

UNIVERSIDAD PERUANA
CAYETANO HEREDIA

IDENTIFICACIÓN DE MICRORNAS COMO POTENCIALES BIOMARCADORES EN LA TRANSMISIÓN CONGÉNITA DE CHAGAS EN MADRES DEL HOSPITAL PERCY BOLAND, BOLIVIA

TESIS PARA OPTAR EL GRADO DE MAESTRA EN BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR

ANDREA JACKELINE DIESTRA CALDERON

LIMA - PERÚ

2026

ASESORA

PhD. MONICA JEHNNY PAJUELO TRAVEZAÑO

JURADO DE TESIS

DRA. DIONICIA BAZILIZA GAMBOA VILELA

PRESIDENTE

DR. HOLGER MAITA MALPARTIDA

VOCAL

DR. JORGE LUIS AREVALO ZELADA

SECRETARIO

DEDICATORIA

A mis padres, por ser apoyo, inspiración y guía en este camino. Por brindarme los valores y herramientas por las cuales hoy soy quien soy, apoyar mis decisiones, por creer en mí y en mis cualidades.

AGRADECIMIENTOS

A Dios, a mis padres, mis profesores de maestría por transmitirme sus conocimientos, al equipo de los Laboratorios de Investigación en Enfermedades Infecciosas a cargo del Dr. Gilman, a ProCiencia por el financiamiento otorgado, a la Dra. Bowman, PI del proyecto madre del cual se obtuvieron las muestras y los datos utilizados, asimismo a mi asesora y al Laboratorio de Microbiología Molecular por su apoyo en el desarrollo de esta tesis.

FUENTES DE FINANCIAMIENTO

Este trabajo fue financiado por el Consejo Nacional de Ciencia, Tecnología e Innovación Tecnológica (CONCYTEC) y el Programa Nacional de Investigación Científica y Estudios Avanzados (PROCIENCIA) en el marco del concurso "E041-2023-01 Proyectos de Investigación Básica" PE501083188-2023, y el 3R01AI151295-04S1 NIH grant.

UNIVERSIDAD PERUANA
CAYETANO HEREDIA

DECLARACIÓN DE ORIGINALIDAD

Los egresados:

N°	APELLIDOS Y NOMBRES
1.	DIESTRA CALDERON ANDREA JACKELINE

Pertenecientes al programa de la **MAESTRÍA EN BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR**, autores del trabajo titulado: **IDENTIFICACIÓN DE MICRORNAS COMO POTENCIALES BIOMARCADORES EN LA TRANSMISIÓN CONGÉNITA DE CHAGAS EN MADRES DEL HOSPITAL PERCY BOLAND, BOLIVIA**, el cual ha sido elaborado, sustentado y aprobado, según corresponda, para optar por el grado de **MAESTRA EN BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR** bajo la modalidad de **TESIS**.

En calidad de docentes asesores de la Universidad Peruana Cayetano Heredia:

N°	APELLIDOS Y NOMBRES DEL DOCENTE	FACULTAD	NIVEL DE ASESORÍA
1.	PAJUELO TRAVEZAÑO MONICA JEHNNY	FACI	ASESOR

Declaramos que el contenido del presente documento es original y que las citas y referencias a otros autores cumplen con las normas académicas establecidas. En ese sentido, hacemos constar que:

- El documento presenta un porcentaje de similitud de **9%**, según el reporte emitido por el software **Turnitin®** (identificador de entrega: **3091544581**; fecha de entrega: **16-11-2026**).
- Tras una revisión detallada del reporte y del contenido del trabajo en cuestión, no se han identificado indicios de plagio.
- Se certifica que el documento respeta los principios de integridad académica y cumple con los requisitos institucionales de originalidad.

Lugar y fecha: **Lima, 16 de noviembre de 2026**



Firma del asesor
N° DNI: 10518111
ORCID: 0000-0003-3662-2250

ÍNDICE

RESUMEN
ABSTRACT

I) INTRODUCCIÓN 1

II) OBJETIVOS 8

III) MARCO TEORICO 9

IV) METODOLOGIA 32

V) RESULTADOS 46

VI) DISCUSIÓN 71

VII) CONCLUSIONES 89

VIII) REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS 90

RESUMEN

La enfermedad de Chagas, causada por *Trypanosoma cruzi*, es un problema de salud pública donde la transmisión congénita es un mecanismo clave de dispersión. A pesar de su relevancia, los mecanismos moleculares implicados en la infección vertical no se comprenden completamente. Los microARNs (miARNs) participan en procesos celulares esenciales regulando la expresión génica postranscripcional. El presente estudio identificó miARNs placentarios relacionados a la transmisión congénita de Chagas mediante un análisis exploratorio de secuenciación de small RNAs (smallRNA-Seq) en placentas de madres infectadas (transmisoras y no transmisoras). Se identificaron 403 miARNs comunes y 38 diferencialmente expresados ($p < 0.05$) mediante DESeq2. Posteriormente, un subconjunto de candidatos fue evaluado por RT-qPCR para su confirmación técnica ($n = 14$).

Los resultados cuantitativos evidenciaron la robustez del perfil molecular validado en el tejido. El candidato hsa-miR-193a-5p mostró una sobreexpresión estadísticamente significativa en el grupo transmisor, registrando un Fold Change de 6.50 ($p = 0.012$). Asimismo, se identificó una marcada tendencia al incremento en hsa-miR-187-3p (Fold Change = 3.62; $p = 0.059$). Adicionalmente, el análisis de Spearman demostró una sólida consistencia interplataforma global entre la secuenciación y la RT-qPCR ($\rho = 0.783$; $p = 0.012$). Estos hallazgos revelan una alteración coordinada en los mecanismos inmunológicos y estructurales de la placenta ante la invasión parasitaria, aportando nueva evidencia sobre los mecanismos moleculares asociados a la transmisión de Chagas Congénito.

Palabras clave: Enfermedad de Chagas, *Trypanosoma cruzi*, transmisión congénita, placenta, microARNs, RT-qPCR.

ABSTRACT

Chagas disease, caused by *Trypanosoma cruzi*, is a public health problem in which congenital transmission is a key mechanism of spread. Despite its significance, the molecular mechanisms involved in vertical transmission are not fully understood. MicroRNAs (miRNAs) participate in essential cellular processes by regulating post-transcriptional gene expression. The present study identified placental miRNAs associated with congenital transmission of Chagas disease through an exploratory small RNA sequencing (smallRNA-Seq) analysis of placentas from infected mothers (transmitters and non-transmitters). A total of 403 common miRNAs and 38 differentially expressed miRNAs ($p < 0.05$) were identified using DESeq2. Subsequently, a subset of candidates was evaluated by RT-qPCR for technical confirmation ($n = 14$).

The quantitative results demonstrated the robustness of the molecular profile validated in the tissue. The candidate hsa-miR-193a-5p showed statistically significant overexpression in the transmission group, with a fold change of 6.50 ($p = 0.012$). Likewise, a marked upward trend was identified for hsa-miR-187-3p (fold change = 3.62; $p = 0.059$). Furthermore, Spearman's correlation analysis demonstrated strong overall cross-platform consistency between sequencing and RT-qPCR ($\rho = 0.783$; $p = 0.012$). These findings reveal a coordinated alteration in the placenta's immunological and structural mechanisms in response to parasitic invasion, providing new evidence on the molecular mechanisms associated with the transmission of congenital Chagas disease.

Keywords: Chagas disease, *Trypanosoma cruzi*, congenital transmission, placenta, microRNAs, RT-qPCR.

I) INTRODUCCIÓN

La enfermedad de Chagas, causada por el protozoo hemoflagelado *Trypanosoma cruzi*, constituye una de las parasitosis más relevantes de América Latina y un problema emergente de salud pública a nivel global. Se estima que entre 6 y 7 millones de personas se encuentran infectadas en el mundo, con una carga significativa concentrada en países como Bolivia y Perú, donde la prevalencia sigue siendo elevada, particularmente en poblaciones rurales y vulnerables. La enfermedad se caracteriza por una fase aguda generalmente paucisintomática, seguida de un prolongado periodo indeterminado, que puede evolucionar hacia formas crónicas severas, principalmente cardiopatía y trastornos digestivos, años o décadas después de la infección inicial (Rassi *et al*., 2010).

Un aspecto crítico del Chagas congénito es que la mayoría de los recién nacidos infectados son asintomáticos al nacimiento, lo que dificulta su detección clínica temprana. Sin embargo, cuando la infección no es diagnosticada y tratada oportunamente, estos niños pueden evolucionar hacia la fase crónica de la enfermedad, con las mismas complicaciones severas observadas en adultos (Carlier *et al*., 2011) . En este contexto, el diagnóstico precoz cobra especial importancia, ya que múltiples estudios han demostrado que el tratamiento antiparasitario con benznidazol o nifurtimox durante el primer año de vida alcanza tasas de curación superiores al 90%, e incluso cercanas al 100% en algunos reportes, con una excelente tolerancia al tratamiento (Carlier *et al*., 2019; Sosa-Estani & Segura,

2006). Esta evidencia posiciona al Chagas congénito como una de las pocas formas de la enfermedad potencialmente curables si se detecta de manera temprana.

El proceso de transmisión congénita de *T. cruzi* implica una compleja interacción entre el parásito y la madre. La placenta constituye la principal barrera de defensa fetal frente a patógenos, integrando mecanismos físicos, como el sincitiotrofoblasto y su citoesqueleto de actina, y mecanismos inmunológicos locales, incluyendo la producción de citoquinas, quimioquinas y péptidos antimicrobianos (Mor & Cardenas, 2010). No obstante, *T. cruzi* ha demostrado una notable capacidad para evadir estas defensas, induciendo procesos como inflamación crónica, estrés celular y apoptosis en células del trofoblasto, lo que facilitaría su paso transplacentario (Kemmerling *et al*., 2019; Medina *et al*., 2022). A pesar de estos avances, los mecanismos moleculares que determinan por qué alrededor del 5% de madres infectadas transmite el parásito a su descendencia permanecen insuficientemente caracterizados (Rodriguez etal, 2025).

En este escenario, los microARNs (miARNs) han emergido como reguladores clave de la expresión génica y de la homeostasis celular. Los miARNs son pequeñas moléculas de ARN no codificante de aproximadamente 17–24 nucleótidos que actúan principalmente a nivel postranscripcional mediante su unión al extremo 3’UTR de los ARNs mensajeros, modulando su estabilidad o traducción. Lejos de actuar de manera aislada, los miARNs forman redes regulatorias complejas capaces de influir simultáneamente en múltiples vías biológicas, incluyendo diferenciación celular, proliferación, apoptosis, angiogénesis y respuesta inmune (Bartel, 2009);

(He & Hannon, 2004). En la placenta, ciertos clústeres específicos de miARNs, como el clúster C19MC, desempeñan un rol central en el desarrollo trofoblástico y en la respuesta frente a infecciones.

Diversos estudios han explorado el papel de los miARNs en el contexto de la infección por *T. cruzi* en modelos experimentales. En particular, investigaciones basadas en explantes placentarios humanos infectados *ex vivo* han demostrado que *T. cruzi* induce perfiles específicos de miARNs asociados a procesos de diferenciación trofoblástica, apoptosis y señalización inflamatoria, incluyendo miARNs del clúster C19MC como hsa-miR-512-3p, hsa-miR-515 y hsa-miR-526 (Medina *et al*., 2020; Medina *et al*., 2022; Guerrero-Muñoz *et al*., 2023). Asimismo, los miARNs que se expresaron diferencialmente frente a la infección por *T. cruzi* se identificaron en otras enfermedades de transmisión congénita como Toxoplasmosis. Un estudio posterior confirmó que la expresion diferencial de microARNs se debe también a la presencia de *T. cruzi*, se encontró un aumento de expresión de hsa-miR- 512-3p en presencia de *T. cruzi*, hsa-miR-512-3p tiene como target a c-FLIP (cellular FLICE-like inhibitory protein), un inhibidor de la caspasa 8, desencadenando un ambiente apoptico en las células del trofoblasto de los explantes de placenta infectados. Estos estudios han sido fundamentales para establecer una base mecanística, pero presentan limitaciones inherentes, como el uso de infecciones de corta duración, condiciones experimentales controladas y un número reducido de muestras, lo que restringe su extrapolación al contexto fisiológico de la infección natural durante el embarazo.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La enfermedad de Chagas, ocasionada por el parásito *Trypanosoma cruzi*, es una enfermedad con alta prevalencia en Latinoamérica, donde viven aproximadamente 65-120 millones en riesgo de infección, de las cuales aproximadamente 6-7 millones están infectados. En Perú, se reportan 0.06 casos nuevos por cada 100 mil habitantes al año (siendo las zonas rurales donde vive el vector, *Triatoma infestans*); mientras que en Bolivia, la incidencia es de 0.25 casos por cada 100 mil habitantes por año. Debido a la alta tasa migratoria de mujeres con la infección latente, la transmisión congénita ha tomado gran relevancia. La transmisión congénita de la enfermedad de Chagas se describe como un evento de poca ocurrencia, con una tasa de 6-7% en Latinoamérica. Se calcula que el 5% de las madres infectadas transmiten la infección al bebé, esto se debe a factores internos o externos, como edad gestacional, carga parasitaria y ubicación geográfica. Aproximadamente un 70% de los bebés infectados nacen sin manifestaciones clínicas y el otro porcentaje presenta APGAR bajo, menor peso al nacer y signos de insuficiencia hepática. Además, el porcentaje que no manifiesta signos clínicos al momento de nacer desarrolla alguna enfermedad discapacitante más adelante, lo que afectaría su calidad de vida individual, familiar y de la comunidad en general. Existe un tratamiento disponible para el recién nacido infectado y consta de Benznidazol y Nifurtimox, a dosis de 5 – 7 mg/Kg y 8 -15 mg/Kg, respectivamente, dependiendo de la edad, por un periodo de 2 meses. Este tratamiento tiene un 100% de efectividad si se aplica antes del primer año de vida; sin embargo, debido a su relativa baja frecuencia, principalmente en zonas no endémicas, la detección de Chagas en

recién nacidos no es un procedimiento de rutina y/o no existen programas para el control de esta enfermedad congénita. Asimismo, los procedimientos para la detección de Chagas en recién nacidos con sospecha de transmisión vertical se basan en métodos escalonados de observación directa, serología y qPCR que se extienden hasta 6 meses para un descarte total de la enfermedad en el bebé, lo que hace el tamizaje muy difícil.

En este marco, resulta importante considerar alternativas viables que orienten los esfuerzos hacia una detección oportuna de la infección, a partir de un mejor entendimiento de los mecanismos moleculares involucrados en la transmisión de Chagas congénito. El estudio de mecanismos de la regulación génica cumple un papel clave para este propósito. Dentro de estos, el estudio del perfil global de expresión de miARNs en placentas infectadas naturalmente, diferenciando casos con y sin transmisión congénita, brindaría información relevante para avanzar en la comprensión de los mecanismos moleculares involucrados en este proceso. La identificación de miARNs diferencialmente expresados en este contexto no solo contribuiría a esclarecer la biología de la interacción *T. cruzi*–placenta, sino que también podría abrir nuevas perspectivas para el desarrollo de biomarcadores tempranos de riesgo de transmisión congénita y estrategias de intervención más efectivas.

PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿Qué miARNs placentarios diferencialmente expresados pueden ser identificados como potenciales biomarcadores de la transmisión congénita de Chagas en madres atendidas en el Hospital Percy Boland, Bolivia?

JUSTIFICACIÓN

La enfermedad de Chagas continúa siendo un importante problema de salud pública en América Latina, particularmente en países endémicos como Perú y Bolivia. Si bien las estrategias de control vectorial han logrado reducir de manera significativa la transmisión por esta vía, la transmisión congénita se ha consolidado como una de las principales formas de diseminación hacia regiones no endémicas. Este escenario adquiere especial relevancia clínica y epidemiológica debido a que una proporción considerable de los recién nacidos infectados cursa de manera asintomática, dificultando su diagnóstico temprano y favoreciendo la progresión hacia formas crónicas de la enfermedad en ausencia de tratamiento oportuno.

Los miARNs actúan como reguladores clave de la expresión génica y moduladores de múltiples procesos biológicos relevantes en la biología placentaria. Estudios previos han demostrado que la infección por *T. cruzi* es capaz de alterar la expresión de miARNs en modelos experimentales basados en líneas celulares y explantes placentarios humanos infectados *ex vivo*. No obstante, estos modelos presentan

limitaciones al no reproducir completamente el contexto fisiológico de la infección natural durante el embarazo ni el proceso de transmisión congénita de *T. cruzi*, estudiando la infección y no la transmisión congénita de la enfermedad.

En este sentido, es necesario caracterizar el perfil de expresión de miARNs en placentas infectadas de manera natural, diferenciando casos con y sin transmisión congénita. El análisis comparativo de estos perfiles permite identificar microARNs diferencialmente expresados potencialmente involucrados en los mecanismos que facilitan el paso transplacentario del parásito. Asimismo, la integración de estos hallazgos con información funcional disponible contribuirá a sentar las bases para la identificación de biomarcadores moleculares involucrados en la transmisión congénita, con potencial aplicación en el diagnóstico temprano y la toma de decisiones clínicas orientadas a la prevención y el tratamiento oportuno del Chagas congénito.

II) OBJETIVOS

Identificar miARNs diferencialmente expresados en una cohorte delimitada de tejido placentario, y su potencial valor como biomarcadores de la transmisión congénita de Chagas en madres atendidas en el Hospital Percy Boland, Bolivia.

Objetivos específicos

1. Explorar el perfil de expresión global de miARNs en placentas de madres con *T. cruzi*, comparando el grupo transmisor frente al no transmisor mediante smallRNA-Seq.

2. Identificar mediante análisis bioinformático los miARNs diferencialmente expresados en el grupo transmisor, seleccionando aquellos con una magnitud de cambios significativa ($|\log_2 FC| > 1$, p-value <0.05.

3. Realizar la confirmación técnica de los miARNs candidatos seleccionados en las muestras placentarias empleando RT-qPCR.

III) MARCO TEORICO

Enfermedad de Chagas y la transmisión congénita

Trypanosoma cruzi – Descripción y ciclo de vida

Trypanosoma cruzi (*T. cruzi*), agente parasitario de la Enfermedad de Chagas, es un protozoo flagelado perteneciente al orden Kinetoplastida y a la familia Trypanosomatidae. Se caracteriza por poseer un único flagelo y una mitocondria en la cual el ADN se encuentra organizado en una estructura altamente densa llamada cinetoplasto. Asimismo, cuenta con organelas especializadas importantes para su metabolismo (Zuma *et al*., 2020).

Existen 3 formas morfológicas de *T. cruzi*, entre la cuales se encuentran: Epimastigote, Tripomastigote (metacíclico y no metacíclico) y Amastigote. Los cuales se intercalan durante el ciclo de vida, asegurando la adaptabilidad del parásito.

El ciclo biológico de *T. cruzi* es digenético, en donde participan los insectos Triatominos como vectores y los mamiferos de sangre caliente, incluyendo humanos, como los hospederos; alternando entre formas morfológicas durante el ciclo, reflejando una alta plasticidad biológica y una adaptabilidad que garantiza su éxito como parásito transmisible.

En el vector, *T. cruzi* se encuentra multiplicándose activamente en el intestino medio en forma de epimastigote. Luego, pasan a ser excretados en las heces del

insecto en forma de tripomastigotes metaciclicos, forma infectiva. Al momento de que el vector se está alimentando de la sangre del hospedero, las heces toman contacto con la herida que dejan, permitiendo que los tripomastigotes metaciclicos ingresen el torrente sanguíneo del hospedero, infectando las celulas sanguíneas, para luego multiplicarse en las celulas del hospedero en forma de amastigotes, hasta formar ¨nidos de amastigotes¨ en celulas musculares, o reconvertirse a tripomastigotes para salir a infectar a nuevas células, diseminando la infección a nuevos tejidos. Asimismo, los insectos sanos que ingieren sangre con tripomastigotes, puedes reconvertirlos a epimastigotes en el intestino convirtiendose en nuevos vectores (Telleria & Costales, 2025).

Aspectos epidemiológicos de la transmisión congénita y diversidad de linajes de *Trypanosoma cruzi* en Santa Cruz, Bolivia

A nivel mundial, Bolivia presenta la mayor prevalencia estimada y carga de morbilidad por la enfermedad de Chagas. Aunque clásicamente ha sido catalogada como una patología predominantemente rural, las dinámicas de migración interna de las últimas décadas desde áreas hiperendémicas hacia los principales centros urbanos han transformado su perfil epidemiológico (Azogue *et al*., 1985). En la actualidad, el control sostenido de los vectores domésticos ha provocado que la transmisión vertical o transplacentaria se consolide como la vía principal para la generación de nuevos casos agudos en entornos urbanizados.

