ g/ml). TLR-9 fue inhibido utilizando oligonucleótidos supresivos mediante CpGs inhibitorios (ODN TTAGGG, Invivogen®) (5 $\mu$ g/ml). Los niveles de IFN- $\gamma$  fueron determinados en el sobrenadante mediante test de ELISA. Las columnas corresponden a los promedios con su desviación estándar, todos los valores fueron normalizados respecto al control. Se utilizó el test estadístico ANDEVA seguido por "Dunnett´s post-test".

### ***T. gondii* modula la secreción de citoquina anti-inflamatorias en HPCVE**

HPCVE fueron incubados en presencia o ausencia de taquizoitos de *T. gondii* (cepa RH) en concentración de  $10^5$  parásitos/ml, en presencia o ausencia de LPS (control positivo) así como en presencia o ausencia de los respectivos inhibidores específicos, durante dos horas. Los niveles de secreción de las diferentes citoquinas fue determinado mediante ELISA.

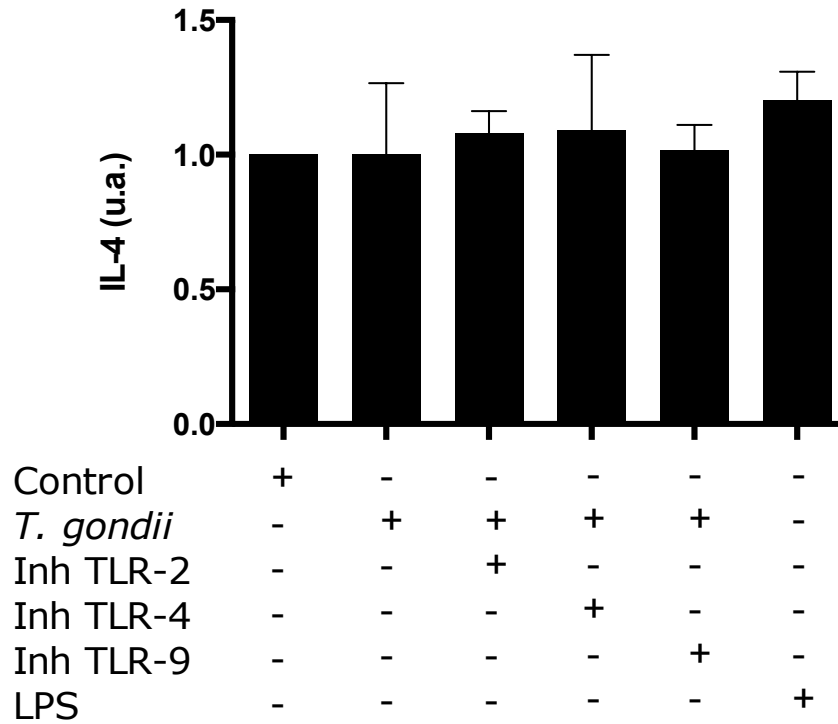
El parásito aumenta en un  $99\% \pm 9.9\%$  ( $p \leq 0.01$ ) los niveles de secreción de IL-10 (Fig. 11), pero no modifica la secreción de IL-4 (Fig. 12). En presencia de los inhibidores, los niveles de secreción de las citoquinas estudiadas, fueron similares a los controles sin tratar (Fig. 11 y 12).

**Fig. 11**



***T. gondii* incrementa significativamente la secreción de IL-10 en HPCVE.** HPCVE fueron co-cultivados durante dos horas con taquizoitos de *T. gondii* (cepa RH) en concentración de  $10^5$  parásitos/ml ó LPS (10 ng/ml) (control positivo), así como en presencia o ausencia de los anticuerpos específicos neutralizantes para TLR-2 (Pab-hTLR2; Invivogen®) (5µg/ml) y TLR-4 (PAb-hTLR4 Invivogen®) (1µg/ml). TLR-9 fue inhibido utilizando oligonucleótidos supresivos mediante CpGs inhibitorios (ODN TTAGGG, Invivogen®) (5µg/ml). Los niveles de IL-10 fueron determinados en el sobrenadante mediante test de ELISA. Las columnas corresponden a los promedios, con su desviación estándar. Todos los valores fueron normalizados respecto al control. Se utilizó el test estadístico ANDEVA seguido por "Dunnett´s post-test".  $**p \leq 0.01$  ;  $****p \leq 0.0001$

**Fig. 12**



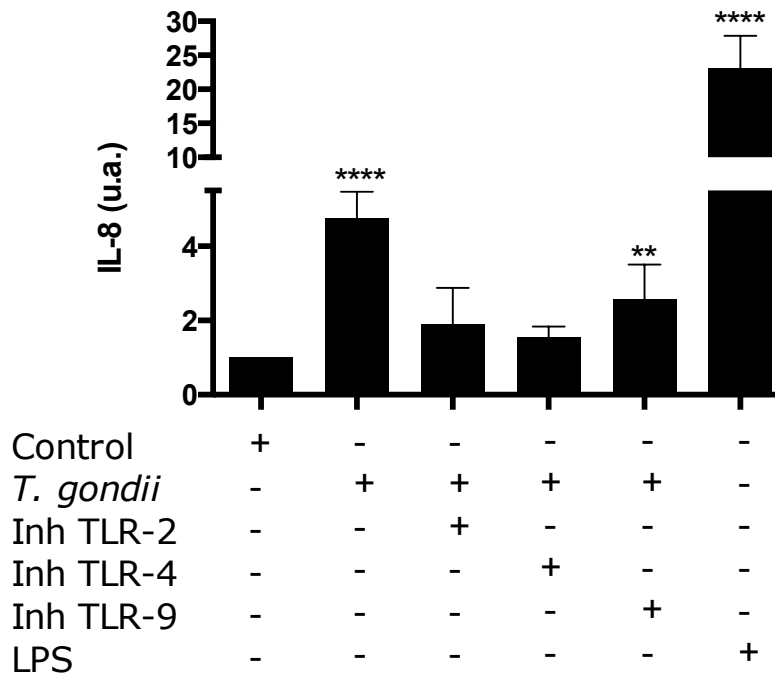
***T. gondii* no modifica la secreción de IL-4 en HPCVE.** HPCVE fueron co-cultivados durante dos horas con taquizoitos de *T. gondii* (cepa RH) en concentración de  $10^5$  parásitos/ml ó LPS (10 ng/ml) (control positivo), así como en presencia o ausencia de los anticuerpos específicos neutralizantes para TLR-2 (Pab-hTLR2; Invivogen®) (5µg/ml) y TLR-4 (PAb-hTLR4 Invivogen®) (1µg/ml). TLR-9 fue inhibido utilizando oligonucleótidos supresivos mediante CpGs inhibitorios (ODN TTAGGG, Invivogen®) (5µg/ml). Los niveles de IL-4 fueron determinados en el sobrenadante mediante test de ELISA. Las columnas corresponden a los promedios, con su desviación estándar, todos los valores fueron normalizados respecto al control. Se utilizó el test estadístico ANDEVA seguido por "Dunnett´s post-test".

