

Evaluación de los cambios morfológicos y funcionales de células del trofoblasto y mediadores fisiológicos asociados con la infección por *Plasmodium falciparum*

Carolina López-Guzmán¹, Ana Vásquez, Tatiana Lopera¹, Cesar Segura¹, Julio Bueno¹, Gabriel Vélez¹

RESUMEN

Introducción: la infección por *Plasmodium falciparum* en el embarazo genera alrededor de 150.000 muertes fetales y 10.000 muertes maternas anuales en zonas endémicas para malaria. El secuestro de parásitos es la principal causa de daño en la placenta; la unión del receptor de sulfato de Condrotina A (CSA) expresado por el sincitiotrofoblasto (STB) (porción externa del trofoblasto) y el antígeno parasitario VAR2CSA expresado por los eritrocitos parasitados median la citohaderencia en este tejido.

Las células del STB no se replican, estas se forman a partir de la fusión nuclear de la capa celular subyacente mononucleada de citotrofoblastos (CTB). La fusión y conversión del estado mononuclear al sincitial es obligatorio para un embarazo exitoso. Entre las funciones del STB está el facilitar el intercambio de gases y nutrientes, producir hormonas, mediar tolerancia inmunológica hacia el semialoinjerto fetal, ser barrera física para microorganismos y contribuir al control innato de las infecciones en la interface materno-fetal.

Plasmodium falciparum induce un aumento de células inflamatorias (monocitos y macrófagos), y de citoquinas y quimioquinas en la placenta para eliminar los eritrocitos parasitados; tanto el secuestro como la inflamación conllevan a alteraciones en el intercambio de nutrientes y gases entre la madre y el feto, en procesos angiogénicos, en vías hormonales, en la absorción de glucosa y aminoácidos en la placenta, y daños histológicos de este tejido que finalmente, se asocian con bajo peso al nacer, restricción del

crecimiento intrauterino y parto prematuro y muerte neonatal.

La mayoría de los estudios han evaluado el impacto de la infección en mediadores inflamatorios en sangre periférica de gestantes, sin embargo, poco se conoce acerca del efecto directo de *P. falciparum* sobre el tejido placentario, específicamente sobre el proceso de diferenciación y función de células del STB que median la citohaderencia de eritrocitos parasitados en este tejido.

Objetivo general: identificar los cambios en la diferenciación, función y expresión de moléculas en células del trofoblasto expuestas a *Plasmodium falciparum*.

Metodología: el efecto de *P. falciparum* adherente a CSA (3D7-CSA y FCB1-CSA) sobre la diferenciación y función celular se evaluará en dos modelos: línea celular derivada de coriocarcinoma placentario (BeWo ATCC® CCL-98™) y explante de placenta, este último, corresponde al uso de pequeños fragmentos de tejido que está cubierto en su superficie con altas cantidades de trofoblasto y proporciona un modelo más similar al tejido placentario in vivo. Brevemente, en las BeWo se realizará marcaje por inmunotinción con citoqueratina-7 (CK-7) para identificar el CTB y para establecer la diferenciación a STB se utilizará E-cadherina, Ki-67 y M30, marcadores asociados respectivamente con (diferenciación, proliferación y apoptosis celular). Se evaluará el índice de sincitialización (IS) por microscopía y se corroborará la formación de STB con marcadores bioquímicos medidos por ELISA como la βhCG. En el explante se hará análisis histopatológico mediante lecturas de inmunohistoquímica empleando las tinciones con CK-7 y hCG con el fin de corroborar estado morfológico y funcional del explante en cinética de cultivo de 24, 48 y 72h. La viabilidad del explante se verificará con medición de la enzima Lactato deshidrogenasa (LDH) en sobrenadante del cultivo. Por otro lado, para evaluar la función del STB se hará ensayo colorimétrico para medir la cantidad de derivados de glucosa fluorescente (2-Deoxyglucose (2-DG) permeable y se determinará la expresión del receptor de glucosa placentario (Glut-1), citoquinas Th-1/Th-2 y factores angiogénicos por qPCR, ELISA y citometría de flujo.

¹ Grupo Malaria, Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia
Correspondencia: Carolina López, carolina.lopezg@udea.edu.co
Financiado por Colciencias (CT 921-2019)

Resultados preliminares: una vez estandarizadas las condiciones para disponer de un modelo celular de STB in vitro, a partir de células de CTB, empleando un agente inductor de AMPc (FSK) a una concentración de 50µM, se inició con la estandarización de cultivos para estudiar el efecto de *P. falciparum* en una parasitemia del 10%. La cuantificación del marcador bioquímico hCG y la expresión génica de hCG y SYN-2 igualmente permitieron verificar la diferenciación del modelo de CTB a STB con un aumento en la expresión sobre las células diferenciadas a STB.

Se estandarizaron las condiciones para la obtención de un modelo in vitro de explantes placentarios por hasta 72 horas de cultivo. Se evidenció que los niveles de LDH fueron más altos en las primeras 2 horas de cultivo lo que reflejó posible daño tisular en proceso de disección y lavado del tejido para la obtención del explante, comparado con los niveles de LDH que reducen en hasta un 50% a las 48h de cultivo.