El departamento de Santa Cruz representa uno de los focos epidemiológicos más complejos y con mayor concentración de casos del país. Estudios de tamizaje serológico masivo realizados en maternidades públicas de la ciudad de Santa Cruz de la Sierra indican una seroprevalencia de la infección crónica por *T. cruzi* en mujeres embarazadas de entre el 21.8% y el 23.6%. A partir de este grupo de gestantes seropositivas, la tasa registrada de transmisión congénita a los recién nacidos oscila entre el 3.4% y el 4.9% (Salas Clavijo etal., 2012) (Tinajeros F., etal., 2024). En el ámbito de la salud pública regional, el Hospital de la Mujer Dr. Percy Boland funciona como la institución de tercer nivel de referencia para el diagnóstico de la transmisión vertical del oriente Boliviano (Azogue *et al*., 1985). La persistencia de estas tasas en un entorno urbano se explica sustancialmente por la procedencia de las madres, quienes provienen tanto de asentamientos periurbanos vulnerables como de municipios rurales y subregiones hiperendémicas adyacentes del Chaco boliviano, donde la prevalencia en mujeres en edad fértil históricamente alcanza valores significativamente superiores.

Por otra parte, la heterogeneidad en las tasas de transmisión vertical y la variabilidad clínica de la infección están asociadas a la diversidad genética del parásito. *T. cruzi* se subdivide en siete Unidades Discretas de Tipificación (DTUs, clasificadas desde TcI hasta TcVI, incluyendo el linaje TcBat) (Brenière *et al*., 2016) (Zingales, 2018). El análisis de genotipificación directa a partir de muestras de campo colectadas en el departamento de Santa Cruz demuestra que la dinámica biológica de la transmisión transplacentaria está controlada por linajes específicos. Los estudios moleculares ejecutados en binomios madre-hijo revelan que el genotipo híbrido

TcV, un linaje de origen híbrido que surge de los genotipos ancestrales TcII y TcIII, es el linaje dominante y casi exclusivo detectado en los lactantes infectados por vía congénita, mostrando una alta persistencia en la sangre periférica materna (Sánchez L *et al*., 2022). Paralelamente, el linaje ancestral TcI coexiste en la región circulando activamente tanto en vectores silvestres como en infecciones crónicas humanas dentro de los valles interandinos y llanos orientales de Santa Cruz, aunque se detecta con menor frecuencia en los eventos de transmisión vertical exitosa en comparación con TcV (Brenière *et al*., 2016; Sánchez L *et al*., 2022). Las DTUs restantes (como TcII o TcVI) se reportan con un carácter esporádico o bajo la forma de infecciones mixtas, lo que delimita un escenario epidemiológico local donde la interfase materno-fetal interactúa de manera directa con una población parasitaria predominantemente regida por los genotipos TcV y TcI (Sánchez L *et al*., 2022).

Mecanismos ceulares y moleculares del pasaje transplacentario del parásito

La transmisión congénita de *T. cruzi* ocurre como consecuencia del pasaje del parásito desde la circulación materna hacia el compartimento fetal a través de la placenta, un órgano transitorio altamente especializado que actúa como barrera física, inmunológica y metabólica. La transmisión trasplacetaria es un proceso complejo y no completamente comprendido, ya que la infección materna no necesariamente se transmite recién nacido.

Estudios demuestran que *T. cruzi* es capaz de interactuar directamente con distintos tipos celulares placentarios, incluyendo el sincitiotrofoblasto, el citotrofoblasto y

las células del estroma vellositario, donde puede adherirse, invadir y replicarse intracelularmente (Duaso *et al.*, 2010). La invasión celular del parásito involucra la participación de moléculas de superficie parasitarias, como las transialidasas, mucinas y gp85, que median la adhesión celular y la activación de vías de señalización del huésped, incluyendo las cascadas dependientes de Ca^{2+}, MAPK y PI3K/Akt (Andrade & Andrews, 2005).

Asimismo, se ha reportado que *T. cruzi* induce la remodelación de la matriz extracelular mediante la modulación de metaloproteinasas (MMP-2 y MMP-9), así como la alteración de uniones intercelulares, comprometiendo la integridad estructural del tejido placentario y facilitando el pasaje transplacentario (Duaso *et al*., 2011). Sin embargo, la detección del parásito en la placenta no siempre se asocia con transmisión congénita, lo que indica la existencia de mecanismos placentarios de control que limitan la progresión de la infección hacia el feto.

Modulación inume materno-fetal sin y con infección

Durante el embarazo, la interfaz materno-fetal se caracteriza por un estado inmunológico particular que permite la tolerancia al feto semialogénico, sin abolir completamente la capacidad de respuesta frente a patógenos. Este equilibrio se mantiene mediante una regulación precisa de la respuesta inmune innata y adaptativa, con predominio de citoquinas antiinflamatorias, células T reguladoras

(Treg) y mecanismos de control local mediados por el trofoblasto (Mor & Cardenas, 2010).

En el contexto de la infección por *T. cruzi*, la placenta es capaz de activar respuestas inmunes locales que incluyen la expresión de receptores de reconocimiento de patrones (PRRs), como TLR2, TLR4 y TLR9, y la producción de citoquinas proinflamatorias tales como TNF-α, IL-1β, IL-6 e IFN-γ, contribuyendo al control de la replicación parasitaria (Carlier *et al*., 2019). No obstante, una activación excesiva de estas vías inflamatorias puede inducir daño tisular, apoptosis trofoblástica y disrupción de la barrera placentaria.

La variabilidad observada entre madres transmisoras y no transmisoras sugiere diferencias en la regulación de estas respuestas inmunes. Dichas diferencias podrían estar mediadas por mecanismos post-transcripcionales que modulan la expresión de genes clave involucrados en la respuesta inflamatoria, la señalización de interferón y la supervivencia celular.

Expresión de genes placentarios e implicaciones en la transmisión

La placenta presenta un perfil de expresión génica altamente dinámico y específico, estrictamente regulado a lo largo de la gestación, que resulta esencial para el mantenimiento de la homeostasis materno-fetal y para la protección del feto frente a agresiones externas, incluyendo infecciones. Este perfil transcripcional es el

resultado de una regulación múltiple que involucra control transcripcional, epigenético y post-transcripcional, permitiendo una respuesta adaptativa frente a cambios en el microambiente placentario.

Diversos estudios han demostrado que las infecciones congénitas se asocian con alteraciones en la expresión de genes involucrados en la respuesta inmune innata, la angiogénesis, la apoptosis y la integridad de la barrera placentaria (Robbins & Bakardjiev, 2012). En particular, la activación de vías de señalización dependientes de receptores de reconocimiento de patrones (pattern recognition receptors, PRRs), como los receptores tipo Toll (TLR2, TLR4 y TLR9), desempeña un papel central en la detección de componentes microbianos en el interfaz materno-fetal y conduce a la activación de factores de transcripción como NF-κB y AP-1, promoviendo la expresión de citoquinas proinflamatorias (TNF-α, IL1B, IL6) y quimioquinas que participan en el control de patógenos, pero que, cuando se desregulan, pueden promover in estado inflamatorio crónico que compromete y altera de diferenciación y viavilidad del trofoblasto, la remodelación celular y la integridad del sinctiotrofoblasto. (Koga *et al*., 2014). En este contexto, la inflamación placentaria emerge como un factor clave que puede facilitar la disrupción de la barrera materno-fetal y aumentar la probabilidad de transmisión vertical.

La expresión de genes asociados a la angiogénesis y al desarrollo vascular placentario constituye otro eje crítico en la fisiopatología de la transmisión congénita. Factores como VEGFA, su receptor FLT1 (VEGFR1) y ANGPT1 regulan la vasculogénesis, la permeabilidad endotelial y la adecuada perfusión de

las vellosidades corionicas. Alteraciones en estas vías pueden generar hipoxia local, estrés oxidativo y daño tisular, modificando el microambiente placentario de manera que favorezca la invasión tisular o el pasaje transplacentario de patógenos (Burton & Fowden, 2015).

Asimismo, la regulación de la muerte celular programada en el trofoblasto es esencial para el mantenimiento de la arquitectura placentaria. Un desbalance en la expresión de genes proapoptóticos (como BAX y BAK) y antiapoptóticos (como BCL2) ha sido asociado con un aumento de la apoptosis del sincitiotrofoblasto y del citotrofoblasto subyacente. Este fenómeno puede comprometer la continuidad de la barrera placentaria y ha sido documentado en diversas patologías del embarazo, así como en infecciones congénitas, donde se postula como un mecanismo que incrementa la susceptibilidad a la transmisión vertical (Heazell & Crocker, 2008).

miARNs: biogénesis, mecanismos de acción y regulación

Los microARNs (miARNs) constituyen una clase de pequeños ARN no codificantes de aproximadamente 19–24 nucleótidos que regulan la expresión génica a nivel post-transcripcional. Estos reguladores desempeñan un rol fundamental en procesos celulares clave como la proliferación, diferenciación, apoptosis y respuesta inmune. En la placenta, los miARNs participan activamente en la regulación del desarrollo trofoblástico, la angiogénesis y la modulación de la

interacción materno-fetal, y su desregulación ha sido asociada a patologías del embarazo y a infecciones congénitas.

Procesamiento de miARNs (Drosha, Dicer, RISC)

La biogénesis de los miARNs es un proceso altamente regulado que puede ocurrir a través de múltiples vías, las cuales convergen en la generación de miARNs maduros funcionales capaces de incorporarse al complejo de silenciamiento inducido por ARN (RISC) (Ha & Kim, 2014).

La vía canónica, descrita de manera predominante en células de mamíferos, representa el mecanismo mejor caracterizado y el principal responsable de la generación de la mayoría de los miARNs expresados en tejidos humanos (Bartel, 2018). En esta vía, los miARNs se transcriben a partir de loci genomicos específicos, a manera de transcritos primarios largos (pri-miARNs) por la ARN polimerasa II, los cuales presentan estructuras de horquilla características (Lee *et al.*, 2004)**.** En el núcleo, el pri-miARN es procesado por el complejo microprocesador, compuesto por la RNasa III Drosha y su cofactor DGCR8 (DiGeorge syndrome critical region 8), generando un precursor de aproximadamente 70 nucleótidos denominado pre-miARN.

El pre-miARN es exportado al citoplasma mediante el complejo Exportin-5/Ran-GTP, donde es ulteriormente procesado por otra RNasa III, Dicer, en asociación con proteínas accesorias como TRBP (TAR RNA-binding protein). Este

procesamiento da lugar a un dúplex de miARN de doble cadena, del cual una hebra (miARN guía) es incorporada al complejo de silenciamiento inducido por ARN (RNA-induced silencing complex, RISC), cuyo componente catalítico principal es una proteína de la familia Argonauta (principalmente AGO2 en humanos) (Winter *et al*., 2009; Ha & Kim, 2014).

Además de la vía canónica, se han descrito vías no canónicas de biogénesis de miARNs. Entre ellas, destacan los mirtrones, de localización intrónica, cuya formación depende del splicing del pre-mARN y que evitan el procesamiento por Drosha, ingresando directamente a la vía citoplasmática tras su desramificación (Ruby *et al*., 2007).

Otras vías no canónicas incluyen miARNs derivados de pequeños ARN (snoRNA-derived miRNAs), tRNAs y shRNAs endógenos, algunos de los cuales pueden ser procesados de manera independiente de Dicer o con participación directa de AGO2 (Cheloufi *et al*., 2010; Ha & Kim, 2014).

Estas vías alternativas contribuyen a la diversidad del repertorio de pequeños ARN reguladores, sin embargo, la evidencia disponible indica que la mayoría de los miARNs expresados de manera abundante y funcional en tejidos humanos, se generan a través de la vía canónica dependiente de Drosha y Dicer. No obstante, la existencia de vías no canónicas resulta relevante en estudios de expresión diferencial, ya que pueden contribuir a la detección de isoformas específicas de

miARNs y de pequeños ARN reguladores cuya expresión puede verse modulada por condiciones fisiopatológicas, como la infección por *T. cruzi*.

Mecanismo de silenciamiento génico y degradación/represión de mRNAs

Una vez incorporado al complejo RISC, el miARN guía reconoce secuencias complementarias, generalmente localizadas en la región 3’ no traducida (3’UTR) de los mRNAs blanco. La especificidad de esta interacción depende principalmente de la región “semilla/anclaje” del miARN (nucleótidos 2–8), lo que permite que un único miARN regule múltiples mRNAs.

El silenciamiento génico mediado por miARNs puede ocurrir a través de dos mecanismos principales: la represión de la traducción y la desestabilización del mRNA. En células de mamíferos, el mecanismo predominante implica el reclutamiento de complejos de deadenilación (como CCR4-NOT) y decapping, que conducen a la degradación del mRNA. Estos procesos están estrechamente vinculados a la dinámica de los cuerpos citoplasmáticos (P-bodies), donde se concentran componentes del RISC y maquinaria de degradación de ARN.

En el contexto placentario, este control post-transcripcional permite una regulación rápida y fina de genes involucrados en la respuesta inmune innata, la señalización inflamatoria (vías NF-κB y JAK/STAT), la angiogénesis y la apoptosis, procesos que resultan críticos frente a la exposición a patógenos durante la gestación (Bartel, 2018).

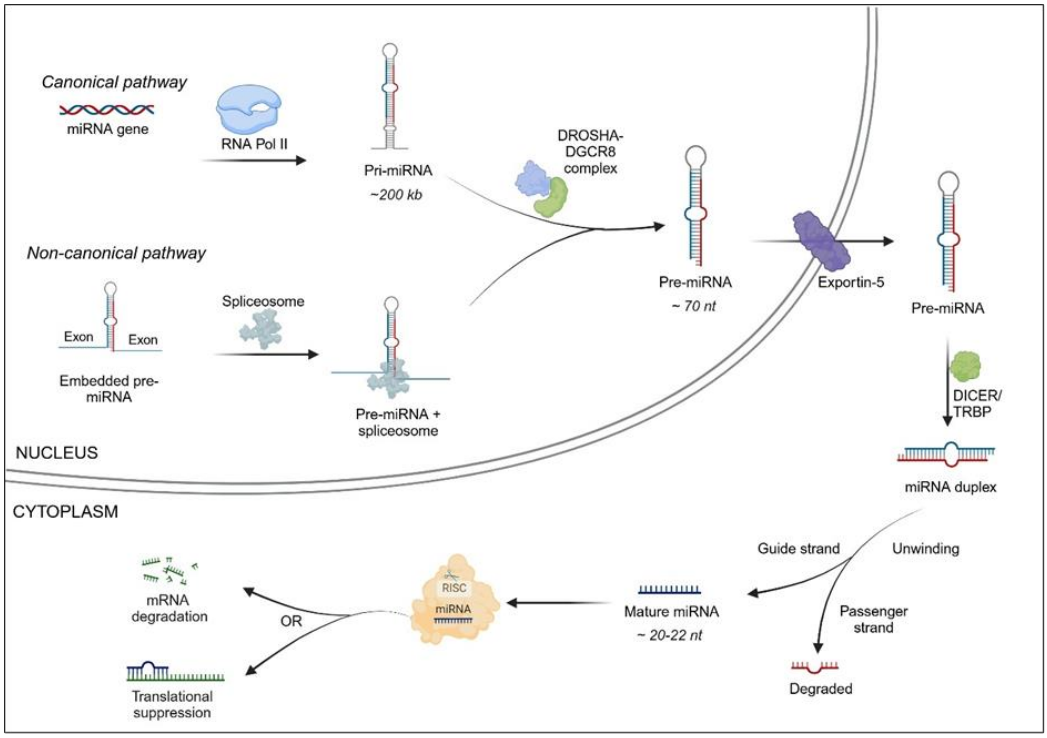

Figura 1. Biogénesis de los microARNs y mecanismo de acción. Se ilustra la vía canónica y no canónica de procesamiento de miARNs, incluyendo la participación de los complejos DROSHA–DGCR8 y DICER–TRBP, así como la formación del complejo RISC y la regulación postranscripcional de los ARNm mediante degradación o represión traduccional.
Fuente: Adaptado de Chemical Abstracts Service (CAS Insights, 2025). Disponible en: https://www.cas.org/es-es/resources/cas-insights/avanzar-en-terapia-con-microARN (consultado el 28 de enero de 2025).

Regulación epigenetica de los miARNs y su retroalimentación en redes génicas

La expresión de los miARNs está determinada por la regulación epigenética de los genes de miARN, entendidos como loci genómicos específicos que se transcriben para generar transcritos primarios de miARN (pri-miARNs) (Bartel, 2009;Ha & Kim, 2014). Estos genes pueden localizarse en regiones intergénicas, con promotores propios, o en regiones intragénicas, principalmente intrónicas, donde

su expresión puede estar acoplada a la del gen huésped (Winter *et al*., 2009). Al igual que los genes codificantes de proteínas, los genes de miARN son transcritos mayoritariamente por la ARN polimerasa II y están sujetos a regulación mediante metilación del ADN, modificaciones postraduccionales de histonas y remodelación de la cromatina (Bartel, 2018). La hipermetilación de regiones promotoras ricas en CpG o la adquisición de marcas represivas como H3K27me3 pueden conducir al silenciamiento transcripcional de pri-miARNs, mientras que marcas activadoras favorecen su expresión (Saito & Jones, 2006).

De manera recíproca, numerosos miARNs regulan directamente la expresión de enzimas epigenéticas clave, incluyendo las ADN metiltransferasas DNMT1, DNMT3A y DNMT3B, histona desacetilasas (HDACs) y componentes de complejos de remodelación de cromatina como PRC2, generando circuitos de retroalimentación que contribuyen a la estabilización de programas transcripcionales específicos del tejido (Fabbri *et al*., 2007).

En la placenta, estos bucles epigenéticos mediados por miARNs participan en el establecimiento de perfiles de expresión génica dependientes del estadio gestacional y del microambiente materno-fetal, y su perturbación por procesos infecciosos puede inducir cambios persistentes en la expresión de miARNs que impactan en la respuesta inmune local y en la integridad de la barrera placentaria (Bartel, 2018).

Relevancia de miARNs en el desarrollo de la placenta y el embarazo y respuesta inmune a infecciones

La placenta presenta perfiles de expresión de miARNs altamente específicos, entre los que destacan clusters placentarios como C19MC y C14MC, cuyos miARNs regulan vías involucradas en señalización PI3K/AKT, TGF-β, Wnt/β-catenina y en la respuesta antiviral e inflamatoria (Morales-Prieto *et al*., 2012). Estos miARNs contribuyen a mantener un equilibrio inmunológico que permite la tolerancia materno-fetal sin comprometer la capacidad de respuesta frente a patógenos.

En el contexto del embarazo, diversos miARNs regulan componentes de la inmunidad innata placentaria, incluyendo receptores tipo Toll (TLR2, TLR4), adaptadores de señalización como MyD88, y factores de transcripción como NF-κB e IRFs, modulando la producción de citoquinas proinflamatorias (TNF-α, IL-6, IL-1β) y la activación de células inmunes residentes. Alteraciones en la expresión de miARNs como hsa-miR-146a, hsa-miR-155 y hsa-miR-21 han sido asociadas a un desbalance inflamatorio placentario y a complicaciones del embarazo, evidenciando su papel crítico en la regulación de la respuesta inmune local (O'Connell *et al*., 2012); (Fu, Brkić, *et al*., 2013).

microARNs y Chagas

La enfermedad de Chagas, causada por el protozoario intracelular *Trypanosoma cruzi*, representa un importante problema de salud pública en América Latina y,

debido a la migración, en regiones no endémicas. En la actualidad, la transmisión congénita constituye una de las principales vías de adquisición de la infección en zonas no endémicas. En los últimos años, estudios en modelos experimentales y en pacientes han demostrado que la infección por *T. cruzi* se asocia con perfiles alterados de miARNs en tejidos cardíacos, células del sistema inmune y en circulación. En este contexto, miARNs como hsa-miR-155, hsa-miR-146a y hsa-miR-21 han sido implicados en la regulación de vías inflamatorias dependientes de NF-κB y TLR, así como en la activación y polarización de macrófagos y linfocitos T durante la infección crónica (Ferreira *et al*., 2017).

Asimismo, se han identificado miARNs asociados a procesos de fibrosis, apoptosis y remodelación tisular en la miocardiopatía chagásica crónica, incluyendo hsa-miR-133a, hsa-miR-30 y hsa-miR-208, los cuales regulan genes vinculados a la organización del citoesqueleto, señalización TGF-β y metabolismo extracelular. Estudios de miARNs circulantes en pacientes con Chagas han sugerido su potencial utilidad como biomarcadores de infección y progresión de la enfermedad, aunque su función causal permanece en investigación.

En los últimos años, algunos estudios han comenzado a explorar el rol de los miARNs en la interacción entre *T. cruzi* y la placenta humana utilizando modelos de infección ex vivo. En particular, la infección de explantes de vellosidades coriónicas humanas con *T. cruzi* induce una respuesta inmune local caracterizada por la modulación diferencial de receptores tipo Toll (TLR2, TLR4 y TLR9) y por cambios en la expresión de citoquinas y quimioquinas, evidenciando que la placenta

es capaz de montar respuestas inmunes específicas frente al parásito (Castillo *et al*., 2017). Posteriormente, Medina *et al*. identificaron que la infección ex vivo de explantes placentarios con *T. cruzi* induce un perfil diferencial de expresión de miARNs en comparación con *Toxoplasma gondii*, afectando miARNs involucrados en la regulación de vías inflamatorias, apoptosis y respuesta inmune innata, incluyendo miARNs previamente asociados a la señalización dependiente de NF-κB y TLR (Medina *et al*., 2020).