### ***T. gondii* induce la secreción de la quimioquina IL-8 en HPCVE**

HPCVE fueron incubados en presencia o ausencia de taquizoitos de *T. gondii* (cepa RH) en concentración de  $10^5$  parásitos/ml, en presencia o ausencia de LPS (control positivo) así como en presencia o ausencia de los respectivos inhibidores específicos, durante dos horas. El nivel de secreción de IL-8 fue determinado mediante ELISA.

El parásito aumenta en un  $378\% \pm 6.9\%$  ( $p \leq 0.0001$ ) los niveles de secreción de IL-8 (Fig. 13). Los inhibidores para TLR-2 y TLR-4 no alteran los niveles de secreción de la IL-8, sin embargo se observa un aumento de  $158\% \pm 9.3\%$  ( $p \leq 0.01$ ) en muestras incubadas con el inhibidor de TLR-9. Aumento que fue menor que el observado con el parásito sólo.

**Fig. 13**



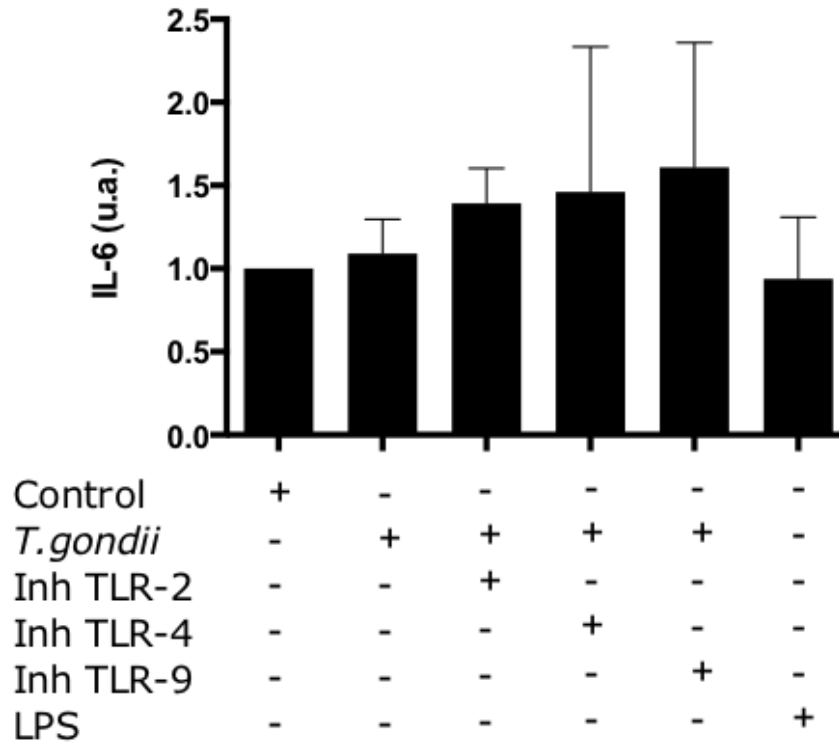
***T. gondii* incrementa significativamente la secreción de IL-8 en HPCVE.** HPCVE fueron co-cultivados durante dos horas con taquizoitos de *T. gondii* (cepa RH) en concentración de  $10^5$  parásitos/ml ó LPS (10 ng/ml) (control positivo), así como en presencia o ausencia de los anticuerpos específicos neutralizantes para TLR-2 (Pab-hTLR2; Invivogen®) (5µg/ml) y TLR-4 (PAb-hTLR4 Invivogen®) (1µg/ml). TLR-9 fue inhibido utilizando oligonucleótidos supresivos mediante CpGs inhibitorios (ODN TTAGGG, Invivogen®) (5µg/ml). Los niveles de IL-8 fueron determinados en el sobrenadante mediante test de ELISA. Las columnas corresponden a los promedios, con su desviación estándar. Todos los valores fueron normalizados respecto al control. Se utilizó el test estadístico ANDEVA seguido por "Dunnett's post-test". \*\* $p \leq 0.01$  ; \*\*\* $p \leq 0.001$  ; \*\*\*\* $p \leq 0.0001$

### ***T. gondii* no induce cambios en la secreción de citoquina pro-inflamatorias, anti-inflamatorias ni quimioquina IL-8 en células BeWO**

1 x10<sup>6</sup> células fueron sembradas y luego incubadas en presencia y ausencia de taquizoitos de *T. gondii* (cepa RH) en una relación célula:parásito 1:0,1, en presencia o ausencia de LPS (control positivo) así como en presencia o ausencia de los respectivos inhibidores específicos, durante dos horas. Los niveles de secreción de las diferentes citoquinas fue determinado mediante ELISA.

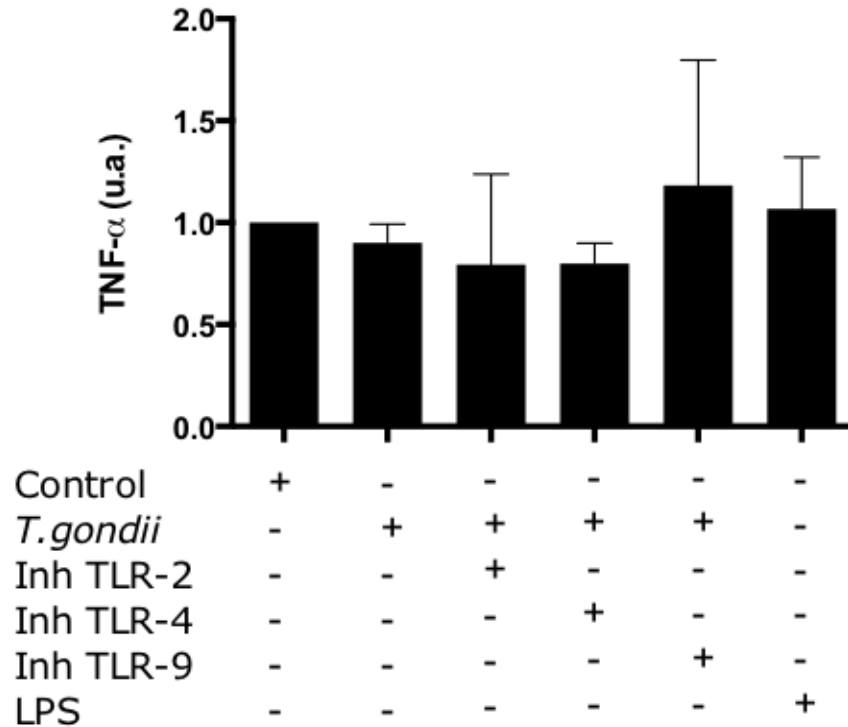
*T. gondii* sólo o en presencia de los inhibidores de TLR-2, TLR-4 y TLR-9 no altera el perfil de secreción de las citoquinas pro-inflamatorias, IL-6 (Fig. 14) y TNF- $\alpha$  (Fig. 15), estudiadas. El parásito tampoco altera el perfil de las citoquinas anti-inflamatorias (IL-4 e IL-10) ni de la quimioquina IL-8 (Fig. 16). Solamente en presencia del parásito y de los inhibidores para TLR-4 y TLR-9 se observó un aumento estadísticamente significativo de 42%  $\pm$  3.7% ( $p \leq 0.05$ ) y 163%  $\pm$  0,7%, ( $p \leq 0.0001$ ) respectivamente para IL-8 (Fig. 16, panel derecho).