En la vellosidad se realizó tinción por inmunohistoquímica con el marcador específico de CTB (CK-7) y se evidenció desprendimiento de la monocapa trofoblástica, fenómeno esperado, ya que, durante los primeros tres días de cultivo, la capa sincitial del explante se renueva y reemplaza. La secreción de hCG en cultivos evaluados cada 24 horas evidenció que ésta es más alta en las primeras 24 horas de cultivo comparado con las 48 y 72 horas donde la hCG se mantuvo estable.

Conclusiones preliminares: el modelo de explante vellosito se adapta a las condiciones de cultivo durante las primeras 48 horas. Los resultados de viabilidad celular evaluada por la producción de LDH indica que los explantes son viables durante las 48 y 72 h sugiriendo así que durante este tiempo el tejido es útil para estudiar el impacto de la infección por *Plasmodium falciparum* a nivel funcional y transcripcional.

Perspectivas: continuar réplicas de los ensayos de cultivos con cepas de parásitos adherentes a CSA tanto para BeWo como para explantes.

PALABRAS CLAVE

Malaria en la gestación, placenta, *P. falciparum*, Trofoblasto, marcadores de diagnóstico, marcadores de disfunción.

KEY WORDS

Malaria in pregnancy, placenta, *P. falciparum*, Trophoblast, diagnostic markers, dysfunction markers

BIBLIOGRAFÍA

1. Beeson JG, Rogerson SJ, Cooke BM, Reeder JC, Chai W, Lawson AM, et al. Adhesion of Plasmodium falciparum-infected erythrocytes to hyaluronic acid in placental malaria. Nat Med. 2000;6(1):86-90.
2. Sharma L, Shukla G. Placental Malaria: A New Insight into the Pathophysiology. Front Med (Lausanne). 2017;4:117.
3. Fried M, Duffy PE. Adherence of Plasmodium falciparum to chondroitin sulfate A in the human placenta. Science. 1996;272(5267):1502-4.
4. Gauster M, Siwetz M, Orendi K, Moser G, Desoye G, Huppertz B. Caspases rather than calpains mediate remodelling of the fodrin skeleton during human placental trophoblast fusion. Cell Death Differ. 2010;17(2):336-45.
5. Ander SE, Diamond MS, Coyne CB. Immune responses at the maternal-fetal interface. Sci Immunol. 2019;4(31).
6. Arora N, Sadovskiy Y, Dermody TS, Coyne CB. Microbial Vertical Transmission during Human Pregnancy. Cell Host Microbe. 2017;21(5):561-7.
7. Ataíde R, Murillo O, Dombrowski JG, Souza RM, Lima FA, Lima GF, et al. Malaria in Pregnancy Interacts with and Alters the Angiogenic Profiles of the Placenta. PLoS Negl Trop Dis. 2015;9(6):e0003824.
8. Boeuf P, Aitken EH, Chandrasiri U, Chua CL, McInerney B, McQuade L, et al. Plasmodium falciparum malaria elicits inflammatory responses that dysregulate placental amino acid transport. PLoS Pathog. 2013;9(2):e1003153.
9. Steketee RW, Wirima JJ, Hightower AW, Slutsker L, Heymann DL, Breman JG. The effect of malaria and malaria prevention in pregnancy on offspring birthweight, prematurity, and intrauterine growth retardation in rural Malawi. Am J Trop Med Hyg. 1996;55(1 Suppl):33-41.
10. Fried M, Kurtis JD, Swihart B, Pond-Tor S, Barry A, Sidibe Y, et al. Systemic Inflammatory Response to Malaria During Pregnancy Is Associated With Pregnancy Loss and Preterm Delivery. Clin Infect Dis. 2017;65(10):1729-35.

11. McDonald CR, Weckman AM, Conroy AL, Olwoch P, Natureeba P, Kamya MR, et al. Systemic inflammation is associated with malaria and preterm birth in women living with HIV on antiretrovirals and cotrimoxazole. *Sci Rep*. 2019;9(1):6758.
12. Silver KL, Conroy AL, Leke RG, Leke RJ, Gwanmesia P, Molyneux ME, et al. Circulating soluble endoglin levels in pregnant women in Cameroon and Malawi—associations with placental malaria and fetal growth restriction. *PLoS One*. 2011;6(9):e24985.
13. Boeuf P, Aitken EH, Chandrasiri U, Chua CL, McInerney B, McQuade L, et al. Plasmodium falciparum malaria elicits inflammatory responses that dysregulate placental amino acid transport. *PLoS Pathog*. 2013;9(2):e1003153.
14. Ismail MR, Ordi J, Menendez C, Ventura PJ, Aponte JJ, Kahigwa E, et al. Placental pathology in malaria: a histological, immunohistochemical, and quantitative study. *Hum Pathol*. 2000;31(1):85-93.