En otros estudios, la infección por *T. cruzi* altera la expresión de miARNs específicos codificados en el grupo del cromosoma 19 (Medina *et al*., 2022). Específicamente, el desafío controlado con el parásito induce un incremento en los niveles de hsa-miR-512-3p y una disminución en los de hsa-miR-515-5p (Medina *et al*., 2022). Estos cambios moleculares se correlacionan con variaciones en la expresión de genes diana clave para la homeostasis celular del trofoblasto, como c-FLIP, el factor de transcripción hGCM-1 y la gonadotropina coriónica humana (hCG) (Medina *et al*., 2022). Asimismo, mediante ensayos de transfección empleando imitadores (mimics) y antagonistas (antagomirs), se ha observado que la manipulación de estos miARNs altera el nivel de susceptibilidad del tejido placentario frente a la carga parasitaria en condiciones ex vivo (Medina *et al*., 2022).

Por otra parte, hsa-miR-512-3p participa directamente en los mecanismos de apoptosis tisular bajo este mismo sistema de infección (Guerrero-Muñoz *et al*., 2023). La inhibición dirigida de este miARN mediante el uso de antagomirs

disminuye de manera significativa el aumento en la expresión y en la actividad enzimática de las caspasas ejecutoras e iniciadoras (caspasas 3 y 8), las cuales son típicamente promovidas por la presencia de *T. cruzi* en el tejido trofoblástico (Guerrero-Muñoz *et al*., 2023).

Estos estudios aportan evidencia directa de que *T. cruzi* es capaz de modular la expresión de miARNs en tejido placentario humano y de que dichos miARNs participan en la regulación de la respuesta inmune local frente a la infección. Sin embargo, ambos trabajos se basan en modelos experimentales de infección ex vivo y no evalúan placentas provenientes de embarazos con transmisión congénita confirmada. En consecuencia, si bien demuestran que la infección por *T. cruzi* altera redes regulatorias mediadas por miARNs en la placenta, no permiten establecer si estos cambios están asociados específicamente al riesgo de transmisión vertical o si representan una respuesta general del tejido placentario a la presencia del parásito.

Técnicas moleculares para el estudio de microARNs

El estudio de la expresión de miARNs requiere metodologías altamente sensibles y específicas, capaces de detectar pequeñas variaciones en la abundancia de ARNs pequeños y de discriminar entre secuencias altamente conservadas. En el contexto de la placenta humana, donde coexisten múltiples tipos celulares y donde los cambios en la expresión génica pueden ser sutiles pero biológicamente relevantes,

la elección adecuada de las técnicas moleculares y de los enfoques analíticos resulta crítica para la correcta interpretación de los resultados, asi es cómo se emplean estrategias complementarias que integran aproximaciones de alto rendimiento, análisis bioinformático y validación experimental dirigida.

SmallRNA-seq, qRT-PCR, microarrays: ventajas y limitaciones

El small RNA sequencing (smallRNA-seq) constituye actualmente la técnica de referencia para el análisis global de la expresión de miARNs. Esta metodología permite la detección simultánea de miles de miARNs conocidos y la identificación de miARNs novel, sin depender de sondas o secuencias previamente definidas. Además, ofrece un amplio rango dinámico y una alta sensibilidad, lo que la convierte en una herramienta idónea para estudios exploratorios y comparativos en muestras biológicas complejas, como la placenta (Metzker, 2010; Wang *et al*., 2009).

En contraste, los microarrays de miARNs se basan en la hibridación con sondas específicas, lo que limita su capacidad a miARNs previamente anotados y reduce su sensibilidad para detectar cambios de baja magnitud. Si bien han sido ampliamente utilizados en estudios iniciales de expresión de miARNs, su uso ha sido progresivamente desplazado por tecnologías de secuenciación masiva.

La reacción en cadena de la polimerasa con transcripción reversa cuantitativa (RT-qPCR) representa el método de referencia para validar técnicamente resultados de

alto rendimiento como el secuenciamiento de ARNs pequeños (smallRNA-seq). Esta aproximación permite una cuantificación sensible y específica de miARNs individuales, confirmando cambios de expresión en subconjuntos seleccionados (Mestdagh *et al*., 2009). La metodología se basa en la retrotranscripción específica de miARNs maduros seguida de su amplificación cuantitativa en tiempo real a partir de cantidades limitadas de ARN total. Dado su pequeño tamaño, la RT-qPCR requiere estrategias particulares de diseño, como primers tipo stem-loop o sistemas basados en colas poli(A), que aseguran la discriminación entre miARNs maduros, precursores y secuencias homólogas.

En este ámbito destaca la tecnología de ensayos prediseñados TaqMan® Advanced miRNA Assays (Applied Biosystems). A diferencia de los métodos específicos por diana, este sistema emplea un flujo de retrotranscripción universal para todos los miARNs de la muestra mediante modificaciones terminales paralelas: la adición de una cola poli(A) en el extremo 3' y la ligación de un adaptador flanqueante en el extremo 5'. Esta extensión bicatenaria artificial sirve como sitio de anclaje para un cebador universal, simplificando el proceso molecular. Previo a la PCR en tiempo real, el ADNc se somete a una preamplificación uniforme (ensayo miR-Amp) que eleva el rendimiento en dianas de baja abundancia sin sesgar las proporciones relativas. La detección final utiliza sondas de hidrólisis específicas con tecnología MGB (Minor Groove Binder), garantizando una estricta especificidad frente a secuencias que difieran en un solo nucleótido, con una linealidad metodológica formalmente validada en matrices biológicas (Zoubir *et al*., 2023).

Esta técnica permite cuantificar con precisión diferencias relativas de expresión mediante métodos comparativos y controles endógenos adecuados. En estudios de miARNs, la selección de genes de referencia es crítica, ya que la expresión de pequeños ARN varía según el tejido y la condición experimental. En el contexto placentario, se recomienda validar previamente la estabilidad de los candidatos endógenos detectados por secuenciación antes de usarlos para normalización (Mestdagh *et al*., 2009).

Análisis bioinformático de expresión diferencial de microARNs

El análisis de datos derivados de smallRNA-seq requiere un pipeline bioinformático específico que contemple las particularidades de los miARNs, incluyendo su corta longitud y la alta similitud de secuencia entre miembros de una misma familia. De manera general, el flujo de análisis incluye el control de calidad de lecturas, el recorte de adaptadores, la alineación a genomas de referencia o bases de datos especializadas como miRBase, y la cuantificación de niveles de expresión.

La identificación de miARNs diferencialmente expresados se realiza mediante herramientas estadísticas que modelan la variabilidad biológica y técnica inherente a los datos de secuenciación, como DESeq2 o edgeR, las cuales emplean modelos basados en distribuciones binomiales negativas para estimar cambios de expresión entre grupos experimentales (Love *et al*., 2014). Estos análisis permiten aplicar criterios de selección basados en significancia estadística ajustada por múltiples comparaciones y en la magnitud del cambio de expresión (fold change).

Para la interpretación de los resultados de expresión diferencial es imperativo el uso de la representación gráfica, la cual permite evaluar tanto la calidad global de los datos como la robustez de las diferencias observadas entre condiciones experimentales. Entre las visualizaciones más utilizadas se encuentran los gráficos de componentes principales (PCA) y los análisis de clustering jerárquico (Heatmaps), que permiten explorar la variabilidad global de las muestras y verificar la segregación entre grupos experimentales, así como detectar posibles efectos de lote o muestras atípicas.

Para la identificación de miARNs diferencialmente expresados, los volcano plots constituyen una herramienta ideal, ya que integran en una única representación la significancia estadística y la magnitud del cambio de expresión, facilitando la selección de miARNs con potencial relevancia biológica.

Estas estrategias de visualización han sido ampliamente recomendadas en estudios transcriptómicos y de smallRNA-seq como parte de las buenas prácticas para el análisis de expresión diferencial, ya que contribuyen a una interpretación transparente y reproducible de los datos, asimismo, refuerzan la validez de las conclusiones derivadas del análisis bioinformático (Anders *et al*., 2013; Conesa *et al*., 2016).

Aplicaciones biomedicas de los miARNs

microARNs como biomarcadores diagnósticos o pronósticos en enfermedades infecciosas

Los miARNs han emergido como moléculas de alto interés biomédico debido a su capacidad para reflejar de manera precisa estados fisiológicos y patológicos específicos de tejidos y órganos. En el contexto de enfermedades infecciosas, los perfiles de expresión de miARNs del hospedador se modifican en respuesta a la infección, participando activamente en la regulación de procesos como la respuesta inmune, la inflamación, la apoptosis y la remodelación tisular. Estas características posicionan a los miARNs como potenciales biomarcadores diagnósticos y pronósticos, particularmente cuando son analizados en tejidos directamente involucrados en la interacción hospedador–patógeno.

El análisis de miARNs en tejidos diana ofrece una ventaja fundamental, al permitir capturar de manera directa las alteraciones moleculares asociadas al evento de interés en el microambiente donde ocurren los procesos patogénicos relevantes. En este sentido, la placenta representa un tejido de especial interés en el estudio de infecciones congénitas, dado su rol central como interfaz materno-fetal y como barrera inmunológica activa.

Estudios previos han demostrado que la placenta presenta perfiles específicos de expresión de miARNs que regulan procesos críticos para el mantenimiento del embarazo, incluyendo la diferenciación y fusión del trofoblasto, la angiogénesis, la

apoptosis y la respuesta inmune innata, todos ellos potencialmente relevantes en la transmisión vertical de patógenos (Morales-Prieto *et al*., 2012; Fu, Ye, *et al*., 2013). Bajo este escenario, el estudio de la infección placentaria experimental por *Trypanosoma cruzi* ha evidenciado que el parásito induce una firma de desregulación en miARNs clave del cromosoma 19 (como hsa-miR-512-3p y hsa-miR-515-5p), alterando el recambio del trofoblasto y activando vías de apoptosis celular (Medina *et al*., 2020, 2022; Guerrero-Muñoz *et al*., 2023).

El esclarecimiento de estas fluctuaciones en modelos controlados sustenta el valor predictivo de los miARNs como biomarcadores específicos de daño tisular ante el patógeno asi como su identificación de miARNs identificados en tejidos con infección natural. La caracterización molecular a nivel local abre la posibilidad de proponer perfiles de miARNs específicos como herramientas moleculares de tamizaje de infección por *T. cruzi*. El impacto clínico de su eventual implementación radica en la capacidad de monitorizar de forma no invasiva la integridad de la barrera placentaria durante la gestación, facilitando una detección temprana que permita optimizar la oportunidad del tratamiento antiparasitario en el recién nacido y reducir la morbilidad asociada a la transmisión vertical.

IV)METODOLOGIA

La metodología consta de una primera fase en la cual se obtuvo el protocolo estandarizado para la extracción de ARN a partir de tejidos de placenta pertenecientes a un biobanco de muestras, garantizando obtener la calidad y cantidad óptimas para su analisis por secuenciamiento; seguido por una segunda fase en donde se procesó la data obtenida del secuanciamiento de pequeños fragmentos de ARN (smallRNA-seq) para determinar qué miARNs se encuentran diferencialmente expresados. Posteriormente, se seleccionaron candidatos apropiados para ser verificados experimentalmente y luego se continuó con la etapa de verificación de la expresión de los microARNs seleccionados de acuerdo a un $|\log_2 FC| > 1$ y pvalue < 0.05, utilizando RT-qPCR (Figura 2).

Muestras biológicas

Las muestras de placenta provienen del estudio madre “An integrated approach to understand and diagnose congenital Chagas disease”, y corresponden a mujeres que ingresan en labor de parto en el Hospital de la Mujer “Dr. Percy Boland”, ubicado en la ciudad de Santa Cruz-Bolivia.

El tamaño muestral se estimó considerando tanto la disponibilidad de muestras placentarias de madres con diagnóstico confirmado, como criterios utilizados en estudios previos de perfil de microARNs en placenta humana y en modelos de infección congénita. Adicionalmente, se calculó el tamaño muestral teórico

requerido para detectar cambios en la expresión génica utilizando la ecuación propuesta para diseñar estudios de expresión diferencial y basada en el coeficiente de variación biológica, el nivel de confianza y el poder estadístico (Hart *et al*., 2013). Para el cálculo se consideró un coeficiente de variación de 0.43, un nivel de confianza del 95% y un poder estadístico del 80%. Bajo estos parámetros, el tamaño muestral requerido varió en función del fold change esperado, estimándose un n = 4 para detectar un fold change de 2.76, n = 30 para un fold change de 1.47 y un n = 35 para un fold change de 0.70.

Considerando lo previamente descrito, se evaluaron 12 madres y bebés enrolados divididos en dos grupos de estudio: A) 4 Madres infectadas con bebés infectados y B) 8 Madres infectadas con bebés sanos. Una madre fue considerada como positiva, al presentar dos pruebas serológicas positivas para *T. cruzi*, asimismo una madre transmisora fue considerada si además su bebé presenta un resultado qPCR positivo para *T. cruzi* en sangre de cordón y/o sangre periférica, según disponibilidad de la muestra.

Las muestras de placenta utilizadas en este estudio provinieron del repositorio del proyecto madre, el cual contó con un protocolo originalmente aprobado por el Comité Institucional de Ética en Investigación de la Universidad Peruana Cayetano Heredia (CIEI-UPCH) bajo el código SIDISI N° 207297. El protocolo del presente estudio, parte del proyecto financiado por Prociencia titulado "Exploración del perfil de expresión de microRNAs en la transmisión congénita de Chagas" (SIDISI N° 211311), fue evaluado y aprobado por el CIEI-UPCH bajo la categoría de

revisión expedita. Esta modalidad se aplicó al tratarse de un análisis secundario de muestras biológicas previamente almacenadas y codificadas. Asimismo, el presente estudio se encuentra registrado con codigo SIDISI N° 213005.

La colección y almacenamiento de muestras se mantuvieron de acuerdo al protocolo que establece que se colectaron 0.5 cm^3 de tejido de placenta proveniente de la parte central en la cara fetal de la placenta y se almacenaron en crioviales con RNA Later a -20ºC hasta su uso.

Aislamiento de microARNs

Inicialmente una alícuota de 0.250 cm3 fue lisada empleando el FastPrep (MP Biomedicals, California, EE.UU.) y la matriz de Lisis H (MP Biomedicals, California, EE.UU.), conteniendo en su interior una mezcla de la muestra y el buffer de lisis desnaturalizante incluido en el mirVana™ miRNA Isolation Kit, with phenol (ThermoFisher Scientific). Se procesó a 7 m/s durante 1 minuto, y se centrifugó a 14 000 x g durante 2 minutos a temperatura ambiente.

Los siguientes pasos fueron realizados de acuerdo a las instrucciones del fabricante del kit indicado para ARN total. A fin de verificar que el proceso de aislamiento de los miRNAs se haya realizado adecuadamente, se adicionó un control exógeno correspondiente al miRNA sintético proveniente de *C. elegans* cel-miR-39: 5'UCACCGGGUGUAAAUCAGCUUG3' (Integrated DNA Technologies, Iowa, EE.UU.).

Determinación de la cantidad e integridad de ARN total aislados previo al análisis de smallRNA-seq y RT-qPCR

La determinación de la cantidad de ARN total y miARNs aislados se realizó empleando el fluorometro Qubit 4 (ThermoFisher Scientific). Las mediciones para ARN total y miARNs se obtuvieron utilizando los kits (Qubit RNA BR Assay Kit, ThermoFisher Scientific) y (Qubit microRNA Assay Kit, ThermoFisher Scientific), respectivamente. Las concentraciones se determinaron mediante curvas de calibración de dos puntos (Estándares #1 y #2) provistas en sus respectivos kits, utilizando los algoritmos de interpolación propios del equipo.

La integridad del ARN total fue determinada por la empresa Admera Health (New Jersey, EE.UU) utilizando el Bioanalyzer 2100 Eukaryote Total RNA Nano (Agilent Technologies, CA, USA), interprtando la integridad de acuerdo al score RIN (RNA Integrity Number).

Secuenciamiento, análisis bioinformático y perfilado de microARNs

Las muestras de ARN total que cumplieron con los criterios de calidad e integridad requeridos fueron sometidas a secuenciación masiva de pequeños ARNs (small RNA sequencing). La preparación de librerías y la secuenciación fueron realizadas por la compañía Admera Health (New Jersey, EE.UU.), empleando tecnología Illumina. Para la construcción de las librerías se utilizó el QIAseq miRNA Library Kit (Qiagen, EE.UU.), diseñado para la captura específica y amplificación de microARNs maduros y el secuenciamiento se realizó en el secuenciador Illumina NovaSeq 6000 platform (Illumina, Inc., San Diego, CA, USA) usando la configuración 2 × 50 bp paired-end, alcanzando aproximadamente 20 millones de lecturas (reads) por muestra.

Una vez obtenidos los archivos de secuenciación crudos (raw data), el procesamiento y control de calidad de las lecturas se realizó utilizando la plataforma Galaxy Europe v24.1 (The Galaxy Community, 2024). En primer lugar, se evaluó la calidad de las lecturas mediante FastQC v0.12.1 (Andrews, 2010), considerando como criterio óptimo valores de Phred quality score superiores a 30; no obstante, se aceptaron lecturas con valores ≥28. Posteriormente, se realizó el recorte de adaptadores utilizando Trim Galore v.0.6.10 (Krueger, F.,2015) , empleando las secuencias específicas de adaptadores proporcionadas por el kit de preparación de librerías. La calidad de las lecturas post-recorte fue nuevamente evaluada mediante MultiQC v1.21 (Ewels *et al*., 2016), integrando los reportes de FastQC para confirmar la mejora en los parámetros de calidad tras el procesamiento. Para el

análisis se consideraron exclusivamente las lecturas forward, en concordancia con el diseño de la librería y la naturaleza de los small RNAs .

El mapeo de las lecturas procesadas se llevó a cabo utilizando miRDeep2 Mapper v2.0.1, seguido de la cuantificación mediante miRDeep2 Quantifier v2.0.1 (Friedländer *et al*., 2008), contrastando las secuencias obtenidas con la base de datos de microARNs humanos descargada desde miRBase v22.1 (Kozomara *et al*., 2019), una base de datos pública y curada de microARNs. Como resultado de este procedimiento se generó una matriz de conteos crudos correspondiente a cada miARN identificado en los grupos de estudio.

El análisis estadístico y exploratorio de los datos se realizó en el entorno R (v4.3.3), utilizando RStudio (2024.12.0+467) (Posit Software, PBC, Boston, MA, USA) como interfaz de desarrollo. Inicialmente, los conteos crudos fueron normalizados para corregir diferencias en profundidad de secuenciación entre las muestras, y la distribución de los datos normalizados fue evaluada mediante gráficos de tipo boxplot. Posteriormente, se aplicó una transformación de estabilización de la varianza (variance stabilizing transformation, VST) en DESeq2 (v1.42.1) con fines exploratorios y de visualización, dado que este enfoque permite homogenizar la varianza a lo largo del rango de expresión, adecuado para análisis multivariados y de agrupamiento en datos de smallRNA-seq (Love *et al*., 2014).

Para el control de calidad global, la visualización de la homogeneidad del dataset y el Análisis de componentes principales (PCA), los conteos crudos fueron

normalizados mediante la transformación de estabilización de la varianza (VST) obtenidos a partir del paquete DESeq2 v1.40.0 (Love etal.; 2014), basado en un modelo de distribución binomial negativa. Los componentes principales fueron calculados utilizando la función *promp* y visualizados utilizando ggplot2 (v3.5.2) con el objetivo de explorar patrones de agrupamiento entre las muestras correspondientes a madres transmisoras y no transmisoras. Asimismo, la distribución cualitativa y la superposición de los miARNs detectados entres ambos grupos se determinó mediante la construcción de un diagrama de Venn empleando la librería VennDiagram (v.1.8.2).

Finalmente, para la identificación de miARNs diferencialmente expresados se conservaron para el análisis aquellos microARNs con un conteo promedio mayor a 10 en ambos grupos, con el fin de reducir el ruido asociado a secuencias de muy baja abundancia, un miARN se definió como "Significativamente expresado de forma diferencia" (DEM) si cumplía con los siguientes umbrales biológicos y estadísticos: 1) p-value <0.05, y 2) $|\log_2$ Fold Change$|$ >1, equivalente a un incremento o disminución mínima del doble de la expresión en las placentas de madres no transmisoras. Para evaluar el perfil global y ejecutar el agrupamiento jerarquico bidireccional no supervisado de las muestras y los miARNs, se construyó un mapa de calor (heatmap) con la librería pheatmap v.1.0.13. La métrica de similitud para el armado de los clados en el dendograma se basó en la distancia de correlación de Pearson (1-r) acoplada al metodo de vinculación completa. La visualización de los resultados del análisis de expresión diferencial se realizó

mediante gráficos de tipo volcano plot, utilizando EnhancedVolcano (v1.31.0) (Blighe *et al*., 2024) bajo los criterios diferenciales previamente mencionados.