**Fig. 14**



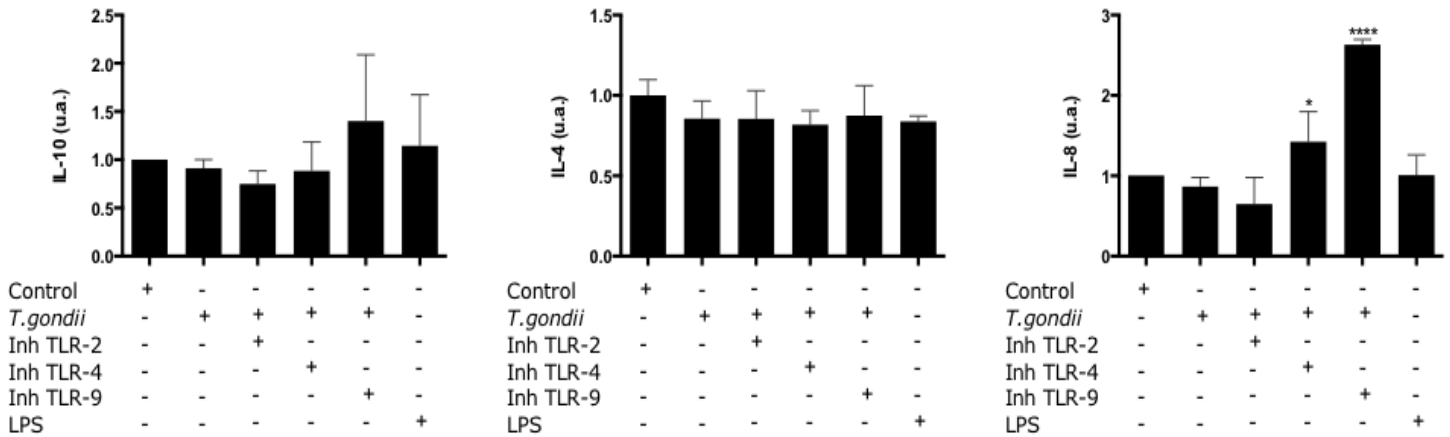
***T. gondii* no altera la secreción de IL-6 en células BeWo.**  $1 \times 10^6$  células fueron sembradas y luego incubadas durante 2 horas en presencia o ausencia de taquizoitos de *T. gondii* (cepa RH) en una relación célula:parásito 1:0,1 y así como en presencia o ausencia de los anticuerpos específicos neutralizantes para TLR-2 (Pab-hTLR2; Invivogen®) (5µg/ml) y TLR-4 (PAb-hTLR4 Invivogen®) (1µg/ml) u oligonucleótidos supresivos para TLR-9 (ODN TTAGGG, Invivogen®) (5µg/ml) o de LPS (10 ng/ml) (control positivo). Los niveles de IL-6 fueron determinados en el sobrenadante mediante test de ELISA. Las columnas corresponden a los promedios, con su desviación estándar. Todos los valores fueron normalizados respecto al control. Se utilizó el test estadístico ANDEVA seguido por "Dunnett´s post-test".

**Fig. 15**



***T. gondii* no altera la secreción de TNF- $\alpha$  en células BeWo.**  $1 \times 10^6$  células fueron sembradas y luego incubadas durante 2 horas en presencia o ausencia de taquizoitos de *T. gondii* (cepa RH) en una relación célula:parásito 1:0,1 y así como en presencia o ausencia de los anticuerpos específicos neutralizantes para TLR-2 (Pab-hTLR2; Invivogen®) (5 $\mu$ g/ml) y TLR-4 (PAb-hTLR4 Invivogen®) (1 $\mu$ g/ml) u oligonucleótidos supresivos para TLR-9 (ODN TTAGGG, Invivogen®) (5 $\mu$ g/ml) o de LPS (10 ng/ml) (control positivo). Los niveles de TNF- $\alpha$  fueron determinados en el sobrenadante mediante test de ELISA. Las columnas corresponden a los promedios, con su desviación estándar. Todos los valores fueron normalizados respecto al control. Se utilizó el test estadístico ANDEVA seguido por "Dunnett´s post-test".

**Fig. 16**



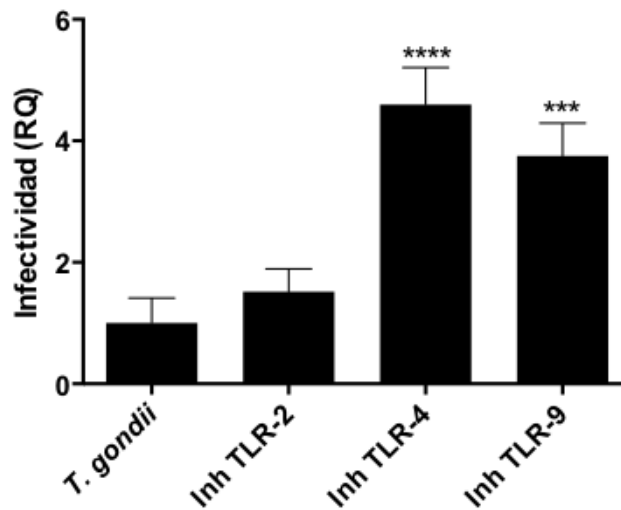
***T. gondii* no modifica la secreción de IL-10, IL-4 e IL-8 a las 2 horas post-infección en células BeWo.**  $1 \times 10^6$  células fueron sembradas y luego incubadas durante 2 horas en presencia o ausencia de taquizoitos de *T. gondii* (cepa RH) en una relación célula:parásito 1:0,1 y así como en presencia o ausencia de los anticuerpos específicos neutralizantes para TLR-2 (Pab-hTLR2; Invivogen®) (5µg/ml) y TLR-4 (PAb-hTLR4 Invivogen®) (1µg/ml) u oligonucleótidos supresivos para TLR-9 (ODN TTAGGG, Invivogen®) (5µg/ml) o de LPS (10 ng/ml) (control positivo). Los niveles de IL-10, IL-4 e IL-8 fueron determinados en el sobrenadante mediante test de ELISA. Las columnas corresponden a los promedios, con su desviación estándar. Todos los valores fueron normalizados respecto a sus controles. Se utilizó el test estadístico ANDEVA seguido por "Dunnett's post-test". \*  $p \leq 0.05$  ; \*\*\*\*  $p \leq 0.0001$

### 3.- Inhibición de los TLR-4 y TLR-9, pero no TLR-2, incrementa la infección de *T. gondii* en los HPCVE.

HPCVE fueron incubados en presencia o ausencia de taquizoitos de *T. gondii* (cepa RH) con  $10^5$  parásitos/ml, así como en presencia o ausencia de los respectivos inhibidores específicos, durante dos horas. Los niveles de infección en los HPCVE fue analizada mediante la determinación de la carga de DNA parasitaria por qPCR de doble control.