Los miARNs identificados como diferencialmente expresados (DEM) fueron seleccionados para la verificación de su expresión relativa mediante ensayos de RT-qPCR.

Selección de microARNs de referencia para normalización en RT-qPCR

La normalización adecuada es un paso crítico en los análisis de expresión génica mediante RT-qPCR, ya que permite corregir la variabilidad técnica asociada a diferencias en la cantidad de ARN de partida, eficiencia de retrotranscripción y variaciones instrumentales, garantizando resultados confiables y reproducibles (Peltier & Latham, 2008; Mestdagh *et al*., 2009). En estudios de miARNs, la selección de microARNs de referencia estables resulta particularmente desafiante, dado que muchos de ellos pueden verse afectados por el contexto fisiopatológico analizado.

La selección de miARNs de referencia se realizó a partir de los datos obtenidos por smallRNA-seq y el análisis de expresión diferencial y luego se consolidó en base al análisis de los valores de Cq obtenidos mediante RT-qPCR. Inicialmente, se identificaron aquellos miARNs que no presentaron diferencias significativas de expresión entre los grupos de madres transmisoras y no transmisoras, seleccionando aquellos con valores de $p > 0.05$ y un $|\log_2 \text{fold change}|$ comprendido entre -0.1 y

0.1. Este enfoque permitió identificar candidatos con expresión estable e independiente del grupo de estudio. Posteriormente, en la fase de verificación técnica, los valores de cuantificación Cq obtenidos por qPCR para los miARNs candidatos fueron analizados utilizando la plataforma online RefFinder (https://www.ciidirsinaloa.com.mx/RefFinder-master/), que integra los algoritmos geNorm, NormFinder y BestKeeper, ampliamente utilizados para la evaluación de estabilidad de genes de referencia en estudios de expresión génica (Vandesompele *et al*., 2002; Andersen *et al*., 2004; Pfaffl *et al*., 2004). Para determinar el número óptimo de miARNs necesarios para una normalización confiable, se utilizó el análisis de variación de pares (Vn/Vn+1) provisto por el algoritmo geNorm. El índice de variación obtenido para la inclusión de un tercer normalizador fue de $V_2/V_3 = 0.170$, valor que se posiciona por encima del umbral de corte recomendado de 0.15 (Vandesompele *et al*., 2002). Asimismo, el valor $V_3/V_4 = 0.10$, se posiciona por debajo del umbral 0.15, evidenciando que la adición de un tercer miARN normalizador aporta una mejora significativa a la estabilidad del factor de cuantificación, determinándose que el uso de la media geométrica de los tres mejores miARNs candidatos es estadísticamente óptimo para la normalización final de los datos.

Verificación técnica de los resultados mediante RT-qPCR

Para la verificación técnica de los resultados mediante RT-qPCR, se evaluó un panel compuesto por 12 miARNs seleccionados bajo una estrategia dual de cribado basada en los criterios de significancia analítica $|\log_2 FC| > 1$ y $p < 0.05$. A partir de

la cohorte actual del estudio se seleccionaron los candidatos hsa-miR-498-3p, hsa-miR-375-3p, hsa-miR-515-5p y hsa-miR-193a-5p, mientras que de la secuenciación global de la cohorte mayor del estudio principal se derivaron hsa-miR-99b-5p, hsa-miR-95-3p, hsa-miR-512-3p, hsa-miR-526b-3p, hsa-miR-187-3p, hsa-miR-410-5p, hsa-miR-155-5p y hsa-miR-455-5p.

El análisis por RT-qPCR de estos blancos se complementó con dos muestras adicionales (1 Transmisora, ID 366 y 1 No Transmisora, ID 747) recolectadas de forma tardía en la cohorte principal. De este modo, la cohorte evaluada en esta etapa sumó un total de 5 muestras Transmisoras y 9 No Transmisoras, (n=14). Esta cuantificación se ejecutó mediante ensayos individuales de RT-qPCR basados en la tecnología TaqMan® (Applied Biosystems, Massachusetts, EE. UU.), cuyos sistemas prediseñados aseguraron una alta especificidad analítica al integrar en un solo flujo los cebadores de retrotranscripción, los iniciadores de amplificación por PCR y las sondas fluorescentes de diana.

El RNA total utilizado en este estudio provino de una sola extracción, a partir de la cual se envió ARN para secuenciar y se conservó una alicuota para los ensayos de RT- qPCR. La síntesis de DNA complementario (cDNA) se llevó a cabo utilizando el kit TaqMan™ MicroRNA Reverse Transcription Kit, siguiendo estrictamente las instrucciones del fabricante y empleando 1000 ng de RNA total por reacción. Posteriormente, los cDNAs diluidos (1:10) fueron amplificados mediante ensayos prediseñados para cada miARN en el termociclador en tiempo real StepOnePlus®

(Applied Biosystems, Massachusetts, EE. UU.), procesando cada muestra por duplicado técnico.

Para la cuantificación relativa de los miARNs de interés, se aplicó el método de expresión relativa normalizada modificado para múltiples genes de referencia (Vandesompele *et al*., 2002; Pfaffl *et al*., 2001, Bustin, S.A *et al*., 2009). A diferencia del método clásico de Livak ($2^{-\Delta\Delta Cq}$), este enfoque realiza la transformación matemática exponencial individualizada de los datos (2^{-Cq}) asumiendo una eficiencia de amplificación teórica óptima del 100% (E=2). Para cada muestra, los valores de cuantificación (Cq) de cada miARN blanco se transformaron a cantidades lineales y se normalizaron dividiendolos entre el Factor de Normalización (NF). Este NF se calculó de forma personalizada muestra por muestra en base a la media geométrica de las cantidades individuales de los miARNs de referencia seleccionados utilizando la herramienta online RefFinder (Xie *et al*., 2023), cuyo numero se ve sustentado por el el análisis de variación de pares (V_3/V_4). Este procedimiento proporcionó un valor numérico contínuo (valor R) en escala lineal, directamente proporcional a la cantidad de copias iniciales de miARN en cada muestra y óptimo para evitar distorsiones visuales en la dispersión de los boxplot (Schmittgen & Livak, 2008; Vandesompele *et al*., 2002).

La magnitud del cambio de expresión (fold change) entre las condiciones biológicas contrastadas se determinó mediante el cociente de las medias aritméticas de los valores R del grupo de madres transmisoras sobre el grupo de madres no transmisoras (Expresion Promedio T/Expresion Promedio NT). Finalmente, la

inferencia estadística se evaluó mediante la prueba no paramétrica de suma de rangos de Wilcoxon (Mann-Whitney U) para muestras independientes. Se estableció un nivel de significancia estadística con un valor de $p < 0.05$.

Análisis de correlación interplataforma

Con el propósito de evaluar la consistencia técnica y validar la direccionalidad de los perfiles de expresión génica obtenidos, se realizó un análisis de correlación cruzada entre las dos plataformas analíticas utilizadas. Para ello, se contrastaron los valores de cambio de pliegue logarítmico $|\log_2 FC|$ calculados mediante secuenciación masiva (SmallRNA-Seq) frente a los obtenidos por RT-qPCR (n=14) muestras) para los microARNs seleccionados. Previo al análisis, se verificó la naturaleza de la distribución de las variables; debido al tamaño de la muestra y al uso de estadística basada en rangos en las fases experimentales previas, se empleó la prueba de correlación no paramétrica de Spearman. El valor del coeficiente (rho) de Spearman se utilizó como una medida de la fuerza y dirección de la asociación lineal entre los niveles de expresión de ambas plataformas, donde valores próximos a +1 indicaron una concordancia positiva perfecta en la magnitud y tendencia del cambio biológico. El cálculo de este coeficiente y su respectivo valor de significancia estadística (\(p\)) se ejecutó en el entorno R (v4.3.3), utilizando RStudio (2024.12.0+467) (Posit Software, PBC, Boston, MA, USA), empleando los paquetes informáticos readxl para la unificación de las matrices de datos y ggplot2 junto con ggrepel para la estructuración y renderizado del gráfico de

dispersión bidimensional. Se consideró un nivel de confianza del 95%, fijando el umbral de significancia en valores de ($p < 0.05$).

Análisis descritpivo

Se realizó un análisis descriptivo para caracterizar la muestra de madres transmisoras y no transmisoras. Las variables cuantitativas, dada su naturaleza y distribución, se presentan como mediana y rango intercuartílico [RIC]. Por su parte, las variables categóricas se expresan mediante frecuencias absolutas y porcentajes (%). La carga parasitaria de *T. cruzi* en la sagre de cordón y sangre perifñerica del bebé se cuantificó y reportó en parásitos por mililitro (par/mL). En los casos donde la información no estuvo consignada en las historias clínicas, se reportó como 'No data'. Todas las madres fueron exitosamente categorizadas de acuerdo a los criterios de inclusión.

Los análisis se ejecutaron utilizando el software R (v4.3.3), considerando la distribución de la cohorte evaluada. Para evaluar las diferencias de expresión entre madres transmisoras y no transmisoras, se utilizó la Prueba de suma de rangos de Wilcoxon no paramétrica para muestras independientes, dado el tamaño muestral ($n=12$) y la distribución no normal de los datos. Se consideró un nivel de significancia estadística de $p < 0.05$. Los resultados fueron representados mediante gráficos de barras que reflejan la expresión relativa de cada microARN en los grupos analizados.

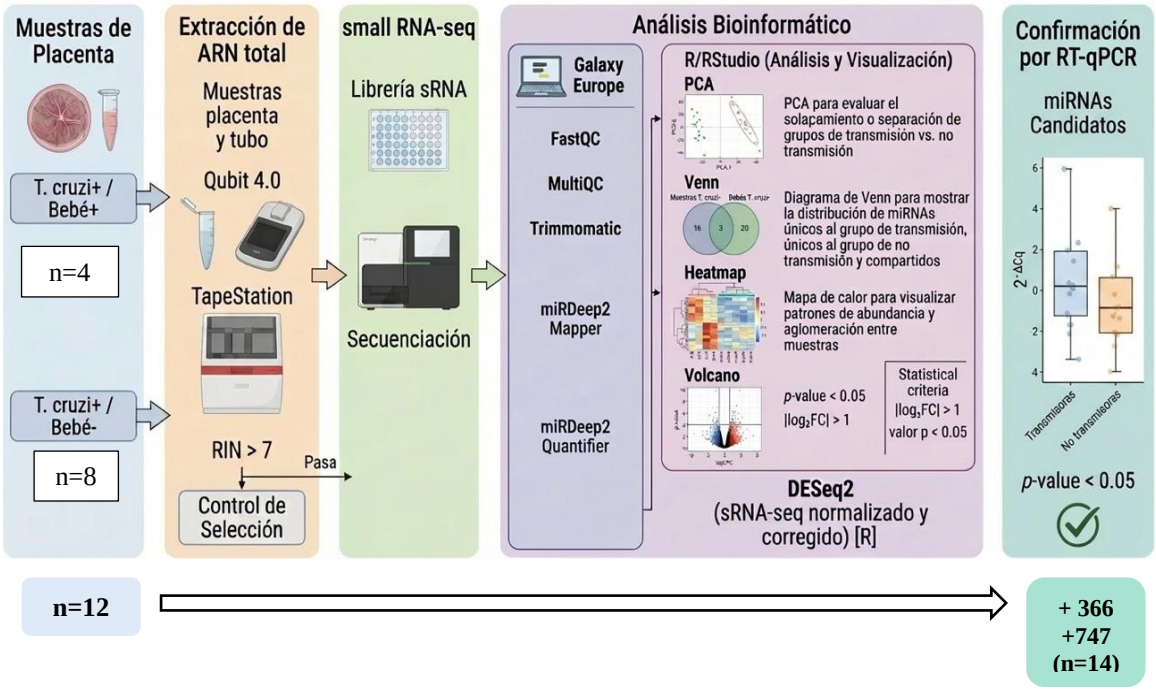

Figura 2. Flujo metodológico para la identificación de microARNs candidatos asociados a la transmisión congénita de *Trypanosoma cruzi*. Se analizaron muestras de placenta central de madres seropositivas para *T. cruzi*, clasificadas en transmisoras y no transmisoras. Tras la extracción y control de calidad del ARN total, se realizó secuenciación de small RNA, procesamiento bioinformático en Galaxy Europe y análisis de datos en R/RStudio. Los miARNs candidatos se confirmaron por RT-qPCR y se compararon entre grupos mediante boxplots de $2^{-\Delta Cq}$. Fuente: Elaboración propia.

V) RESULTADOS

Características de la población de estudio

En el presente estudio se incluyeron 12 madres reclutadas en el Hospital Materno Percy Boland, las cuales fueron clasificadas en madres transmisoras (n = 4) y madres no transmisoras (n = 8) (Tabla 1). A partir de este grupo se obtuvieron las muestras biológicas destinadas a la posterior secuenciación de small-RNAs.

Tabla 1. Características clínicas, obstétricas y de laboratorio de la cohorte de estudio

Variable	No Transmisora	Transmisora
Tamaño de la muestra (n)	8	4
Características Demográficas e Historial Materno		
Edad de la madre (años)	28.0 [27.5 - 29.0]	29.0 [25.2 - 32.5]
Departamento de procedencia		
- Chuquisaca	1 (12.5%)	0 (0.0%)
- Santa Cruz	6 (75.0%)	4 (100.0%)
- Tarija	1 (12.5%)	0 (0.0%)
Número total de embarazos	3.5 [3.0 - 4.0]	3.5 [3.0 - 4.0]
Historial de abortos	0.0 [0.0 - 0.0]	0.0 [0.0 - 0.2]
Resultados de Pruebas de Diagnóstico Materno		
Serología ELISA madre		
- Positivo	8 (100.0%)	4 (100.0%)
Prueba rápida (Rapidtest) madre		
- Positivo	8 (100.0%)	4 (100.0%)
TESA-IgG madre		
- Positivo	8 (100.0%)	4 (100.0%)
Datos del Recién Nacido		
Sexo del recién nacido		
- Femenino	4 (50.0%)	2 (50.0%)
- Masculino	4 (50.0%)	2 (50.0%)
Carga parasitaria en sangre de cordón (parásitos/mL)	0.00 [0.00 - 0.00]	4335.35 [38.03 - 341465.00]
Carga parasitaria en sangre periférica del bebé (parásitos/mL)	0.00 [0.00 - 0.00]	1563.85 [58.28 - 384787.50]

Nota. Las variables continuas se expresan como Mediana [Rango Intercuartílico: Q1 - Q3]. Las variables cualitativas se expresan en frecuencias absolutas y porcentajes n (%).

En lo que respecta a las características demográficas de la cohorte, la mediana de edad de las madres fue de 28.0 años [RIC: 27.5 - 29.0] para el grupo no transmisor y de 29.0 años [RIC: 25.2 - 32.5] para el grupo transmisor, evidenciando una distribución etaria homogénea entre ambos conjuntos. En cuanto a la procedencia geográfica, el departamento de Santa Cruz constituyó el origen predominante de las pacientes, representando el 75% (n = 6) en el grupo no transmisor y el 100.0% (n = 4) en el transmisor. Los casos restantes provinieron de los departamentos de Chuquisaca (n = 1; 12.5%) y Tarija (n = 1; 12.5%), registrándose estos únicamente en el grupo que no evidenció transmisión vertical. Al evaluar los antecedentes ginecoobstétricos, el número total de embarazos previos reflejó una mediana de 3.5 [RIC: 3.0 - 4.0] en las madres no transmisoras y de 3.5 [RIC: 3.0 - 4.0] en las transmisoras. Respecto al historial de abortos espontáneos o inducidos, ambos grupos presentaron una mediana de 0.0, denotando un rango intercuartílico ligeramente superior en el grupo con transmisión vertical [RIC: 0.0 - 0.2]. Por otra parte, el perfil de diagnóstico serológico y molecular materno fue uniforme en la totalidad de la muestra evaluada; el 100% de las madres de ambos grupos presentaron resultados concordantes positivos para las tres pruebas laboratoriales analizadas: Serología ELISA, prueba rápida (Rapidtest) y TESA-IgG. Finalmente, los parámetros clínicos de los recién nacidos mostraron diferencias notables ligadas a la condición de transmisión. En cuanto al sexo de los bebés, se observó una distribución equitativa (50.0% femenino y 50.0% masculino) en el grupo transmisor. La cuantificación de la carga parasitaria mediante PCR en tiempo real arrojó valores de 0.00 parásitos/mL [RIC: 0.00 - 0.00] en todas las matrices del grupo no transmisor. En contraste, los recién nacidos del grupo transmisor

exhibieron niveles de parasitemia elevados y con un amplio rango de dispersión biológica, registrando una mediana de carga parasitaria en sangre de cordón umbilical de 4335.35 parásitos/mL [RIC: 38.03 – 341465.00] y una mediana en sangre periférica del lactante de 1563.85 parásitos/mL [RIC: 58.28 – 384787.50], los valores extremos se deben a la alta carga parasitaria de una de las muestras ID 872, cuyos valores fueron de 1340000 y 1530000 par/mL en sangre de cordón y sangre periférica respectivamente, asimismo, se consideró un recién nacido positivo al tener al menos uno de los resultados postivos para *T. cruzi* en sangre de cordón o sangre periférica.

Calidad e integridad del ARN

La concentración de ARN total mostró una variabilidad considerable entre las muestras analizadas, con valores que oscilaron entre 2.2 ng/µL y 127 ng/µL. La mayoría de las muestras presentó concentraciones superiores a 15 ng/µL, siendo las concentraciones más elevadas observadas en las muestras con ID 729 (127 ng/µL) y 675 (96.8 ng/µL) (Tabla 2)

En cuanto a los miARN, las concentraciones variaron entre 1.57 ng/µL y 28.8 ng/µL. Se observó que la mayoría de las muestras presentó valores comprendidos entre 10 y 20 ng/µL, destacándose la muestra 675, que presentó la mayor concentración de microARN (28.8 ng/µL).

La integridad del ARN, evaluada mediante el RNA Integrity Number (RIN), mostró valores comprendidos entre 5.7 y 9.5. La mayoría de las muestras presentó valores

de RIN ≥ 6.0, considerados aceptables para estudios de secuenciación de pequeños ARN. Las muestras con mayor integridad correspondieron a los IDs 439 (RIN = 9.5), 753 (RIN = 8.5) y 729 (RIN = 8.3), mientras que las menores integridades se observaron en las muestras 872 (RIN = 5.7) y 775 (RIN = 6.1). En general las muestras en su totalidad mantuvieron valores de integridad aceptables para su posterior procesamiento por secuenciamiento. (Tabla 2).

Tabla 2. Concentración de ARN total, fracción de miARN e integridad del ARN (RIN) de las muestras placentarias

ID	Admera Health ID	ARN Total (ng/uL)	miARN (ng/uL)	RIN
439	23111R-04-02	13.7	6.5	9.5
643	23111R-04-03	8.5	1.5	6.2
675	23111R-04-04	96.8	28.8	6.3
872	23111R-04-05	50.7	18.2	5.7
729	23111R-04-06	127.0	19.2	8.3
775	23111R-04-07	79.9	15.5	6.1
753	23111R-04-08	45.4	11.2	8.5
819	23111R-04-09	72.0	13.1	6.7
668	23111R-04-10	2.2	18.1	6.8
705	23111R-04-12	37.3	15.4	7.1
725	23111R-04-13	43.4	17.1	6.0
294	23111R-04-14	17.7	6.5	8.1

Cuantificación fluorométrica e integridad del ARN total extraído de muestras placentarias (n=12). ID e Admera Health ID: codificación interna de pacientes y de procesamiento, respectivamente. ARN Total y miARN: concentraciones en ng/µL. RIN: Número de Integridad del ARN (escala 1-10). Los parámetros confirman la idoneidad preanalítica de las muestras para la síntesis de bibliotecas.

El análisis de integridad del ARN mediante TapeStation mostró perfiles electroforéticos compatibles con ARN de adecuada calidad, la mayoría de las muestras presentó patrones bien definidos de rRNA y una baja degradación,

confirmando su idoneidad para los análisis posteriores de small RNA sequencing y RT-qPCR (Figura 3).

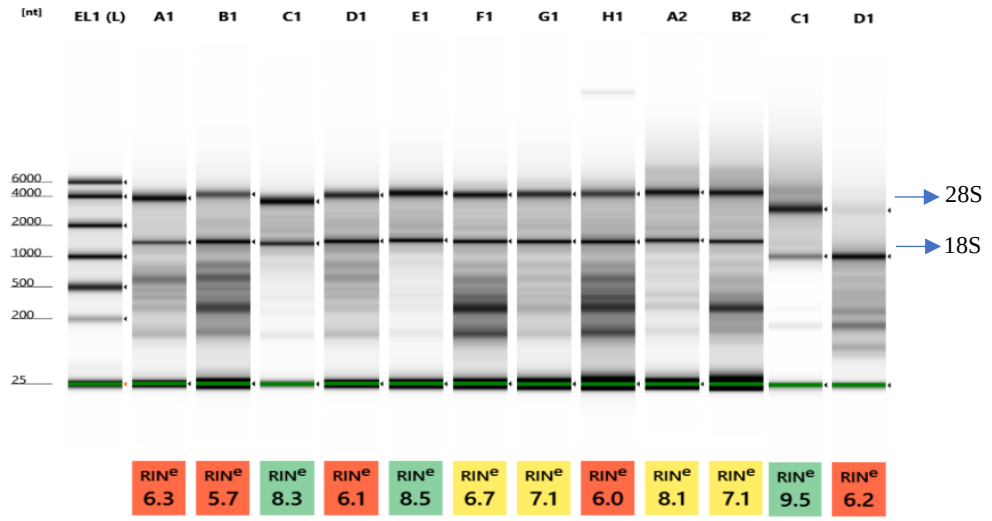

Figura 3. Evaluación de la integridad del ARN total mediante TapeStation. Perfiles electroforéticos digitales previos a la síntesis de librerías, mostrando las bandas de las subunidades ribosomales (rRNA 28S y 18S). En la sección inferior se indican los valores de RIN según el nivel de degradación: rojo (alta, <6.5), amarillo (intermedia, 6.5 a 7.9) y verde (óptima, ≥8.0). La estabilidad del perfil valida las muestras para smallRNA-seq y RT-qPCR.

En el reporte de la calidad de los reads en base al % >= Q30bases (Porcentaje de bases secuenciadas que tienen un phred score mayor a 30), para cada muestra secuenciada, se obtuvo valores entre 71.44 y 81.08, indicando una calidad promedio alta de los reads obtenidos mediante el secuenciamiento (Tabla 3).

Tabla 3. Valores de calidad final de las muestras secuenciadas

Sample	CustomerID	Barcode sequence	PF Clusters	%>= Q30bases
23111R-04-02	439	GAACTGCGTC+TGATCGACAC	13520135	73.96
23111R-04-03	643	TTGCCGGTCA+CTGTGTAGTA	14051541	71.44
23111R-04-04	675	GATGGATCGG+AGTCCACTGT	15579052	77.34
23111R-04-05	872	AACCAACGCT+GTCCATGAGT	15973849	78.34
23111R-04-06	729	TGTTCGAATG+TAGGCGATCG	17456594	79.38
23111R-04-07	775	CCACAACAGC+CGCTGTATAC	18426028	78.51
23111R-04-08	753	ACCTGTTGAA+ACCGCGAGTA	13650620	76.85
23111R-04-09	819	ACTGAGCTGG+TGTACAAGGT	15965528	80.8
23111R-04-10	668	TCTCCATGTT+AGTGAGAGCT	13482218	72.9
23111R-04-12	705	TTATAACGCG+TTGCATGCGG	15867120	81.08
23111R-04-13	725	CTGTAGGAGC+CCGGATGAAC	21914207	78.08
23111R-04-14	294	CTGGATCTAA+GAGGATAGTA	14547535	74

Métricas de rendimiento y calidad técnica de las bibliotecas de secuenciación (n=12). Evaluación realizada por Admera Health. Sample / ID Customer: codificación técnica de las muestras placentarias. Barcode sequence: oligonucleótidos indexadores (multiplexing). PF Clusters: cúmulos absolutos que superaron el filtro de pureza (Passed Filter). % ≥ Q30 bases: porcentaje de nucleótidos con calidad Phred ≥ 30 (99.9% de precisión).

Procesamiento bioinformático y control de calidad de datos de smallRNA-seq

El control de calidad de las lecturas crudas obtenidas mediante small RNA sequencing fue evaluado utilizando la herramienta FastQC, integrando los reportes individuales a través de la plataforma MultiQC para el conjunto total de 12 muestras analizadas.

El análisis de calidad por base (per base sequence quality) generado a partir del análisis de FastQC y resumido mediante MultiQC para las 12 muestras de placenta analizadas. Se muestran los valores promedio del puntaje de calidad Phred a lo largo de la longitud de las lecturas (en pares de bases). La mayor parte de las posiciones

presenta valores de calidad elevados (Q ≥ 30), con una disminución transitoria hacia los extremos distales de las lecturas, característica de bibliotecas de small RNA. Las áreas sombreadas indican los rangos de calidad baja (rojo), intermedia

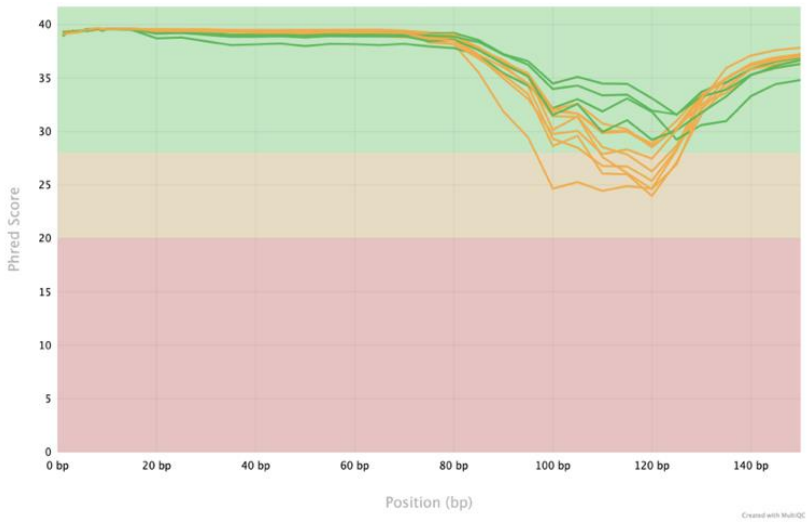

Figura 4. Distribución del puntaje de calidad promedio por posición de base de las lecturas de smallRNA-seq. Control de calidad inicial (Phred score) de las 12 muestras previo al procesamiento bioinformático. Las trazas continuas muestran las curvas de cada biblioteca a lo largo de la lectura (1-50 pb). Las zonas delimitan la calidad según el puntaje Phred: baja (roja, Q < 20), aceptable (amarilla, 20 ≤ Q < 28) y alta (verde, Q ≥ 28), evidenciando un perfil óptimo de secuenciación.

(amarillo) y alta (verde), evidenciando que la mayoría de las lecturas se mantienen dentro de rangos óptimos tras el recorte de adaptadores.

El gráfico de calidad por secuencia (per sequence quality scores) obtenido mediante FastQC y resumido con MultiQC para las 12 muestras analizadas. Se observa que la gran mayoría de las lecturas presentan valores de calidad media concentrados en rangos altos (Q30–Q40), con picos alrededor de Q35–Q38. La baja proporción de lecturas con puntajes de calidad reducidos indica una adecuada calidad global de los datos tras la remoción de adaptadores, confirmando su idoneidad para el mapeo

de secuencias, la cuantificación de miARNs y la posterior generación de matrices de conteo para el análisis de expresión diferencial.

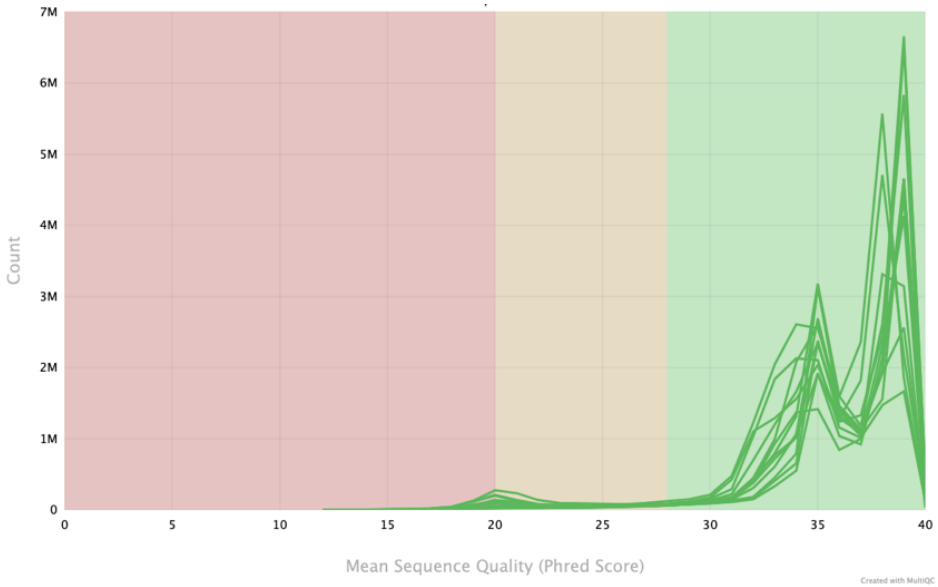

Figura 5. Distribución de la calidad promedio por lectura en datos de smallRNA-seq posterior al recorte de adaptadores. Gráfico de densidad que evalúa la calidad global (Mean Sequence Quality) de las 12 bibliotecas tras el filtrado. El fondo delimita los rangos de confiabilidad técnica (rojo: baja; amarillo: intermedia; verde: alta, Q ≥ 28). Las curvas unimodales muestran un sesgo exclusivo hacia la zona de alta fidelidad técnica (Q > 30), validando el conjunto de datos para análisis de expresión subsiguientes.

Perfil global de expresión de miARNs placentarios

El análisis comparativo del repertorio global de miARNs expresados en placenta evidenció un amplio solapamiento entre los grupos de gestantes transmisoras y no transmisoras. El diagrama de Venn mostró que 403 miARNs fueron detectados de manera común en ambos grupos, lo que sugiere la presencia de un conjunto central de microARNs placentarios con funciones conservadas, probablemente involucrados en procesos fisiológicos esenciales como el desarrollo placentario, la

angiogénesis, la regulación inmunológica y el mantenimiento de la homeostasis materno-fetal.

Adicionalmente, se identificaron 44 microARNs exclusivos del grupo transmisor y 26 miARNs exclusivos del grupo no transmisor, evidenciando diferencias cualitativas en la expresión de miARNs que podrian estar asociadas al estado de transmisión (Figura 6).

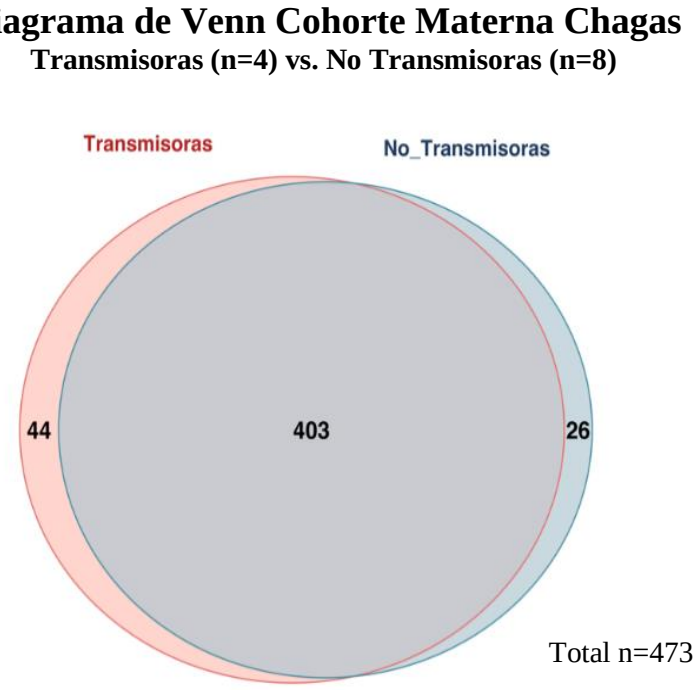

Figura 6. Diagrama de Venn del perfil global de miARNs placentarios detectados por secuenciación. Distribución y superposición de las variables evaluadas en la cohorte materna de Chagas. Los grupos corresponden a Madres Transmisoras (T, rosa, n=4) y Madres No Transmisoras (NT, celeste, n=8). Se detallan los transcritos exclusivos para T (n=44), los exclusivos para NT (n=26) y el núcleo central de miARNs coexpresados en ambas condiciones (n=473).

El análisis de componentes principales (PCA) aplicado al conjunto de datos de expresión de miARNs placentarios permitió evaluar la estructura global de la

variabilidad transcriptómica entre gestantes transmisoras (T) y no transmisoras (NT) (Figura 7). Los dos primeros componentes principales explicaron conjuntamente el 43.2% de la varianza total del sistema, con un 24.4% atribuido al PC1 y un 18.8% al PC2. La proyección de las muestras en el espacio definido por estos componentes reveló una tendencia a la segregación entre ambos grupos, con las muestras del grupo transmisor concentrándose predominantemente en valores negativos del PC1, mientras que las no transmisoras mostraron una distribución más heterogénea y desplazada hacia valores positivos de este componente.

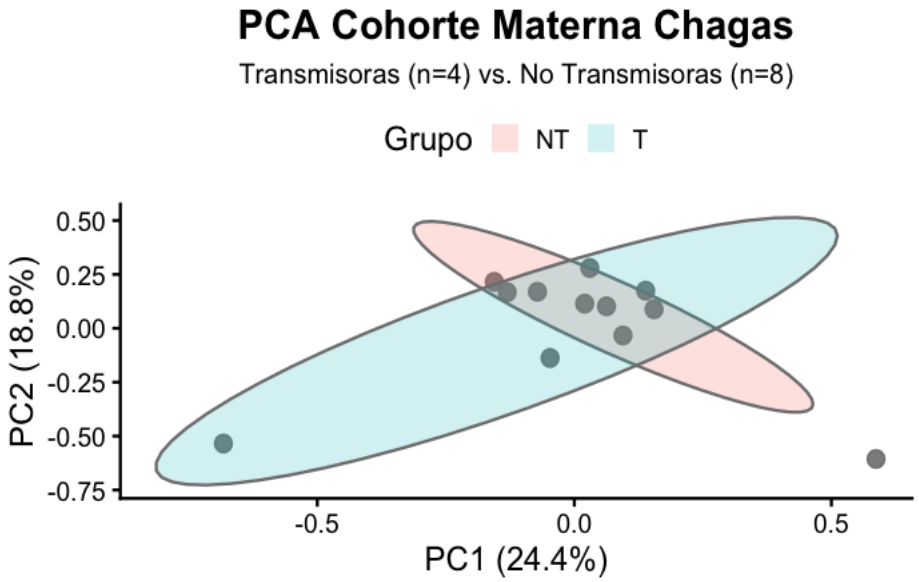

Figura 7. Análisis de componentes principales (PCA) del perfil global de expresión de microARNs placentarios. Ordenación basada en el set de secuenciación de la cohorte materna de Chagas (n=12). Los ejes representan los dos primeros componentes principales (PC1: 24.4%; PC2: 18.8% de varianza explicada), capturando en conjunto el 43.2% de la variabilidad biológica. Cada punto representa el perfil global de una placenta individual: No Transmisoras (NT, rosa, n=8) y Transmisoras (T, celeste, n=4). Las elipses delimitan las áreas de confianza estadística para cada grupo.

Se observa un solapamiento parcial entre las elipses de confianza de ambos grupos, sin embargo, la orientación diferencial de estas y la distribución no aleatoria de las muestras evidencian la existencia de fuentes sistemáticas de variación orientadas a la condicion del estado de transmisión materno-fetal. Estos patrones indican que una fracción relevante de la variabilidad en la expresión global de miARNs que está relacionada con diferencias biológicas entre los grupos de estudio.

Identificación de microARNs diferencialmente expresados

Normalización de los conteos de expresión

Previo al análisis de expresión diferencial, los conteos crudos obtenidos a partir del mapeo y cuantificación fueron normalizados utilizando el método de factores de tamañan (size factors) y la mediana de las razones (median of ratios) implementado en el paquete DESeq2, el cual corrige diferencias asociadas al tamaño de librería y a la profundidad de secuenciación entre muestras dentro del Modelo Lineal Generalizado (MLG).

La inspección visual de los conteos crudos (Figura 8.A) evidenció una marcada heterogeneidad entre muestras, reflejada en medianas desiguales y una elevada dispersión de los valores de expresión, lo que sugiere variabilidad técnica inherente a los datos sin normalizar. Tras la normalización (Figura 8.B), las distribuciones de los conteos log-transformados mostraron medianas alineadas entre todas las muestras y una reducción global de la variabilidad, indicando una adecuada

corrección de sesgos técnicos y una mayor comparabilidad entre perfiles de expresión. Estos datos normalizados constituyeron la base para los análisis posteriores de expresión diferencial.

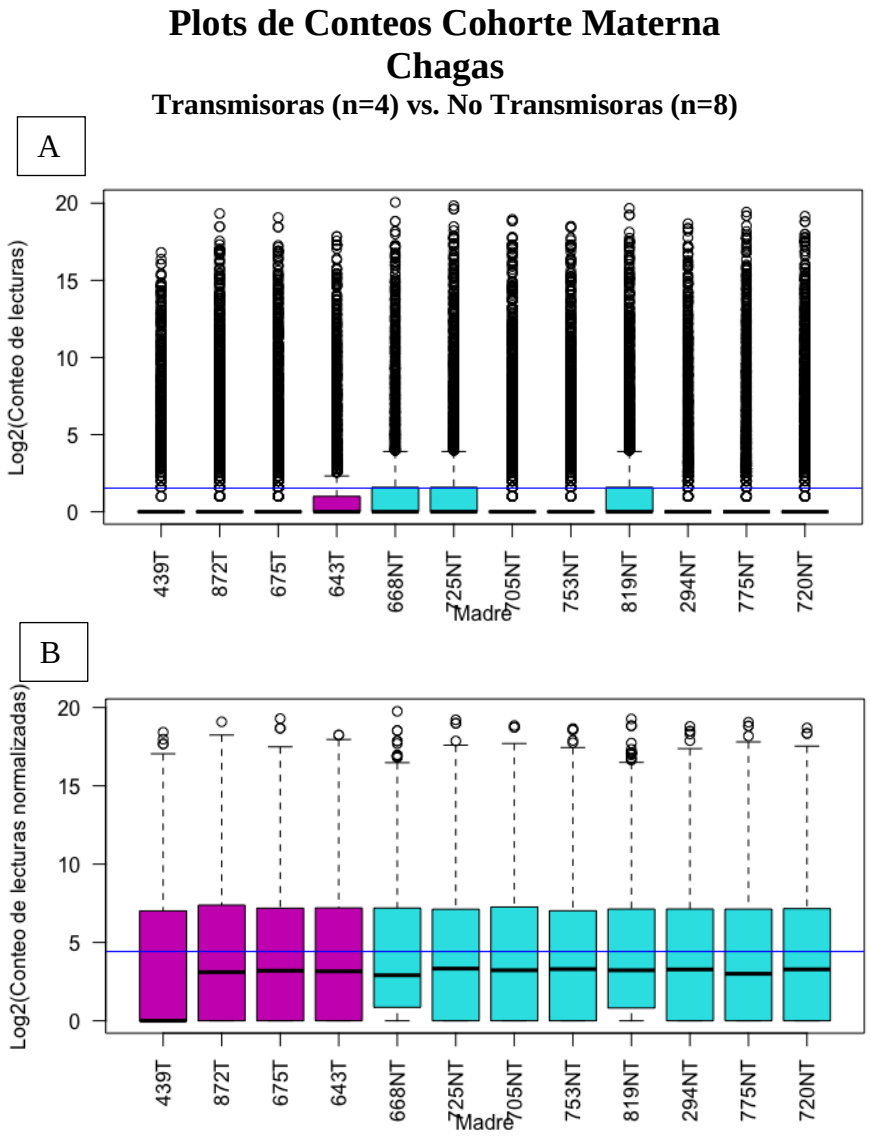

Figura 8. Boxplots de homogeneidad del dataset (n=12) en la fase de descubrimiento para muestras Transmisoras (n=4) y No Transmisoras (n=8). **(A)** Distribución asimétrica de los conteos crudos (raw counts). **(B)** Distribución homogénea corregida mediante el algoritmo de razón de medianas (median-of-ratios) de DESeq2 (escala $\log_2$). La estabilización del perfil valida la eliminación del sesgo por profundidad de secuenciación técnica.

Visualización global de microARNs diferencialmente expresados

Para el análisis de expresión diferencial obtenida en la fase de descubrimiento mediante secuenciamiento de ARN (smallRNA-seq), se generó un heatmap con agrupamiento jerárquico no supervisado bidireccional a partir de los miARNs que cumplieron los criterios estadísticos establecidos en DESeq2 ($p < 0.05$ y $|\log_2 FC| > 1$), permitiendo una visualización global de los patrones de expresión entre las 13 muestras analizadas (Figura 9).