La inhibición de los TLR-4 y TLR-9 produce un aumento de un  $360\% \pm 6\%$  ( $p \leq 0.0001$ ) y en  $275\% \pm 5.4\%$  ( $p \leq 0.001$ ), respectivamente. La inhibición de TLR-2 no altera los niveles de DNA parasitario (Fig. 17).

**Fig. 17**



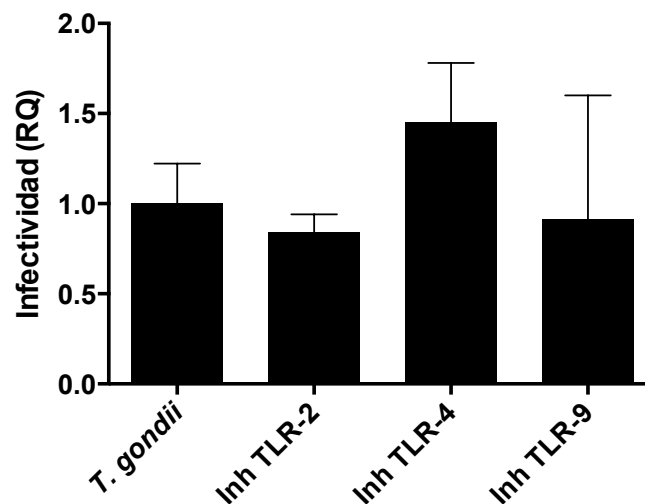
**Inhibición de TLR-4 y TLR-9, pero no TLR-2, incrementa la infección de *T. gondii* en los HPCVE.** HPCVE fueron co-cultivados durante dos horas con taquizoitos de *T. gondii* (cepa RH) en concentración de  $10^5$  parásitos/ml ó LPS (10 ng/ml) (control positivo), así como en presencia o ausencia de los anticuerpos específicos neutralizantes para TLR-2 (Pab-hTLR2; Invivogen®) (5µg/ml) y TLR-4 (PAb-hTLR4 Invivogen®) (1µg/ml). TLR-9 fue inhibido utilizando oligonucleótidos supresivos mediante CpGs inhibitorios (ODN TTAGGG, Invivogen®) (5µg/ml). La carga parasitaria fue determinada por Real Time PCR mediante el método de doble control comparativo ( $\Delta\Delta Ct$ ). Todos los valores fueron normalizados respecto a sus controles. Se utilizó el test estadístico ANDEVA seguido por "Dunnett's post-test". \*\*\*  $p \leq 0.001$  ; \*\*\*\*  $p \leq 0.0001$

**Inhibición de los TLR-2, TLR-4 y TLR-9 no altera la infección de *T. gondii* en células BeWo.**

1 x10<sup>6</sup> células fueron sembradas y luego incubadas en presencia o ausencia de taquizoitos de *T. gondii* (cepa RH) en una relación célula:parásito 1:0,1 y así como en presencia o ausencia de los anticuerpos específicos neutralizantes para TLR-2, TLR-4 u oligonucleótidos supresivos para TLR-9, durante dos horas. Los niveles de infección en los HPCVE fue analizada mediante la determinación de la carga de DNA parasitaria por qPCR de doble control.

Si bien se observa una tendencia de un aumento en la carga parasitaria de *T. gondii* en las células BeWo al utilizar el inhibidor específico para TLR-4 (45% ± 3.3), no hay cambios en presencia de los inhibidores específico (Fig. 18).

**Fig. 18**



**Inhibición de los TLR-2, TLR-4 y TLR-9 no altera la infección de *T. gondii* en células BeWo.**

1 x10<sup>6</sup> células fueron sembradas y luego incubadas durante 2 horas en presencia o ausencia de taquizoitos de *T. gondii* (cepa RH) en una relación célula:parásito 1:0,1 y así como en presencia o ausencia de los anticuerpos específicos neutralizantes para TLR-2 (Pab-hTLR2; Invivogen®) (5µg/ml) y TLR-4 (PAb-hTLR4 Invivogen®) (1µg/ml) ó oligonucleótidos supresivos para TLR-9 (ODN TTAGGG, Invivogen®) (5µg/ml) o de LPS (10 ng/ml) (control positivo). La carga parasitaria fue determinada por Real Time PCR mediante el método de doble control comparativo ( $\Delta\Delta Ct$ ). Todos los valores fueron normalizados respecto al control. Se utilizó el test estadístico ANDEVA seguido por "Dunnett´s post-test".

## DISCUSIÓN

La respuesta inmune innata es la primera línea de defensa frente a diferentes agentes patógenos a los que el ser humano está constantemente expuesto. Su presencia constitutiva y activación coordinada permite reaccionar de manera rápida y oportuna ante una agresión, siendo también un paso crítico para el posterior establecimiento de la inmunidad específica. Durante la gestación es fundamental su función ya que crea un microambiente que permite de manera equilibrada la eliminación de agentes infecciosos y la tolerancia materna a los antígenos fetales y placentarios. La producción de citoquinas como respuesta ante la detección de patrones moleculares asociados a patógenos dan inicio y modulan la magnitud de la respuesta. Una excesiva activación de esta respuesta puede ser perjudicial para la adecuada mantención de la gestación, es por tal razón que su balance y control es fundamental en este periodo. La presencia de los diez tipos de TLR conocidos hasta ahora en el trofoblasto nos da a conocer la importancia y rol que cumple la placenta como órgano inmune.

En relación al parásito *T. gondii*, el linaje Tipo I es el más virulento y el causante de la mayoría de los casos de transmisión congénita en América del Sur<sup>20</sup>, como ya fue mencionado. Todos los parásitos, independientemente del linaje inducen una respuesta en el hospedero, pero esta respuesta varía según linaje<sup>26</sup>. En el presente estudio se utilizó la cepa RH que corresponde al linaje tipo I, lo que permite extrapolar los datos obtenidos a la población local. La parasitemia se considera un factor de riesgo importante de la transmisión congénita, pero este dato no ha sido exactamente descrito en *T. gondii*. Sin embargo, se relaciona la infección aguda y, por lo tanto, altas parasitemias, con la transmisión de la madre al feto/recién nacido. Por otra parte, altas parasitemias de *T. cruzi*, causante de la Enfermedad de Chagas, se correlaciona con un mayor riesgo de transmisión<sup>53</sup>. Más aun, el daño histopatológico observado en HPCVE infectados *ex vivo* está directamente relacionado a la concentración de parásitos utilizados<sup>47,54,55</sup>. Estudios previos en el laboratorio, establecieron las condiciones óptimas de infección tanto *ex vivo* en HPCVE como en células BeWo para *T. gondii*. En estos estudios también se observó, que el daño se correlaciona positivamente con la concentración de parásitos usados.