El heatmap reveló una segregación notoria evidenciando la presencia de patrones de agrupamiento jerárquico tanto a nivel de muestras como de miARNs al emplear la distancia basada en la correlación de Pearson (1-r) acoplada al método de vinculación completa (complete linkage), el dendograma de las columnas dividió de forma apropiada el set de muestras en dos clados principales independientes. El primer clado congregó al 100% de las muestra de madres Transmisoras (T, n=4), mientras que el segundo agrupó la totalidad de madres No Transmisoras (NT, n=8). La ausencia de clasificaciones cruzadas evidencia que el perfil global de expresión de miARNs en el tejido placentario posee un potencial poder discriminatorio suficiente para ser separados como clados distintos.

Se evidenció que este patron de segregación clínicaestá impulsado por un bloque miARNs marcadamente sobreexpresados en madres transmisoras, representados en tonalidades terracota (puntuaciones z-score positivas). Dentro de este nodo regulatorio destacan los dos candidatos mas robustos del secuenciamiento: hsa-

miR-375-3p, el cual exhibió un incremento de $|\log_2 FC|=3.106$ con nivel de significancia más alto del estudio ($p=1.21 \times 10^{-8}$; p-adj$=1.08 \times 10^{-5}$), y hsa-miR-193a-5p, con un $|\log_2 FC|=1.90$ y una sólida significancia estadística ajustada ($p=1.75 \times 10^{-5}$; padj=0.008). Ambos controlaron la tasa de falsos descubrimientos (FDR) de Benjamini. Hochberg. La concordancia matemática entre la fuerte sobreexpresión de esta firma molecular y la separación de ambos grupos, direcciona la fase de descubrimiento hacia la identificación de candidatos optimos para la verificación por RT-qPCR.

Heatmap Cohorte Materna Chagas
Transmisoras (n=4) vs. No Transmisoras (n=8)
miARNs diferencialmente expresados
Agrupamiento por Correlación de Pearson ($p<0.05$, $|\log_2 FC|>1$)

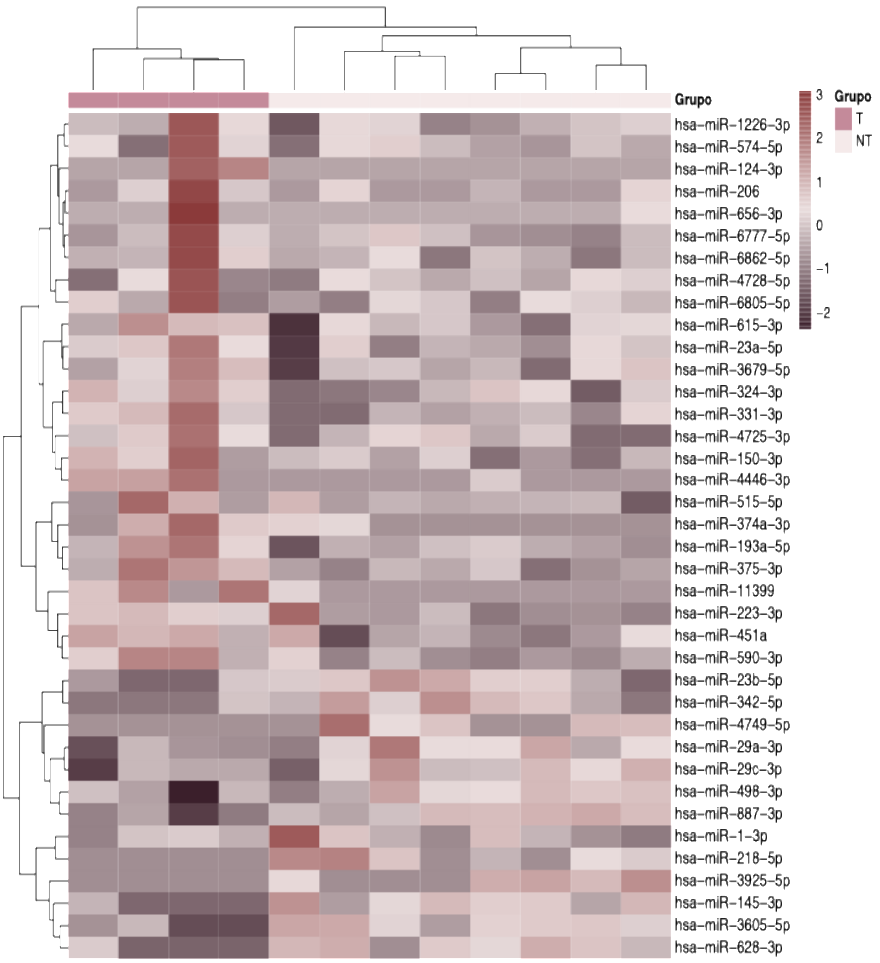

Figura 9. Perfiles de expresión seleccionados mediante DESeq2 ($p < 0.05$) y $|\log_2 FC| > 1$) en placentas de madres transmisoras (T, terracota, n=4) y no transmisoras (NT, nude, n=8). El agrupamiento se basó en distancia de correlación de Pearson y vinculación completa. La escala representa el Z-score (normalizado por VST), donde tonos rosa/terracota indican sobreexpresión y gris subexpresión. El dendrograma superior muestra la segregación fenotípica entre ambos grupos.

Identificación de miARNs diferencialmente expresados

El análisis de expresión diferencial se realizó empleando el modelo estadístico de DESeq2, comparando madres transmisoras (n = 4) frente a no transmisoras (n = 8). Los resultados fueron visualizados mediante un volcano plot basado en valores de p no ajustados (Figura 10), en el cual se integran simultáneamente la magnitud del cambio de expresión $|\log_2 FC|$ y la significancia estadística ($-\log 10$ p-value).

En el volcano plot basado en los resultados del análisis de expresión diferencial con DESeq2, se representaron los cambios de expresión como $\log_2$ fold change frente al $-\log_{10}$ del valor p (Figura 10). Al aplicar el umbral de significancia nominal ($p < 0.05$ y $|\log_2 FC| > 1$), se identificó un subconjunto de mis diferencialmente expresados, los cuales se distribuyeron a ambos lados del eje de cambio de expresión, reflejando aumentos y disminuciones relativas entre los grupos de madres transmisoras y no transmisoras. Sin embargo, tras la corrección por comparaciones múltiples mediante el método de Benjamini–Hochberg, solo dos microARNs mantuvieron significancia estadística a nivel de p ajustado (< 0.05): hsa-miR-375-3p y hsa-miR-193a-5p. Ambos miARNs presentaron valores elevados de significancia estadística y cambios de expresión pronunciados, lo que

explica su destacada posición en el gráfico y su etiquetado individual. El resto de los microARNs mostrados como significativos en función del valor p no ajustado no superaron el umbral de FDR aplicado para minimizar falsos positivos en un contexto de alta dimensionalidad (n = 473 microARNs evaluados).

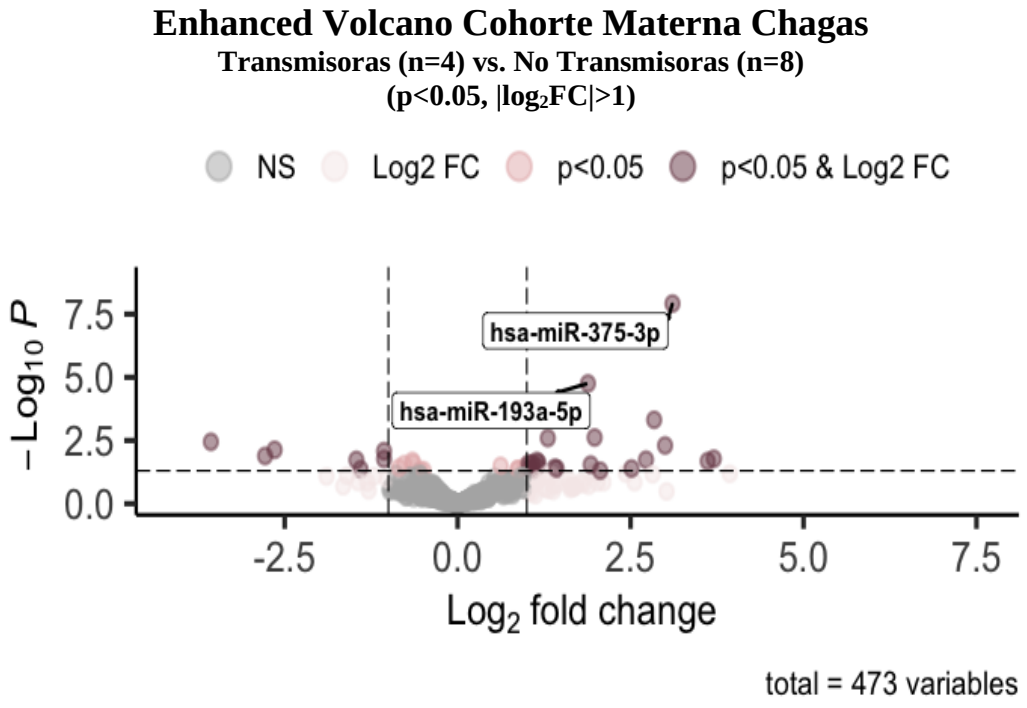

Figura 10. Volcano plot de miARNs expresados diferencialmente en la cohorte materna de Chagas. Distribución de 473 variables en placentas de madres transmisoras (n=4) vs. no transmisoras (n=8). Los ejes muestran la magnitud $|\log_2 FC|$ y significancia $-\log_{10} P$, con una línea discontinua en el umbral $p < 0.05$. Puntos coloreados según criterios de DESeq2: no significativos (gris), solo $|\log_2 FC|$, cambio de expresión (rosa), solo cambio de expresión nominal significativa ($p < 0.05$, terracota) y ambos criterios robustos ($p < 0.05$ y $|\log_2 FC| > 1$, marrón). Destacan sobreexpresados hsa-miR-375-3p y hsa-miR-193a-5p.

Verificación de microARNs diferencialmente expresados mediante RT-qPCR

La estabilidad de expresión de 12 miARNs candidatos fue evaluada mediante algoritmos ampliamente utilizados, incluyendo NormFinder y geNorm (Tabla 4), con el objetivo de seleccionar controles endógenos adecuados para la normalización

Tabla 4. Resultados de microARNs estables candidatos a miARNs de referencia.

Ranking de Orden – RefFinder

Metodo	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Delta CT	hsa-miR-95-3p	hsa-miR-99b-5p	hsa-miR-498-3p	hsa-miR-375-3p	hsa-miR-512-3p	hsa-miR-526b-3p	hsa-miR-155-5p	hsa-miR-187-3p	hsa-miR-410-5p	hsa-miR-515-5p	hsa-miR-193a-5p	hsa-miR-455-5p
BestKeeper	hsa-miR-375-3p	hsa-miR-498-3p	hsa-miR-187-3p	hsa-miR-155-5p	hsa-miR-193a-5p	hsa-miR-95-3p	hsa-miR-410-5p	hsa-miR-99b-5p	hsa-miR-512-3p	hsa-miR-526b-3p	hsa-miR-515-5p	hsa-miR-455-5p
Normfinder	hsa-miR-95-3p	hsa-miR-498-3p	hsa-miR-99b-5p	hsa-miR-375-3p	hsa-miR-410-5p	hsa-miR-512-3p	hsa-miR-155-5p	hsa-miR-526b-3p	hsa-miR-187-3p	hsa-miR-515-5p	hsa-miR-193a-5p	hsa-miR-455-5p
Genorm	hsa-miR-512-3p | hsa-miR-526b-3p		hsa-miR-99b-5p	hsa-miR-515-5p	hsa-miR-95-3p	hsa-miR-410-5p	hsa-miR-498-3p	hsa-miR-375-3p	hsa-miR-155-5p	hsa-miR-187-3p	hsa-miR-193a-5p	hsa-miR-455-5p
Ranking Reffinder	hsa-miR-95-3p **TOP 1**	hsa-miR-498-3p **TOP 2**	hsa-miR-375-3p **TOP 3**	hsa-miR-99b-5p	hsa-miR-512-3p	hsa-miR-526b-3p	hsa-miR-155-5p	hsa-miR-410-5p	hsa-miR-187-3p	hsa-miR-515-5p	hsa-miR-193a-5p	hsa-miR-455-5p

Jerarquización de los 12 miARNs candidatos evaluados como controles endógenos (n=14). Estabilidad ordenada de mayor a menor según el método ΔCq y los algoritmos BestKeeper, NormFinder y geNorm. Recommended comprehensive ranking indica la clasificación global final calculada por RefFinder mediante la media geométrica ponderada. Se identifican como la combinación óptima para el factor de normalización (NF) a: hsa-miR-95-3p (Amarillo, Top 1), hsa-miR-498-3p (Naranja, Top 2) y hsa-miR-375-3p (Verde, Top 3).

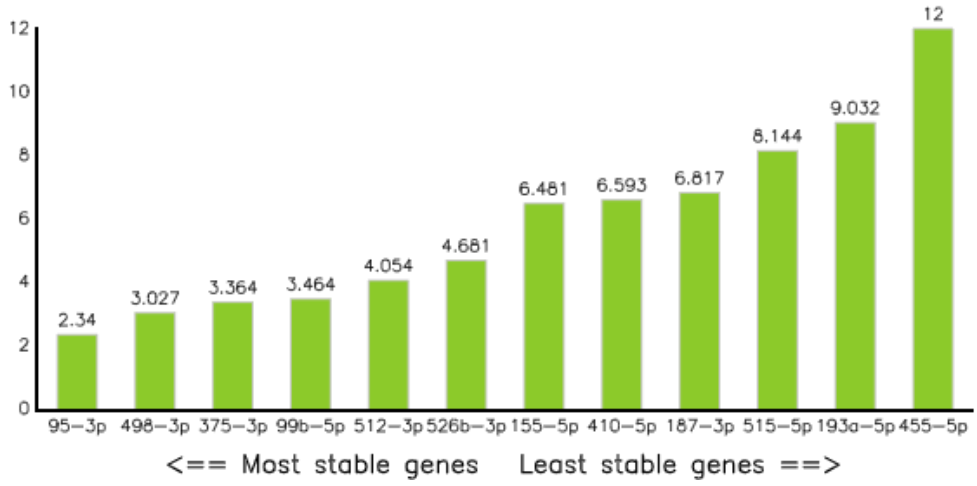

Figura 11. Índice de estabilidad global de los 12 microARNs candidatos según el algoritmo RefFinder. Valor del peso ponderado final (Ranking Reffinder) calculado mediante la media geométrica de cuatro algoritmos. El eje horizontal organiza los miARNs de mayor (Most stable) a menor estabilidad (Least stable). Las barras de menor altura corresponden a hsa-miR-95-3p (2.34) , hsa-miR-498-3p (3.027) y hsa-miR-375-3p (3.364) considerandoloss óptimos para la normalización.

Para identificar los miARNs de referencia mas estables en un set unificado de 14 muestras placentarias (5 Transmisoras y 9 No Transmisoras), los perfiles de expresión de los 12 miARNs candidatos se procesaron en base a un algoritmo que calcula la media geometrica de los pesos asignados a cada miARN según el lugar obtenido en cada uno de los algoritmos (ΔCq comparativo, BestKeeper, Normfinder y geNorm) para generar un orden de mérito global robusto libre del sesgo de valores atípicos (Ranking Reffinder). La clasificación jerarquica determinó que hsa-miR-95-3p (Top 1), hsa-miR-498-3p (Top 2) y hsa-miR-375-3p (Top 3) presentaron los perfiles mas constitutivos y homogéneos a lo largo de todo el dataset, a diferencia del resto de candidatos evaluados (Tabla 4).

Con el propósito de discernir cuántos miARNs normalizadores debían emplearse para mitigar el error experimental, se ejecutó el análisis de variación de pares (Vn/Vn+1) mediante el algoritmo geNorm, implementado en la plataforma Clarida (Clarida, v2026.4). El cáculo para definir la inclusión del tercer miARN dio un índice V_3/V_4=0.12 (Figura 12). Al situarse como un valor por debajo del umbral crítico establecido de 0.15 (Vandesompele *et al*., 2002), se evidenció que la adición de un cuarto candidato de referencia no aportaba una variación residual importante que justifica su uso para calcular el Factor de Normalización. Finalmente se determinó el uso de la combinación basada en la media geométrica de hsa-miR-95-3p , hsa-miR498-3p y hsa-miR-375-3p para el cáculo del factor de normalización.

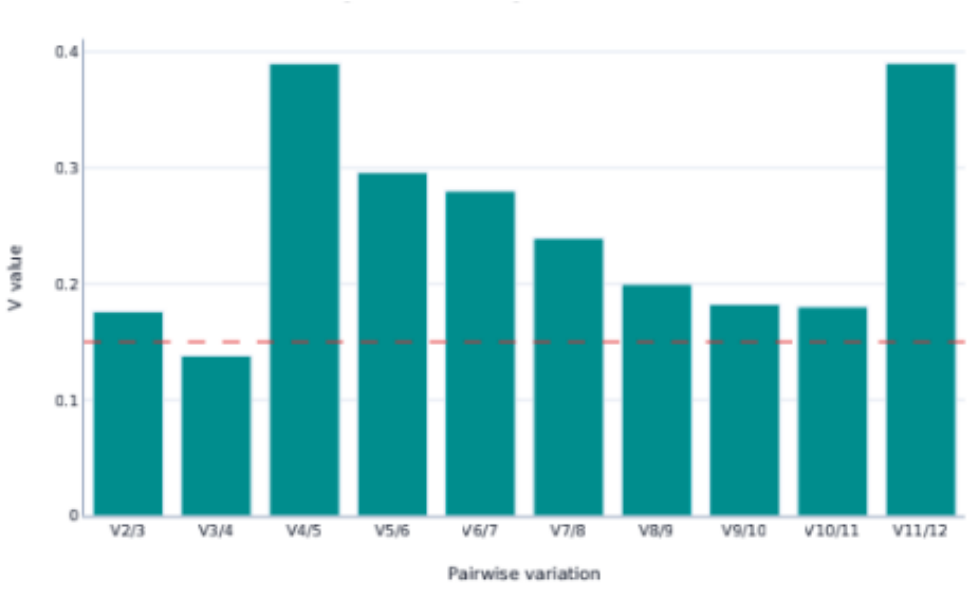

Figura 12. Análisis de variación por pares de los 12 microARNs candidatos según el algoritmo geNorm. Valor del índice de variación por pares (V-values) calculado para definir la inclusión de un candidato de referencia adicional. El eje horizontal organiza las comparaciones consecutivas entre los factores de normalización ($V_n/V_{(n+1)}$. La barra correspondiente a V_3/V_4 (0.12) se sitúa por debajo del umbral crítico establecido de 0.15, determinando un número óptimo de 3 genes de referencia para el cálculo final.

Análisis de expresión diferencial de miARNs mediante RT-qPCR

Para identificar miARNs asociados a la transmisión, se compararon los niveles de expresión relativa normalizada (valores R) de los 9 miARNs candidatos restantes entre el grupo de madres Transmisoras (T, n=5) y No Transmisoras (NT, n=9). El análisis inferencial de suma de rangos de Wilcoxon (Mann-Whitney U) reveló patrones de desregulación asimétricos entre las muestras de placenta de madres transmisoras (Tabla 5; Figura 13).

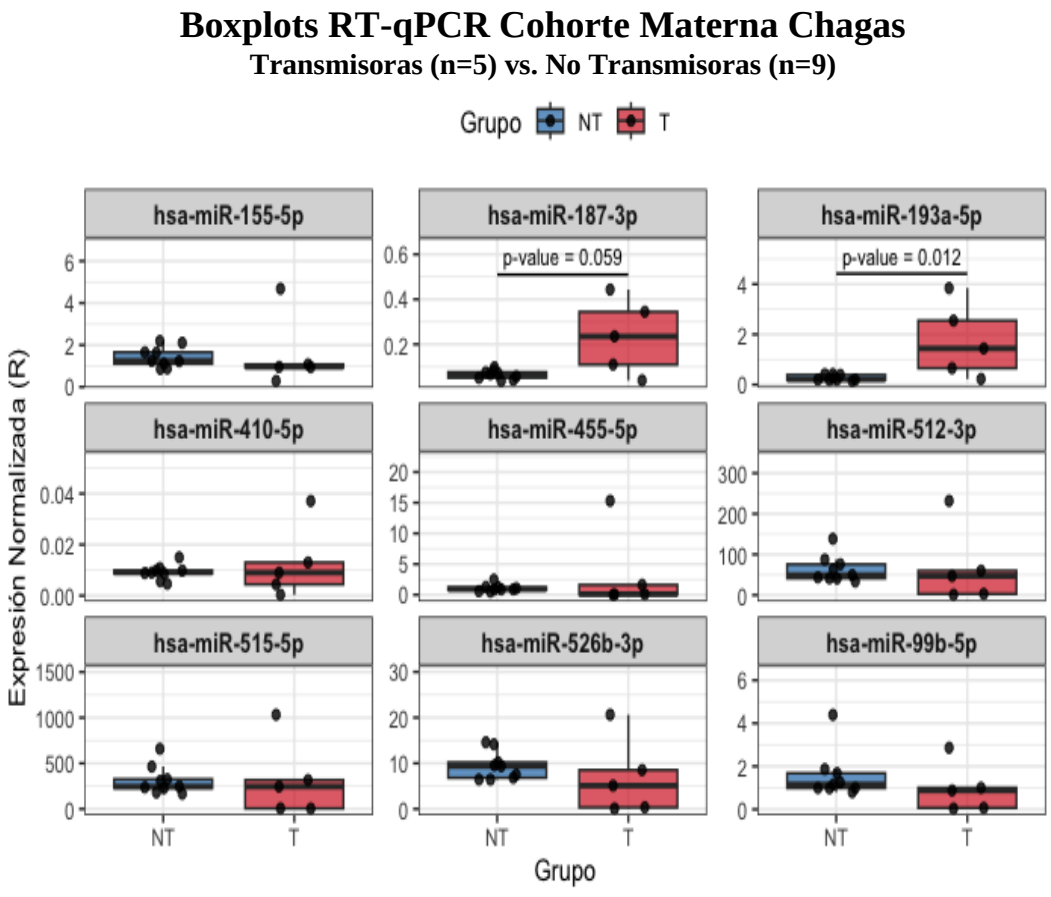

Figura 13. Boxplot para 9 candidatos en la cohorte materna de Chagas: No Transmisoras (NT, azul, n=9) y Transmisoras (T, rojo, n=5). El eje Y representa la expresión relativa normalizada ($2^{-\Delta Cq}$) calculada con la media geométrica de hsa-miR-95-3p, hsa-miR-498-3p y hsa-miR-375-5p como factor de normalización. Las barras superiores muestran p-valores crudos (prueba de Wilcoxon),

destacando la sobreexpresión de hsa-miR-193a-5p (p = 0.012) y la tendencia de hsa-miR-187-3p (p = 0.059). Las escalas del eje Y son independientes por la variabilidad de rangos dinámicos.

El principal hallazgo correspondió a hsa-miR-193a-5p, el cual exhibió una marcada sobreexpresión en las placentas de madres transmisoras. Este miARN alcanzó una expresión promedio de 1.74 en el grupo Transmisoras en comparación con el valor basal de 0.27 del grupo No Transmisoras, evidenciando una magnitud de cambio más elevada del estudio con un Fold Change (FC) de 6.50 y un incremento de $|\log_2 FC| = 2.70$. Esta sobreexpresión presenta significancia estadística (p=0.012).

Asimismo, hsa-miR-187-3p mostró igualmente una fuerte tendencia a la sobreexpresión en madres transmisoras, con un incremento en su nivel medio de expresión que pasó de 0.06 en el grupo No Transmisoras a 0.23 en el grupo Transmisoras. Esta variación representó un incremento en su abundancia relativa (FC=3.62; $|\log_2 FC| = 1.86$). Desde esta perspectiva, este candidato se posicionó bordeando la significancia estadística (p=0.059), sugiriendo una relevancia biológica sustancial en el tejido placentario a pesar de las restricciones del tamaño muestral.

Tabla 5. Análisis de expresión diferencial de miARNs seleccionados mediante RT-qPCR en placentas de madres transmisoras y no transmisoras

miARN	Expresión Promedio NT	Expresión Promedio T	Fold Change (FC)	$\|log_2FC\|$	p_valor (crudo)
hsa-miR-193a-5p	0.27	1.74	6.50	2.70	0.012
hsa-miR-187-3p	0.06	0.23	3.62	1.86	0.059
hsa-miR-526b-3p	9.46	6.93	0.73	-0.45	0.240
hsa-miR-99b-5p	1.57	0.97	0.62	-0.69	0.240
hsa-miR-155-5p	1.43	1.59	1.11	0.15	0.364
hsa-miR-455-5p	1.08	3.42	3.15	1.65	0.518
hsa-miR-512-3p	63.65	68.37	1.07	0.09	0.606
hsa-miR-515-5p	313.23	320.92	1.02	0.03	0.699
hsa-miR-410-5p	0.01	0.01	1.39	0.47	0.898

NT = Madres No Transmisoras (n = 9); T = Madres Transmisoras (n = 5). Los valores de expresión corresponden a la cantidad relativa normalizada (R) utilizando la media geométrica de hsa-miR-95-3p , hsa-miR-498-3p y hsa-miR-375-3p como factor de normalización. El p-valor crudo se calculó mediante la prueba no paramétrica de suma de rangos de Wilcoxon (Mann-Whitney U).

El hallazgo más significativo se observó en hsa-miR-193a-5p, el cual reflejó un perfil de regulación a la alta estadísticamente significativo en el tejido placentario de madres transmisoras ($p = 0.012$). Este miARN incrementó notablemente su expresión desde una expresión promedio de 0.27 en el grupo No Transmisora hasta 1.74 en el grupo Transmisora, registrando un fold change de 6.50 y un $|\log_2 FC|$ de 2.70.

Por otra parte, aunque no alcanzaron el umbral de significancia estadística convencional ($p < 0.05$) debido a las limitaciones intrínsecas del tamaño muestral sobre pruebas basadas en rangos, otros miARN mostraron una marcada tendencia hacia la sobreexpresión en el grupo Transmisoras, destacando por su elevada relevancia biológica. Entre ellos sobresale hsa-miR-187-3p, que pasó de una expresión promedio de 0.06 a 0.23, registrando un fold change de 3.62 y un $|\log_2 FC|$ de 1.86, quedando muy próximo al umbral de significancia ($p = 0.059$). De igual manera, hsa-miR-455-5p aumentó su expresión desde un promedio de 1.08 a 3.42 (fold change = 3.15; $|\log_2 FC| = 1.65$; $p = 0.518$) y hsa-miR-155-5p mostró un comportamiento discretamente ascendente al pasar de 1.43 a 1.59 (fold change = 1.11; $|\log_2 FC| = 0.15$; $p = 0.364$). En contraste con estas tendencias al incremento, hsa-miR-526b-3p y hsa-miR-99b-5p exhibieron sutiles regulaciones a la baja con fold changes de 0.73 $|\log_2 FC| = -0.45$; $p = 0.240$) y 0.62 $|\log_2 FC| = -0.69$; $p = 0.240$), respectivamente.

Finalmente, las moléculas con mayores niveles de abundancia basal en el tejido placentario, tales como hsa-miR-515-5p (promedios de 313.23 vs. 320.92; $|\log_2 FC|$

= 0.03; p = 0.699) y hsa-miR-512-3p (promedios de 63.65 vs. 68.37; $|\log_2 FC|$ = 0.09; p = 0.606), exhibieron perfiles de expresión relativa marcadamente estables entre ambos grupos, sugiriendo que sus funciones regulatorias estructurales se mantuvieron homogéneas.

Para evidenciar la robustez y la fidelidad biológica de los perfiles de expresión obtenidos mediante secuenciación masiva (SmallRNA-Seq), se ejecutó un análisis de correlación no paramétrica de Spearman comparando los valores de $|\log_2 FC|$ frente a los resultados cuantitativos de la RT-qPCR (n=14) muestras). El análisis reveló una correlación positiva fuerte y estadísticamente significativa entre ambas plataformas analíticas, registrando un coeficiente de correlación (rho = 0.783) y un valor de significancia de (p = 0.012) (Figura 14). Esta concordancia matemática evidencia una alta consistencia en la direccionalidad y magnitud de los cambios moleculares; de manera notable, candidatos clave como hsa-miR-193a-5p e hsa-miR-187-3p se posicionaron con consistencia en el cuadrante de sobreexpresión en ambas metodologías, mientras que moléculas como hsa-miR-99b-5p e hsa-miR-526b-3p exhibieron de forma homogénea perfiles de subexpresión, respaldando así la concordancia técnica de los hallazgos del secuenciamiento en el tejido placentario.

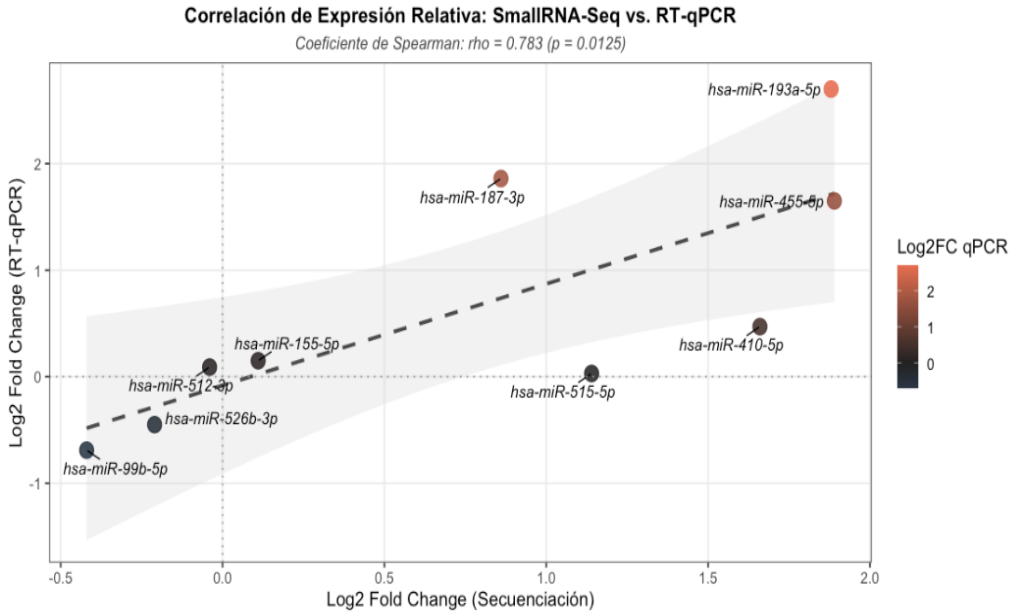

Figura 14. Gráfico de dispersión que contrasta los valores de $|\log_2 FC|$ obtenidos por secuenciación (eje horizontal) frente a RT-qPCR (eje vertical). Las líneas punteadas dividen los cuadrantes de regulación. El coeficiente de Spearman (rho = 0.783); (p = 0.012) confirma una concordancia positiva y estadísticamente significativa en la direccionalidad del cambio molecular entre ambas plataformas analíticas.

VI)DISCUSIÓN

El presente estudio tuvo como objetivo identificar miARNs diferencialmente expresados en placentas de madres con y sin transmisión congénita de *Trypanosoma cruzi*. En conjunto, los resultados respaldan la existencia de miARNs diferencialmente expresados aparentemente asociados al evento de transmisión congénita de *T. cruzi*; sin embargo, los cambios observados no corresponden a una disrupción global del perfil de miARNs, sino a modificaciones específicas en un subconjunto de estos reguladores, mediante la identificación de miARNs puntuales como hsa-miR-193a-5p y hsa-miR-187-3p desregulados ($p<0.05$). Este patrón es consistente con la biología de la placenta, donde la regulación postranscripcional mediada por miARNs tiende a ser fina y altamente contextual, permitiendo mantener la homeostasis tisular frente a estímulos externos (Mouillet *et al*., 2015; Morales-Prieto *et al*., 2012).

Contexto demográfico, clínico y geográfico

La homogeneidad observada en las variables ginecoobstétricas y demográficas de la cohorte refuerza la noción de que el riesgo de transmisión congénita no se rige por diferencias sistémicas ni por el perfil clínico-diagnóstico convencional de la gestante. Desde una perspectiva geográfica, resalta el hecho de que el 100% de las madres pertenecientes al grupo transmisor (n = 4) provengan del departamento de Santa Cruz, incluyendo a la madre 366, adicionada en RT-qPCR, un patrón que contrasta con el grupo no transmisor, el cual exhibe una procedencia más heterogénea que incluye casos aislados de Chuquisaca (22.2%) y Tarija (11.1%).

Esta concentración en el grupo transmisor guarda una estrecha relación con la distribución de la diversidad genética de *Trypanosoma cruzi* circulante en Bolivia.

Estudios de genotipificación en binomios madre-hijo evaluados en la región oriental del país confirman que la dinámica biológica de la transmisión transplacentaria exitosa está fuertemente dominada por la Unidad Discreta de Tipificación (DTU) TcV, un linaje de origen híbrido surgido de los genotipos ancestrales TcII y TcIII. Aunque el consenso internacional aclara que todas las DTUs (desde TcI hasta TcVI) poseen el potencial intrínseco de transmitirse por vía congénita, el clon híbrido TcV exhibe una dominancia casi absoluta en los recién nacidos con infección confirmada en Santa Cruz (Sanchez L etal., 2022). Este predominio del linaje TcV se vincula directamente con su capacidad biológica para evadir la respuesta inmunoinflamatoria local y colonizar de forma eficiente la interfase materno-fetal, induciendo altas tasas de replicación que se manifiestan de manera evidente en el neonato (Klein *et al*., 2021).

Asimismo, la distribución equitativa por sexo observada en los neonatos infectados de nuestra cohorte (50.0% femenino y 50.0% masculino) y las medianas etarias de las madres (29.0 años [RIC: 25.2 - 32.5] en transmisoras y 28.0 años [RIC: 27.5 - 29.0] en no transmisoras) respaldan las observaciones a gran escala de Klein *et al*. (2021), cuyos análisis demuestran que variables biológicas como el sexo del lactante o la edad materna no muestran una asociación estadística ni biológica con la tasa de transmisión vertical de *T. cruzi*, consolidando la premisa de que el éxito de la infección transplacentaria depende críticamente de la compatibilidad y el

desafío molecular directo entre los factores de virulencia de la DTU circulante (como el clon híbrido TcV) y la integridad celular del trofoblasto.

Por otra parte, los factores socioeconómicos no actuan como factores de riesgo para la transmisión trasplacentaria, pero si como factores indirectos involucrados en la infeccion materna. Según los hallazgos de Klein *et al*. (2021) en el Hospital Percy Boland, el bajo nivel educativo, la residencia previa en zonas rurales endémicas y las viviendas vulnerables elevan significativamente el riesgo de que las mujeres adquieran *T. cruzi*. Observar el 100% de las madres transmisoras provenga de Santa Cruz refleja esta realidad epidemiológica, donde la migración interna moviliza poblaciones vulnerables desde áreas hiperendémicas hacia la periferia urbana. De tal manera, la vulnerabilidad social aumentaría la exposición comunitaria al patógeno y las características biológicas del linaje local dominante (TcV) determinarían el éxito de la invasión vertical.

Perfil global de miARNs placentarios

El análisis global del repertorio de miARNs placentarios reveló que 403 miARNs fueron compartidos entre los grupos de madres transmisoras y no transmisoras, acompañados de un subconjunto reducido de miARNs exclusivos (44 en transmisoras y 26 en no transmisoras). Este patrón sugiere la existencia de un núcleo conservado de regulación postranscripcional que se mantiene estable

independientemente del estado de transmisión, reflejando la naturaleza altamente regulada y resiliente de la placenta como órgano clave en la interfaz materno-fetal.

Este hallazgo es consistente con estudios transcriptómicos en placenta humana que han demostrado que, incluso en condiciones patológicas como preeclampsia o infecciones virales, el perfil global de miARNs presenta una notable estabilidad, concentrándose las diferencias en un subconjunto específico de reguladores más que en una reprogramación masiva del transcriptoma (Morales-Prieto *et al*., 2012; Fu *et al*., 2013). En este sentido, la transmisión congénita de *T. cruzi* parecería no implicar una disrupción global del paisaje de miARNs, sino más bien ajustes finos en nodos regulatorios específicos, lo cual es coherente con la necesidad de preservar funciones esenciales para la viabilidad fetal.

Desde una perspectiva biológica, la presencia de miARNs exclusivos en cada grupo, aunque numéricamente limitada, podría reflejar procesos regulatorios diferenciales relacionados al estado de transmisión. Sin embargo, es importante considerar que la detección de miARNs exclusivos en análisis de smallRNA-seq puede estar influenciada por umbrales de expresión y profundidad de secuenciación, por lo que estudios complementarios son necesarios para validar la expresión diferencial de estos miARNs.

La detección consistente de múltiples miembros del clúster C19MC, incluyendo hsa-miR-512-3p, hsa-miR-515-5p, hsa-miR-526b-3p, hsa-miR-519d-5p y hsa-miR-520d-5p, en ambos grupos refuerza la conservación de vias regulatorias

placentarias fundamentales. El clúster C19MC, localizado en el cromosoma 19, es el mayor clúster de miARNs específico de placenta en humanos y se expresa predominantemente en el trofoblasto, donde cumple funciones críticas en la regulación de la diferenciación celular, la proliferación y la comunicación intercelular mediada por vesículas extracelulares (Noguer-Dance *et al*., 2010; Mouillet *et al*., 2015).

Además, se ha demostrado que los miARNs del C19MC participan activamente en mecanismos de defensa antiviral e inmunomodulación, incluyendo la inducción de un estado antiviral en células receptoras mediante la transferencia de exosomas derivados del trofoblasto (Mouillet *et al*., 2015). En este contexto, su expresión conservada en placentas infectadas sugiere que estos mecanismos de protección innatos se mantienen activos incluso en presencia de *T. cruzi*, lo que podría contribuir a limitar la propagación del parásito y a preservar la integridad de la barrera placentaria.

Perfiles globales mediante secuenciación de ARNs pequeños (smallRNA-seq)

La identificación inicial de miARNs diferencialmente expresados mediante la normalización de conteos con DESeq2 permitió controlar variaciones críticas en la profundidad de secuenciación y la composición de las bibliotecas globales (Love *et al*., 2014). El establecimiento de criterios exploratorios rigurosos $|\log_2 FC| > 1$ y $p < 0.05$) reveló un conjunto amplio de miARNs con variaciones moleculares notables entre placentas de madres transmisoras y no transmisoras, sugiriendo que la

condición de transmisión vertical se asocia a modificaciones detectables en el entorno postranscripcional del tejido.

Al profundizar en los candidatos con mayor contribución a esta firma molecular, el secuenciamiento diferenció perfiles coordinados de expresión, destacando la regulación al alza de hsa-miR-193a-5p y hsa-miR-375-3p. El control estricto de la tasa de descubrimientos falsos (FDR) mediante el método de Benjamini–Hochberg demostró la robustez estadística de este hallazgo a gran escala, identificando a hsa-miR-375-3p (p-adj = 0.0000108) y a hsa-miR-193a-5p (p-adj = 0.0078) como los miARNs más consistentes potencialmente asociados al escenario de transmisión, lo que justificó su selección para la fase posterior de verificación técnica.

Umbral de geNorm y estrategia de normalización interna para RT-qPCR

La evaluación de los controles moleculares internos constituyó un paso crítico previo a la interpretación de cualquier perfil de expresión por RT-qPCR. La determinación del numero de miARN normalizadores en base al índice de variación de pares $V_3/V_4 = 0.12$ mediante el algoritmo geNorm, basado en los ciclos umbral (Cq) cuantitativos obtenidos de los candidatos normalizadores obtenidos mediante el Ranking RefFinder, robustece la normalización de los datos. Al situarse V_3/V_4 con holgura por debajo del umbral internacional de 0.15 establecido por Vandesompele *et al*. (2002), se demuestra matemáticamente que el uso de la media geométrica de hsa-miR-95-3p, hsa-miR-498-3p y hsa-miR-375 es estadísticamente suficiente para esta cohorte. Este hallazgo es metodológicamente relevante, ya que

corrobora la asunción empírica de que los tejidos altamente heterogéneos y dinámicos, como la placenta humana, requieren obligatoriamente más de un gen de referencia para amortiguar el error de cuantificación (Mestdagh *et al*., 2009). De este modo, el modelo asegura un factor de normalización óptimo y previene la introducción de sesgos técnicos artificiales en la evaluación final de los miARNs candidatos.

Validez del p-valor crudo en el contexto de un estudio exploratoria

Debido al tamaño de la muestra final y a la naturaleza inherente de las perfiles transcriptómicas locales en tejidos de placenta, las correcciones estrictas por multiplicidad matemática disminuyen drásticamente la potencia estadística, incrementando el riesgo de descartar dianas con un rol biológico activo real al incurrir en errores de tipo II o falsos negativos. Por lo tanto, la identificación del p-valor crudo para los miARNs candidatos evaluados por RT-qPCR resulta un criterio metodológico legítimo y justificado para priorizar y rescatar moléculas reguladas con relevancia funcional potencial.

Esta estrategia metodológica guarda una total consistencia con los antecedentes del área; en estudios exploratorios previos que sentaron las bases del perfil de pequeños ARNs en explantes placentarios humanos desafiados con *T. cruzi*, se recurrió de igual forma a la selección y discusión de candidatos moleculares a partir de sus p-valores crudos o nominales (Medina *et al*., 2020). Bajo este enfoque científico, se

valida que el p-valor crudo actúa como un indicador legítimo para la identificación de relevancia biológica, permitiendo que la firma molecular identificada sirva como un punto de partida sólido para futuras investigaciones funcionales in vitro o validaciones en cohortes clínicas independientes a gran escala.