La capacidad de atravesar las barreras epiteliales rápidamente y llegar al torrente sanguíneo dentro de las primeras horas post-infección podría ser un componente importante de la difusión *in vivo*, para llegar por ejemplo al feto en desarrollo. Después de la infección oral, los parásitos que fueron capaces de traspasar la barrera intestinal, son los que tienen la capacidad de migrar e infectar en forma más eficiente, por lo tanto constituye la primera selección de parásitos y esto sería crucial para la existencia de una difusión exitosa antes de la aparición de una respuesta inmune eficaz<sup>56</sup>. Por lo tanto, los taquizoitos que llegan a la barrera

placentaria son los que ya han pasado por un proceso de selección previa.

Los mecanismos utilizados por *T. gondii* para infectar la placenta, cruzarla e infectar al feto son poco conocidos y las aproximaciones experimentales para entender el mecanismo han sido principalmente en ratones, ovejas o modelos celulares<sup>26</sup>, modelos que no necesariamente pueden ser extrapolados a la especie humana debido a la gran diversidad anatómica de las placentas entre especies.

La reestructuración histológica que presentan las vellosidades coriónicas a medida que avanza la gestación es la que facilitaría la infección congénita del parásito<sup>57</sup>. También se ha observado que la infección materna se asocia a menudo con una inflamación pronunciada de la placenta, con una infiltración de neutrófilos y linfocitos (placentitis) que puede inducir la apoptosis en células de la placenta, y, finalmente, la destrucción del trofoblasto<sup>10</sup>, con la consiguiente pérdida de la integridad física de la barrera placentaria.

*T. gondii* es reconocido por TLR-2, TLR-4 y TLR-9. Actualmente también son considerados el TLR-7<sup>58,59</sup> y TLR-5<sup>60</sup> por lo que se hace necesario continuar los estudios en relación al efecto a nivel placentario del reconocimiento del patógeno por estos dos TLR para esclarecer su función.

Las citoquinas son proteínas secretadas por las células tanto de la inmunidad innata como adaptativa, mediando así sus funciones.

La respuesta normal en inmunocompetentes durante la infección con *T. gondii* es del tipo Th1, pero un embarazo normal se caracteriza por una respuesta inmunitaria preferencialmente del tipo Th2 y de células T-reguladoras, con la producción de citoquinas anti-inflamatorias tales como la interleuquina 10 y TGF- $\beta$ 1 tanto por las células del madre como del feto, incluyendo las células del trofoblasto<sup>61</sup>. El papel de las células trofoblásticas en la inmunología del embarazo, especialmente en la presencia de patógenos intracelulares tales como *T. gondii* y *Neospora caninum*, ha sido estudiada por diversos grupos de investigaciones, y utilizando principalmente un modelo con líneas celulares bien establecidas, tales como células BeWo.

Varios estudios en la última década sugieren GPI ancla de la Leishmania protozoos, *Toxoplasma*, *Trypanosoma*, y *Plasmodium* puede estimular la respuesta inmune innata a través de TLR mediada por las vías, lo que lleva a la producción de citoquinas pro-inflamatorias<sup>62</sup>.

La cascada inflamatoria sigue siendo un mecanismo central de parto prematuro y el daño fetal provocada por infecciones bacterianas. Citoquinas y quimioquinas pro-inflamatorias, probablemente juegan un papel central en la patogénesis del parto prematuro asociado a la infección y la lesión fetal<sup>13</sup>.

Los resultados obtenidos muestran un perfil de respuesta asociado al tipo Th 1, con un aumento de secreción de citoquinas pro-inflamatorias. Estos resultados son similares a los

observados en la respuesta de la placenta ante la presencia de Citomegalovirus y en los casos de malaria por *Plasmodium falciparum* provocando un daño directo, alterando las funciones críticas en la placenta al volverla más vulnerable a la apoptosis y el feto en desarrollo por difusión de las citoquinas. Esto puede llevar directamente a la restricción del crecimiento fetal, aborto espontáneo, nacimiento prematuro o muerte fetal, que son algunas de las consecuencias de la transmisión congénita de ciertos parásitos. En nuestro laboratorio también se ha evaluado la respuesta de los TLRs frente a la infección de los HPCVE con *T. cruzi*, demostrando cambios hacia una respuesta tipo Th 1, pero al comparar las diferentes citoquinas estudiadas, se observa que las concentraciones secretadas difieren entre ellas, lo que nos podría señalar que inducen respuesta con diferente grado de severidad que podría estar determinando la diferencia en las tasas de transmisión congénitas.

En relación a la expresión proteica de los TLRs, observamos el aumento significativo de TLR-2 y TLR-4 ante la infección con los taquizoitos de *T. gondii*. Esto podría deberse a que tanto TLR-2 y TLR-4 reconocen a glicofosfatidilinositol (GPI) del parásito lo que podría señalar que trabajan de manera cooperativa durante la infección por *T. gondii*. Al correlacionar estos datos mediante inmunohistoquímica, se observa el mismo patrón de inmuno-reactividad que lo observado en otras publicaciones que estudiaron el efecto de diversas patologías como la corioamnionitis y la preeclampsia sobre los TLR-2 y TLR-4<sup>63,64</sup> y confirmando que son constitutivamente expresados en las placentas a término y como fue también observado para TLR-9. Lo que nos confirma la capacidad que tiene la placenta de reaccionar inmunológicamente ante la presencia de microorganismos y con la capacidad de aumentar la expresión de estos TLRs de manera inmediata (dentro de las 2 hrs de la presencia del patógeno).

Podríamos señalar que TLR-4 cumple un papel fundamental en la mediación de la respuesta de la barrera placentaria para el reconocimiento e inicio de la respuesta frente a *T. gondii*, como ha sido también observado para *T. cruzi*<sup>65</sup>, ya que su inhibición produce un aumento en la carga parasitaria de *T. gondii* en los HPCVE.

En relación a TLR-9, estudios anteriores demostraban que oligonucleótidos CpG fallaban en la activación de TLR-9 en explantes vellositarios<sup>30,66</sup>, pero nuestros resultados contrarrestan esto, ya que podemos observar que al inhibir a TLR-9 hay un aumento estadísticamente significativo en la carga parasitaria de *T. gondii* y podemos pensar que el aumento observado en la expresión proteica de TLR-9 frente a la infección o frente al control positivo ODN, no es significativo por el tiempo utilizado para la medición (dos horas post-infección).

En relación a las citoquinas hemos observado un aumento de TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-6, las cuales pertenecen al grupo de citoquinas que llevan la respuesta inmune sistémica hacia un perfil Th1, cuyo establecimiento es fundamental para el control de la infección<sup>67</sup>. Sin embargo, un efecto secundario no deseado es el potencial efecto dañino sobre la mantención de la

gestación, en donde un desbalance en el equilibrio Th1/Th2 ha sido ligado con abortos y partos prematuros.<sup>40</sup> Es importante destacar que INF- $\gamma$  es una citoquina altamente aumentada durante la primo-infección en inmunocompetentes y muy importante en el control de la infección, que no se ve influenciada ni por la presencia del patógeno ni por los inhibidores específicos, y esto podría deberse a que fisiológicamente existe una baja producción de esta citoquina hacia el final de la gestación<sup>68</sup>.

En el caso de IL-1 $\beta$ , si bien su rol en el comienzo de la gestación es el de permitir la migración de las células del trofoblasto para invadir el útero materno<sup>69</sup>, hacia el último tercio de la preñez sus roles locales son negativos para la integridad del trofoblasto, por ejemplo, debilita las uniones estrechas entre las células de la barrera placentaria, facilitando un potencial invasión por parte de patógenos. Por lo tanto su aumento, podría facilitar la infección del parásito.

La IL-8 es producido por macrófagos y otros tipos de células tales como las células epiteliales y células endoteliales. Su función principal es la inducción de la quimiotaxis en sus células diana como neutrófilos y granulocitos. La IL-8 se asocia a menudo con la inflamación. Se ha citado como un mediador pro-inflamatorio en Toxoplasmosis. Aumento del nivel de IL-8 se correlaciona con una inflamación aguda o con una forma reactiva de la toxoplasmosis. IL-8 es responsable de la activación y la recirculación de los neutrófilos y estos pueden fagocitar y matar o inhibir los taquizoitos de *T. gondii*. Cuando las células del epitelio intestinal son infectadas con *T. gondii* se induce rápidamente la secreción de IL-8 teniendo un papel importante en la respuesta inmune innata<sup>70</sup>.

La IL-10 es una potente citoquina anti-inflamatoria secretada en paralelo como mecanismo anti-inflamatorio frente a una infección. Está destinada a limitar el daño del tejido y para mantener o restablecer la homeostasis del tejido. IL-10 es también una de las principales citoquinas inmunomoduladoras, entre sus roles está la capacidad de inhibir la activación de monocitos, macrófagos y neutrófilos<sup>71</sup>. El aumento de la secreción de esta citoquina podría significar que el trofoblasto es capaz de poner en marcha mecanismos que controlen una inflamación exagerada, la cual eventualmente podría ser detrimental para la mantención de la gestación. Aquí hemos observado un aumento significativo de la secreción de IL-10 frente a la infección con *T. gondii* en HPCVE. Interesantemente, la secreción de IL-10 es aún mayor en la infección *ex vivo* de HPCVE con *T. cruzi*, parásito que presenta una tasa de transmisión mucho menor. Esto podría relacionarse con las diferencias en las tasas de transmisión congénita porque se ha planteado que la disminución en la producción de IL-10 puede llevar a una excesiva inflamación, que puede desencadenar en enfermedades autoinmunes y en la susceptibilidad a infecciones crónicas<sup>71</sup>.

El hecho de que los niveles de citoquina secretados en los HPCVE sometidos a la inhibición no se hayan modificado se puede explicar por la existencia de mecanismos

redundantes en la inmunidad innata (como la activación de receptores NOD) que utilizan vías de transducción comunes que resultan en respuesta inflamatoria de un perfil similar a la inducida por TLR, alternativamente, existe la posibilidad de activación secundaria de otros receptores por la generación de metabolitos secundarios de la infección o por la liberación de ligandos desde los componentes de la barrera que se generan por la destrucción de la matriz extracelular.

En relación a los resultados obtenidos en las células BeWo, postulamos que no es un buen modelo para estudiar la respuesta inmune innata temprana y se confirma lo propuesto previamente, que el uso de HPCVE es un mejor modelo para estudiar los mecanismos de infección congénita<sup>72</sup>. Adicionalmente, se ha descrito que en células BeWo se requiere un mayor tiempo de exposición con el parásito para evidenciar cambios en los patrones de secreción de citoquinas<sup>73</sup>. Existen experimentos que evalúan niveles de citoquinas a las dos horas post infección, pero con una relación célula:parásito de 1:5<sup>74</sup>, o la respuesta de las células es evaluada con la estimulación de diferentes citoquinas y una alta concentración de parásitos<sup>75</sup>. Un estudio realizado en siete líneas celulares de trofoblasto, demostró que todas expresaban genes de TLRs pero presentaban una pérdida de la respuesta funcional de citoquinas ante la activación de los TLR por ligandos específicos *in vitro*<sup>76</sup> como también se ha descrito que LPS no activa la vía de NF-kB en células BeWo<sup>77</sup>.

Los resultados obtenidos son un aporte a la comprensión de los mecanismos por los cuales los parásitos infectan la placenta y pasan al feto, que podrán ser parte de futuras investigaciones para la elaboración de biomarcadores específicos de la infección por *T. gondii* y que permitan la elaboración de estrategias que permitan disminuir la tasa de transmisión congénita de la toxoplasmosis. La incorporación de medidas públicas que permitan mejorar estándares de higiene en la población, como también, la incorporación de un programa que permita la pesquisa de casos de infección aguda por *T. gondii* al ingreso y durante los controles pre-natales en las embarazadas, deberían ser prioridad para lograr disminuir los daños que esta enfermedad causa en el feto y el recién nacido, ya que sabemos que en la mayoría de los casos la infección primaria será asintomática. Continuar los estudios en este ámbito permitirá en un futuro prevenir la transmisión congénita, mantener la salud del recién nacido y lograr desarrollar tratamientos eficaces.

## CONCLUSIONES

Los resultados en células BeWo no fueron concluyentes.

En HPCVE, *T. gondii* induce la expresión proteica de TLR-2 y TLR-4 y modula la secreción de citoquinas pro y anti-inflamatorias. La inhibición de los TLR-4 y TLR-9 aumenta la infección con el parásito. Estos resultados sugieren que los TLRs estudiados así como el perfil de citoquinas asociado son modulados por el parásito y que forman parte de los mecanismos antiparasitarios de la placenta humana.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Abbasi, M. *et al.* Infection of placental trophoblasts by *Toxoplasma gondii*. *J. Infect. Dis.* **188**, 608–616 (2003).
2. Chemoh, W. *et al.* *Toxoplasma gondii* infection: What is the real situation? *Exp. Parasitol.* **135**, 685–689 (2013).
3. Flegr, J., Prandota, J., Sovičková, M. & Israili, Z. H. Toxoplasmosis--a global threat. Correlation of latent toxoplasmosis with specific disease burden in a set of 88 countries. *PLoS One* **9**, e90203 (2014).
4. Jones, J. L., Kruszon-Moran, D., Rivera, H. N., Price, C. & Wilkins, P. P. *Toxoplasma gondii* Seroprevalence in the United States 2009–2010 and Comparison with the Past Two Decades. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **90**, 1135–1139 (2014).
5. Contreras, M. D. C. *et al.* Seroepidemiology of human toxoplasmosis in Chile. *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo* **38**, 431–435 (1996).
6. Miller, C. M., Boulter, N. R., Ikin, R. J. & Smith, N. C. The immunobiology of the innate response to *Toxoplasma gondii*. *Int. J. Parasitol.* **39**, 23–39 (2009).
7. Długońska, H. Review articles *Toxoplasma gondii* and the host cells 1. **60**, 83–88 (2014).
8. Morrisette, N. S. & Ajioka, J. W. The early years of *Toxoplasma* research: What's past is prologue. *Int. J. Parasitol.* **39**, 865–869 (2009).
9. Dubey, J. P. History of the discovery of the life cycle of *Toxoplasma gondii*. *Int. J. Parasitol.* **39**, 877–882 (2009).
10. Carlier, Y., Truyens, C., Deloron, P. & Peyron, F. Congenital parasitic infections: A review. *Acta Trop.* **121**, 55–70 (2012).
11. Castro-Filice, L. S. *et al.* Azithromycin is able to control *Toxoplasma gondii* infection in human villous explants. *J. Transl. Med.* **12**, 132 (2014).
12. Błaszowska, J. & Górska, K. Parasites and fungi as a threat for prenatal and postnatal human development. *Ann. Parasitol.* **60**, 225–234 (2014).
13. Adams Waldorf, K. M. & McAdams, R. M. Influence of infection during pregnancy on fetal development. *Reproduction* **146**, R151–62 (2013).
14. Rendell, V. R. *et al.* Trypanosoma cruzi-Infected Pregnant Women without Vector Exposure Have Higher Parasitemia Levels: Implications for Congenital Transmission Risk. *PLoS One* **10**, e0119527 (2015).
15. Liempi, A. *et al.* Trypanosoma cruzi induces trophoblast differentiation: A potential local antiparasitic mechanism of the human placenta? *Placenta* 1–8 (2014). doi:10.1016/j.placenta.2014.09.017
16. Kemmerling, U., Bosco, C. & Galanti, N. Infection and invasion mechanisms of *Trypanosoma cruzi* in the congenital transmission of Chagas' disease: A proposal. *Biol. Res.* **43**, 307–316 (2010).
17. Pinard, J. a., Leslie, N. S. & Irvine, P. J. Maternal serologic screening for toxoplasmosis. *J. Midwifery Women's Heal.* **48**, 308–316 (2003).
18. Torgerson, P. R. & Mastroiacovo, P. The global burden of congenital toxoplasmosis: a systematic review. *Bull. World Health Organ.* **91**, 501–8 (2013).
19. Wang, Y. & Yin, H. Research advances in microneme protein 3 of *Toxoplasma gondii*. *Parasit. Vectors* **8**, 384 (2015).
20. Darde, M. . TOXOPLASMA GONDII, "NEW" GENOTYPES AND VIRULENCE. *Parasite* **15**,

366–371 (2008).

21. Dubey, J. P., Lindsay, D. S. & Speer, C. A. Structures of *Toxoplasma gondii* tachyzoites, bradyzoites, and sporozoites and biology and development of tissue cysts. *Clin. Microbiol. Rev.* **11**, 267–99 (1998).
22. Halonen, S. & Weiss, L. *Handb clin Neurol. Handb clin Neurol* (2014). doi:10.1016/B978-0-444-53490-3.00008-X.TOXOPLASMOSIS
23. Fabiani, S., Pinto, B., Bonuccelli, U. & Bruschi, F. Neurobiological studies on the relationship between toxoplasmosis and neuropsychiatric diseases. *J. Neurol. Sci.* **351**, 3–8 (2015).
24. Fuller Torrey, E., Simmons, W. & Yolken, R. H. Is childhood cat ownership a risk factor for schizophrenia later in life? *Schizophr. Res.* **165**, 1–2 (2015).
25. Giakoumelou, S. *et al.* The role of infection in miscarriage. *Hum. Reprod. Update* **0**, dmv041 (2015).
26. Robbins, J. R., Zeldovich, V. B., Poukchanski, A., Boothroyd, J. C. & Bakardjiev, A. I. Tissue barriers of the human placenta to infection with *Toxoplasma gondii*. *Infect. Immun.* **80**, 418–428 (2012).
27. Zeldovich, V. B. & Bakardjiev, A. I. Host Defense and Tolerance: Unique Challenges in the Placenta. *PLoS Biol.* **12**, 1–3 (2014).
28. Schlüter, D. *et al.* Animals are key to human toxoplasmosis. *Int. J. Med. Microbiol.* **304**, 917–929 (2014).
29. Halonen, S. K. & Weiss, L. M. Toxoplasmosis. **114**, 125–145 (2013).
30. Riley, J. K. & Nelson, D. M. Toll-like Receptors in Pregnancy Disorders and Placental Dysfunction. *Clin. Rev. Allergy Immunol.* **39**, 185–193 (2010).
31. Kawai, T. & Akira, S. The roles of TLRs, RLRs and NLRs in pathogen recognition. *Int. Immunol.* **21**, 317–337 (2009).
32. Koga, K. & Mor, G. Toll-Like Receptors at the Maternal–Fetal Interface in Normal Pregnancy and Pregnancy Disorders. *Am. J. Reprod. Immunol.* **63**, 587–600 (2010).
33. Rindsjo, E., Holmlund, U., Sverremark-ekstro, E., Papadogiannakis, N. & Scheynius, A. Toll-like receptor-2 expression in normal and pathologic human placenta B. *Hum. Pathol.* **38**, 468–473 (2007).
34. Klaffenbach, D. *et al.* Regulation and signal transduction of toll-like receptors in human chorioncarcinoma cell lines. *Am. J. Reprod. Immunol.* **53**, 77–84 (2005).
35. Kawasaki, T. & Kawai, T. Toll-like receptor signaling pathways. *Front. Immunol.* **5**, 461 (2014).
36. Hart, K. M. *et al.* Functional expression of pattern recognition receptors in tissues of the human female reproductive tract. *J Reprod Immunol.* **80**, 33–40 (2009).
37. Koga, K. & Mor, G. Toll-Like Receptors at the Maternal-Fetal Interface in Normal Pregnancy and Pregnancy Disorders. *Am. J. Reprod. Immunol.* **63**, 587–600 (2010).
38. Yarovinsky, F. & Sher, A. Toll-like receptor recognition of *Toxoplasma gondii*. *Int. J. Parasitol.* **36**, 255–259 (2006).
39. Prabhudas, M. *et al.* Commentary Immune mechanisms at the maternal-fetal interface : perspectives and challenges. *Nat. Immunol.* **16**, 328–334 (2015).
40. Mor, G., Cardenas, I., Abrahams, V. & Guller, S. Inflammation and pregnancy: the role of the immune system at the implantation site. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1221**, 80–7 (2011).
41. Mor, G. & Cardenas, I. The immune system in pregnancy: a unique complexity. *Am. J.*

- Reprod. Immunol.* **63**, 425–33 (2010).
42. Galvan-Ramírez, M. D. L. L., Gutiérrez-Maldonado, A. F., Verduzco-Grijalva, F. & Jiménez, J. M. D. The role of hormones on *Toxoplasma gondii* infection: a systematic review. *Front. Microbiol.* **5**, (2014).
  43. Moore, K. & Persaud, T. *The Developing Human, Clinically Oriented Embryology*. (2004).
  44. Syme, M., Paxton, J. & Keelan, J. Drug transfer and metabolism by the human placenta. *Clin Pharmacokinet* **43**, 487–514. (2004).
  45. Apt, W. *et al.* Vertical transmission of *trypanosoma cruzi* in the province of Choapa, IV region, Chile. preliminary report (2005-2008). *Biol. Res.* **43**, 269–274 (2010).
  46. Malhotra, I. *et al.* Umbilical cord-blood infections with *Plasmodium falciparum* malaria are acquired antenatally in Kenya. *J. Infect. Dis.* **194**, 176–83 (2006).
  47. Fretes, R. E. & Kemmerling, U. Mechanism of *Trypanosoma cruzi* Placenta Invasion and Infection : The Use of Human Chorionic Villi Explants. **2012**, (2012).
  48. Roos, D. S., Donald, R. G. K., Morrissette, N. S. & Moulton, a L. C. Molecular Tools for Genetic Dissection of the Protozoan Parasite *Toxoplasma gondii*. *Methods in Cell Biology* **45**, 27–63 (1995).
  49. Duaso J, Rojo G, Cabrera G, Galanti N, Bosco C, Maya JD, Morello A, K. U. *Trypanosoma cruzi* induces tissue disorganization and destruction of chorionic villi in an ex vivo infection model of human placenta. *Placenta* **31**, 705–711 (2010).
  50. Castillo, C. *et al.* Role of matrix metalloproteinases 2 and 9 in ex vivo *Trypanosoma cruzi* infection of human placental chorionic villi. *Placenta* **33**, 991–7 (2012).
  51. Pfaffl, M. W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* **29**, e45 (2001).
  52. Lin, M. H., Chen, T. C., Kuo, T. T., Tseng, C. C. & Tseng, C. P. Real-time PCR for quantitative detection of *Toxoplasma gondii*. *J Clin Microbiol* **38**, 4121–4125 (2000).
  53. Brutus, L. *et al.* Short report: Detectable *Trypanosoma cruzi* parasitemia during pregnancy and delivery as a risk factor for congenital chagas disease. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **83**, 1044–1047 (2010).
  54. Carlier, Y. & Truyens, C. Congenital Chagas disease as an ecological model of interactions between *Trypanosoma cruzi* parasites, pregnant women, placenta and fetuses. *Acta Trop.* 1–13 (2015). doi:10.1016/j.actatropica.2015.07.016
  55. Torrico, F. *et al.* [Effects of maternal infection with *Trypanosoma cruzi* in pregnancy development and in the newborn infant]. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* **38 Suppl 2**, 73–6 (2005).
  56. Barragan, A. & Sibley, L. D. Migration of *Toxoplasma gondii* across biological barriers. *Trends Microbiol.* **11**, 426–430 (2003).
  57. Benirschke, K. & Kaufmann, P. *Pathology of the human placenta*. (2000).
  58. Andrade, W. A. *et al.* Combined action of nucleic acid-sensing Toll-like receptors and TLR11/TLR12 heterodimers imparts resistance to *Toxoplasma gondii* in mice. *Cell Host Microbe* **13**, 42–53 (2013).
  59. Caetano, B. C. *et al.* Requirement of UNC93B1 reveals a critical role for TLR7 in host resistance to primary infection with *Trypanosoma cruzi*. *J. Immunol.* **187**, 1903–11 (2011).
  60. Salazar Gonzalez, M. R. *et al.* *Toxoplasma gondii*-derived profilin triggers Human TLR5-dependent cytokine production. **6**, 685–694 (2014).
  61. Koga, K., Izumi, G., Mor, G., Fujii, T. & Osuga, Y. Toll-like Receptors at the Maternal-

Fetal Interface in Normal Pregnancy and Pregnancy Complications. *Am. J. Reprod. Immunol.* 1–14 (2014). doi:10.1111/aji.12258

62. Manuscript, A. NIH Public Access. *Changes* **29**, 997–1003 (2012).
63. Kumazaki, K., Nakayama, M., Yanagihara, I., Suehara, N. & Wada, Y. Immunohistochemical distribution of Toll-like receptor 4 in term and preterm human placentas from normal and complicated pregnancy including chorioamnionitis. *Hum. Pathol.* **35**, 47–54 (2004).
64. Pineda, A., Verdin-Terán, S. L., Camacho, A. & Moreno-Fierros, L. Expression of Toll-like Receptor TLR-2, TLR-3, TLR-4 and TLR-9 Is Increased in Placentas from Patients with Preeclampsia. *Arch. Med. Res.* **42**, 382–391 (2011).
65. Oliveira, A.-C. *et al.* Expression of functional TLR4 confers proinflammatory responsiveness to *Trypanosoma cruzi* glycoinositolphospholipids and higher resistance to infection with *T. cruzi*. *J. Immunol.* **173**, 5688–5696 (2004).
66. Patni, S. *et al.* Expression and activity of Toll-like receptors 1-9 in the human term placenta and changes associated with labor at term. *Biol. Reprod.* **80**, 243–248 (2009).
67. Bafica, A. *et al.* Cutting edge: TLR9 and TLR2 signaling together account for MyD88-dependent control of parasitemia in *Trypanosoma cruzi* infection. *J. Immunol.* **177**, 3515–3519 (2006).
68. Murphy, S. P. *et al.* Interferon gamma in successful pregnancies. *Biol. Reprod.* **80**, 848–859 (2009).
69. Tossetta, G. *et al.* IL-1 $\beta$  and TGF- $\beta$  weaken the placental barrier through destruction of tight junctions: An in vivo and in vitro study. *Placenta* **35**, 509–16 (2014).
70. Rostami Nejad, M. *et al.* The evaluation of interleukin-8 chemokine in chronic and acute *Toxoplasma gondii* infection. *Gastroenterol. Hepatol. from bed to bench* **4**, 34–37 (2011).
71. Iyer, S. S. & Cheng, G. Role of interleukin 10 transcriptional regulation in inflammation and autoimmune disease. *Crit. Rev. Immunol.* **32**, 23–63 (2012).
72. Fretes, R. E. & Kemmerling, U. Mechanism of *Trypanosoma cruzi* Placenta Invasion and Infection: The Use of Human Chorionic Villi Explants. *J. Trop. Med.* **2012**, 614820 (2012).
73. Franco, P. S. *et al.* Azithromycin and spiramycin induce anti-inflammatory response in human trophoblastic (BeWo) cells infected by *Toxoplasma gondii* but are able to control infection. *Placenta* **32**, 838–844 (2011).
74. Angeloni, M. B. *et al.* Differential apoptosis in BeWo cells after infection with highly (RH) or moderately (ME49) virulent strains of *Toxoplasma gondii* is related to the cytokine profile secreted, the death receptor Fas expression and phosphorylated ERK1/2 expression. *Placenta* **34**, 973–982 (2013).
75. Barbosa, B. F. *et al.* IL10, TGF beta1, and IFN gamma modulate intracellular signaling pathways and cytokine production to control *Toxoplasma gondii* infection in BeWo trophoblast cells. *Biol. Reprod.* **92**, 82 (2015).
76. Gierman, L. M. *et al.* Toll-like receptor profiling of seven trophoblast cell lines warrants caution for translation to primary trophoblasts. *Placenta* (Elsevier Ltd, 2015). doi:10.1016/j.placenta.2015.09.004
77. Koh, Y. Q. *et al.* Differential response to lipopolysaccharide by JEG-3 and BeWo human choriocarcinoma cell lines. *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.* **175**, 129–33 (2014).