Comparación con modelos *ex vivo* de infección placentaria

Los resultados obtenidos en este estudio muestran una concordancia parcial con investigaciones previas basadas en modelos *ex vivo* de explantes placentarios humanos infectados con *T. cruzi*, particularmente aquellos desarrollados por Lorena Medina y colaboradores (Medina *et al*., 2020; 2022), así como por Juan Guerrero-Muñoz *et al*. (2023). En estos trabajos, se ha descrito la modulación de miARNs asociados a procesos de diferenciación trofoblástica, apoptosis y respuesta inflamatoria, incluyendo miembros del clúster placentario C19MC (como hsa-miR-512-3p, hsa-miR-515-5p y hsa-miR-526b-3p) y miARNs implicados en la regulación de la respuesta inmune y el estrés celular.

En particular, Medina *et al*. (2022) reportaron que la infección *ex vivo* de explantes placentarios durante periodos cortos (2–24 horas) induce un perfil de expresión de miARNs que se asemeja al observado durante la diferenciación del trofoblasto, sugiriendo una reprogramación temprana de la respuesta celular frente al parásito. Asimismo, Medina *et al*. (2020) demostraron que *T. cruzi* y *Toxoplasma gondii* inducen perfiles diferenciales de miARNs, con enriquecimiento en rutas asociadas

a apoptosis, NF-κB y regulación del ciclo celular. Por su parte, Guerrero-Muñoz *et al*. (2023) identificaron específicamente a hsa-miR-512-3p como un mediador clave de apoptosis inducida por *T. cruzi*, a través de la regulación de c-FLIP, un inhibidor de la caspasa-8, evidenciando un mecanismo molecular directo mediante el cual el parásito podría comprometer la integridad del trofoblasto.

En contraste, el presente estudio, basado en placentas provenientes de infecciones naturales, no evidenció cambios significativos en los miARNs del clúster C19MC evaluados mediante RT-qPCR y mostró una menor magnitud de alteraciones en el perfil global de miARNs. Esta diferencia sugiere que, a diferencia de los modelos *ex vivo* o explantes placentarios, donde el estrés agudo del cultivo celular suele inducir una desregulación masiva de miARNs (tanto up como down-regulated), la infección natural in vivo preserva una mayor estabilidad homeostática en el perfil transcripcional del tejido, las placentas analizadas en este estudio reflejan un proceso infeccioso crónico, dinámico y modulador, donde la interacción huésped–parásito ha evolucionado en el tiempo, permitiendo la activación de mecanismos compensatorios que limitan la disrupción transcriptómica.

Desde una perspectiva biológica, estas diferencias sugieren que la placenta no responde a la infección de manera estática, sino que transita desde una fase inicial de respuesta aguda, caracterizada por activación inflamatoria y apoptosis, como la observada en modelos *ex vivo*, hacia un estado más regulado en infecciones establecidas, donde predominan mecanismos de adaptación y tolerancia. Este comportamiento ha sido descrito también en otros modelos de infecciones

congénitas virales como Citomegalovirus Humano (HCMV) y Coxsackievirus B3 (CVB3), donde la placenta modula activamente la respuesta inmune para preservar la viabilidad fetal (Delorme-Axford *et al*., 2013).

En conjunto, la comparación entre ambos enfoques resalta que los modelos *ex vivo* son útiles para identificar mecanismos tempranos y directos de interacción parásito–placenta, mientras que los estudios en muestras humanas naturalmente infectadas, como el presente, permiten capturar la complejidad biológica real del proceso de transmisión congénita. La integración de ambos tipos de evidencia resulta fundamental para una comprensión más completa de los mecanismos moleculares involucrados en la infección y la transmisión congénita de Chagas**.**

Evalucación Biológica y Funcional de miARNs Resaltantes

Entre los miARNs analizados por RT-qPCR, hsa-miR-193a-5p destacó como uno de los hallazgos biológicos más robustos, mostrando una marcada sobreexpresión estadísticamente significativa en placentas de madres transmisoras en comparación con el grupo no transmisor (FC = 6.50; $|\log_2 FC| = 2.70$; ($p = 0.012$). Esta marcada sobreexpresión quedó firmemente respaldada por el análisis de correlación frente a la secuenciación masiva (rho = 0.783), consolidando a esta molécula como un biomarcador técnico y biológicamente consistente en el tejido placentario estudiado. En la fisiología placentaria, hsa-miR-193a-5p ha sido documentado

como un modulador clave de la apoptosis, la migración del trofoblasto y la respuesta al estrés celular. Estudios previos en patologías del desarrollo placentario y pérdidas gestacionales abordan que la sobreexpresión de la familia miR-193a interrumpe la homeostasis del tejido decidual y vellositorio al dirigirse de forma directa contra la vía de Transición Epitelio-Mesenquimal (EMT) actuando sobre la proteína supresora EFNB2 (Efirina-B2) incrementando la permeabilidad de la placenta (Li, N. et al., 2021). Este enunciado es consistente con su rol descrito en la regulación de procesos como apoptosis, control del ciclo celular y respuesta al estrés, mediante la modulación de genes como MCL1 y Cyclin D1 (Ouyang et al., 2014; Li, N. et al., 2021). En el contexto placentario, estos procesos son particularmente relevantes, dado que la inducción de apoptosis en el sinciciotrofoblasto ha sido propuesta como un mecanismo facilitador de la transmisión de patógenos (Burton & Jauniaux, 2018). Este resultado concuerda con lo reportado por Shen et al. (2024), quienes identificaron a hsa-miR-193a-5p como uno de los miARNs dependientes del tiempo más dinámicos durante el periodo peri-implantacional y el desarrollo gestacional temprano en plasma materno y placenta.

En la fisiología del desarrollo fetal y placentario, la regulación al alza de hsa-miR-187-3p que en este estudio exhibió una marcada tendencia hacia la sobreexpresión en el grupo de madres transmisoras (FC = 3.62; $|\log_2 FC| = 1.86$; ($p = 0.059$) ha sido vinculada directamente con la inhibición de la vía PI3K/AKT y la supresión del factor de transcripción BCL6 (B-cell CLL/lymphoma 6). La represión de este gen blanco altera la transición epitelio-mesenquimal (EMT) y suprime la migración e invasión fisiológica del trofoblasto (Chen et al., 2022). Adicionalmente, se ha

documentado que la desregulación de esta vía impacta la secreción controlada de metaloproteinasas de matriz, desestabilizando el citoesqueleto celular. En el marco de la enfermedad de Chagas congénita, el incremento concomitante de hsa-miR-193a-5p (estadísticamente significativo) y hsa-miR-187-3p (con fuerte tendencia al alza) sugiere una sinergia molecular orientada a inducir apoptosis y desestructurar las uniones celulares en las vellosidades coriales. Esta acción concertada comprometería la función de filtrado mecánico descrita por Burton & Jauniaux (2018), facilitando físicamente el paso transplacentario de los trypomastigotes de *Trypanosoma cruzi* hacia la circulación fetal.

Análisis de Tendencias de la Batería Global de miARNs

El comportamiento del resto de la batería molecular complementa este panorama inflamatorio y de remodelación estructural, aportando información relevante pese a la ausencia de significancia estadística convencional. Casos particulares como hsa-miR-455-5p exhibieron una notable estabilidad en su tendencia al alza, registrando un Fold Change de 3.15 $|\log_2 FC| = 1.65$; ($p = 0.518$). De igual manera, hsa-miR-155-5p mostró un comportamiento discretamente ascendente al pasar de una expresión promedio de 1.43 a 1.59, con un Fold Change de 1.11 $|\log_2 FC| = 0.15$; ($p = 0.364$). En contraste con estas tendencias al incremento, se identificaron moléculas con sutiles perfiles de regulación a la baja; específicamente, hsa-miR-526b-3p y hsa-miR-99b-5p exhibieron disminuciones en el grupo de madres transmisoras con Fold Changes de 0.73 $|\log_2 FC| = -0.45$; ($p = 0.240$) y 0.62 $|\log_2 FC| = -0.69$; ($p = 0.240$), respectivamente. Finalmente, las moléculas con mayores

niveles de abundancia basal en el tejido placentario, tales como hsa-miR-515-5p $|\log_2 FC|$ =0.03; (p = 0.699) y hsa-miR-512-3p $|\log_2 FC|$ = 0.09; (p = 0.606), mantuvieron perfiles de expresión relativa marcadamente estables y homogéneos entre ambos grupos experimentales.

A pesar de la falta de significancia matemática provocada por las limitaciones del tamaño muestral sobre las pruebas basadas en rangos, la magnitud de sus cambios de pliegue sugiere una relevancia biológica subyacente en el microambiente placentario de las madres transmisoras. Desde una perspectiva funcional, hsa-miR-455-5p es un miARN sensible a la hipoxia involucrado en la diferenciación del citotrofoblasto y la respuesta al estrés celular (Lalevée et al., 2014). En el contexto de la transmisión congénita de Chagas, donde la infección por Trypanosoma cruzi altera activamente la dinámica de recambio de la barrera placentaria (Mezzano et al., 2022), su sobreexpresión sostenida podría actuar como un mecanismo celular compensatorio frente al daño tisular severo. Por su parte, la estabilidad observada en el cluster cromosómico 19 (C19MC), representado aquí por la copiosa abundancia basal de hsa-miR-515-5p y hsa-miR-512-3p, sugiere la preservación de funciones regulatorias estructurales y de inmunotolerancia placentaria esenciales, las cuales operan de manera constitutiva e invariable ante el estímulo parasitario (Mouillet etal., 2025).

En conjunto, las sutiles represiones de hsa-miR-526b-3p y hsa-miR-99b-5p, sumadas al comportamiento discretamente ascendente de hsa-miR-155-5p, un miARN clásicamente vinculado a perfiles de respuesta inflamatoria e inmunidad

celular, denotan un ajuste fino y altamente selectivo en la maquinaria transripcional post-traduccional del tejido en respuesta a la infección activa.

Heterogeneidad placentaria y relevancia biológica de la muestra 366

Al contrastar los hallazgos de la muestra 366, muestra que no fue secuenciada pero incorporada para el análisis RT-qPCR, con el perfil clínico y epidemiológico de las madres transmisoras, se determinó que las cuatro madres transmisoras restantes exhibieron una notable homogeneidad demográfica y obstétrica. Este subgrupo se caracterizó por una mediana de edad de 29.0 años [RIC: 25.2 - 32.5] y una procedencia exclusiva del departamento de Santa Cruz (Klein *et al.*, 2021). Desde la perspectiva de la salud materna, este grupo clínico estuvo notablemente libre de comorbilidades gestacionales agudas o síndromes de disfunción endotelial, registrándose de forma aislada la paciente 439 con hipertensión pregestacional, la 675 con diagnóstico previo de VIH y la 872 con antecedentes de aborto espontáneo, sin manifestar cuadros de preeclampsia.

Este perfil de baja interferencia sistémica contrasta drásticamente con el grupo de madres no transmisoras, el cual exhibió una elevada carga de morbilidad durante el embarazo, incluyendo tres casos de obesidad pregestacional (294, 729 y 775), la muestra 775 con preeclampsia, la 705 con hipertensión gestacional y tres infecciones agudas independientes (747 toxoplasmosis, 753 influenza y 819 COVID-19), además de un antecedente de aborto en la paciente 747. La ausencia de estas patologías e interferencias inflamatorias en el grupo transmisor robustece

las inferencias del estudio, evidenciando que las firmas transcriptómicas y el reajuste de miARNs clave como hsa-miR-193a-5p, hsa-miR-187-3p responderían posiblemente al estímulo infectivo vertical de *T. cruzi* y no a respuestas inmunes inespecíficas inducidas por coinfecciones o disfunciones vasculares reportadas de la placenta (Klein et al., 2021).

Concordancia Técnica: SmallRNA-Seq vs. RT-qPCR

Finalmente, la alta concordancia matemática observada en el análisis de correlación no paramétrica de Spearman (rho = 0.783); (p = 0.012); (n = 14) entre la secuenciación masiva (SmallRNA-Seq) y la RT-qPCR consolida la robustez metodológica de este estudio. En el ámbito del perfilamiento de miARNs, la verificación cruzada interplataforma es un requisito crítico debido a los sesgos intrínsecos de cada tecnología, tales como las preferencias de ligación de adaptadores durante la preparación de librerías en RNA-Seq y las variaciones en la eficiencia de retrotranscripción en qPCR (Mantione, K. J., 2014; Hong et al., 2021). Un coeficiente de Spearman superior a 0.70 es considerado en la literatura indexada como un indicador sobresaliente de fidelidad técnica, demostrando que la direccionalidad y magnitud de los cambios de pliegue $|\log_2 FC|$ detectados se preservan con precisión (Mestdagh et al., 2014). Esta consistencia interplataforma mitiga el riesgo de falsos positivos derivados de artefactos técnicos de amplificación, confiriendo un elevado grado de certidumbre científica a los perfiles de desregulación molecular identificados en la placenta bajo el contexto de la infección por *Trypanosoma cruzi*.

No obstante, a pesar de esta sólida correlación global, es imperativo discutir las marcadas discordancias individuales observadas en ciertos candidatos, un fenómeno ampliamente documentado en la literatura ómica interplataforma. El caso más crítico en este estudio corresponde a hsa-miR-375-3p, el cual fue identificado en el análisis de SmallRNA-Seq como una de las moléculas con mayor sobreexpresión y significancia estadística en el grupo de madres transmisoras ($p = 1.21 \times 10^{-8}$; $p\text{-adj} = 1.08 \times 10^{-5}$). En marcado contraste, la cuantificación dirigida mediante RT-qPCR reveló un perfil refractario a dicha sobreexpresión, exhibiendo una tendencia discreta a la baja al punto de ser clasificado por la plataforma multiparámetrica RefFinder dentro del Top 3 de estabilidad general para la normalización del tejido.

Esta falta de reproducibilidad individual responde a sesgos fisicoquímicos e instrumentales intrínsecos. Por un lado, la preparación de librerías para SmallRNA-Seq introduce sesgos de ligación severos debido a la selectividad de las ARN ligasas por secuencias primarias y estructuras secundarias específicas en los extremos de determinados miARNs abundantes, lo que genera sobrerrepresentaciones artificiales de lecturas (library preparation bias) (Mantione, K. J., 2014; Hong et al., 2021). Por otro lado, las plataformas de RT-qPCR exhiben una sensibilidad extrema frente a variaciones de nucleótido único o modificaciones post-transcripcionales (isomiRs). Si la infección placentaria por *Trypanosoma cruzi* altera la abundancia de variantes no canónicas de hsa-miR-375-3p, estas pueden disminuir la eficiencia de hibridación de los cebadores dirigidos, estabilizando el valor final de cuantificación. Lejos de invalidar el set de referencia, la oscilación a la baja de hsa-

miR-375-3p es contrarrestada por los incrementos proporcionales de sus pares hsa-miR-498-3p y hsa-miR-95-3p. Las herramientas de consenso como RefFinder premian esta dinámica de estabilidad sinérgica o compensatoria (Mestdagh et al., 2014; Xie et al., 2023), demostrando que las desviaciones individuales se cancelan recíprocamente al calcular la media geométrica de sus rankings. Este equilibrio geométrico multi-miARN valida rigurosamente la solidez del Factor de Normalización empleado y subraya la necesidad mandatoria impuesta por las directrices internacionales MIQE de realizar validaciones por RT-qPCR antes de postular biomarcadores basados exclusivamente en predicciones ómicas globales (Bustin et al., 2009).

Limitaciones del estudio

El presente trabajo posee ciertas restricciones metodológicas y analíticas que deben ser tomadas en consideración al interpretar las tendencias descritas. En primer lugar, el tamaño muestral de la cohorte constituye una limitación importante, ya que reduce el poder estadístico para detectar cambios de magnitud leve a moderada mediante pruebas no paramétricas basadas en rangos. Asimismo, la naturaleza exploratoria del diseño limita la inferencia causal directa, mientras que las diferencias metodológicas con los ensayos ex vivo reportados en la literatura dificultan la realización de comparaciones directas. A estas limitantes se suma la ausencia de datos sobre la carga parasitaria en la sangre periférica de la madre al momento del parto.

De igual manera, el estudio no cuenta con la genotipificación molecular directa de *Trypanosoma cruzi* a partir del ADN extraído de las vellosidades placentarias o de las muestras de los lactantes. Aunque la literatura epidemiológica regional describe una dominancia casi absoluta del clon híbrido TcV en los casos congénitos de Santa Cruz, la imposibilidad de confirmar individualmente las Unidades Discretas de Tipificación (DTUs) infectantes impide evaluar la presencia de variaciones biológicas extremas que responden a la presencia de linajes parasitarios minoritarios o infecciones mixtas con cinéticas de replicación e inmunomodulación diferenciales.

Finalmente, el uso de biopsias de tejido placentario completo introduce un sesgo de heterogeneidad celular (coexistencia de trofoblasto, células de Hofbauer y endotelio vascular). No obstante estas restricciones, el uso de muestras placentarias provenientes de infecciones naturales representa una fortaleza significativa de la investigación, al reflejar con mayor fidelidad el contexto fisiopatológico real de la transmisión vertical.

VII) CONCLUSIONES

1) Se identificó un perfil molecular postranscripcional específica en el tejido placentario humano aparentemente asociado a la transmisión congénita de la enfermedad de Chagas evidenciando el potencial de los miARNs como potenciales biomarcadores de Chagas Congénito.

2) La exploración mediante secuenciamiento de ARNs pequeños (smallRNA-seq) permitió identificar que la transmisión vertical de *T.cruzi* promueve una reprogramación postranscripcional detectable en la placenta humana, permitiendo distinguir perfiles de expresión molecular diferenciales entre madres transmisoras y no transmisoras.

3) El análisis bioinformático exploratorio priorizó con éxito los miARNs candidatos bajo los criterios de corte de $|\log_2 FC| > 1$ y $p < 0.05$, consolidando a hsa-miR-193a-5p y hsa-miR-375-3p como las moléculas con mayor consistencia estadística para la fase de confirmación técnica.

4) La confirmación por RT-qPCR demostró una marcada relevancia biológica sujeta a la heterogeneidad de la cohorte; candidatos como hsa-miR-193a-5p y hsa-miR-187-3p exhibieron tendencias de expresión resaltante cuya significancia estadística final se ve modulada por la dispersión biológica, requiriendo una posterior validación en una cohorte independiente con un mayor número de muestras.

VIII) REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

Anders, S., McCarthy, D. J., Chen, Y., Okoniewski, M., Smyth, G. K., Huber, W., & Robinson, M. D. (2013). Count-based differential expression analysis of RNA sequencing data using R and Bioconductor. *Nature Protocols*, *8*(9), 1765–1786. https://doi.org/10.1038/NPROT.2013.099

Andersen, C. L., Jensen, J. L., & Ørntoft, T. F. (2004). Normalization of real-time quantitative reverse transcription-PCR data: a model-based variance estimation approach to identify genes suited for normalization, applied to bladder and colon cancer data sets. *Cancer Research*, *64*(15), 5245–5250. https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-04-0496

Andrade, L. O., & Andrews, N. W. (2005). The Trypanosoma cruzi-host-cell interplay: location, invasion, retention. *Nature Reviews. Microbiology*, *3*(10), 819–823. https://doi.org/10.1038/nrmicro1249

Azogue, E., La Fuente, C., & Darras, C. (1985). Congenital Chagas' disease in Bolivia: epidemiological aspects and pathological findings. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene, 79(2), 176–180. https://doi.org/10.1016/0035-9203(85)90328-1

Bartel, D. P. (2009). MicroRNAs: Target Recognition and Regulatory Functions. *Cell*, *136*(2), 215–233. https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.01.002

Bartel, D. P. (2018). Metazoan MicroRNAs. *Cell*, *173*(1), 20–51. https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.03.006

Blighe, K., Rana, S., & Lewis, M. (2024). EnhancedVolcano: Publication-ready volcano plots with enhanced colouring and labeling. R package version 1.22.0.https://github.com/kevinblighe/EnhancedVolcano

Brenière, S. F., Waleckx, E., y Barnabé, C. (2016). Over Six Thousand *Trypanosoma cruzi* Strains Classified into Discrete Typing Units (DTUs): Attempt at an Inventory. PLOS Neglected Tropical Diseases, 10(8), e0004792. https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004792.

Burton, G. J., & Fowden, A. L. (2015). The placenta: a multifaceted, transient organ. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, *370*(1663), 20140066. https://doi.org/10.1098/RSTB.2014.0066

Burton, G. J., & Jauniaux, E. (2018). Pathophysiology of placental-derived fetal growth restriction. American journal of obstetrics and gynecology, 218(2S), S745–S761. https://doi.org/10.1016/j.ajog.2017.11.577

Bustin, S. A., Benes, V., Garson, J. A., Hellemans, J., Huggett, J., Kubista, M., Mueller, R., Nolan, T., Pfaffl, M. W., Shipley, G. L., Vandesompele, J., & Wittwer, C. T. (2009). The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. Clinical chemistry, 55(4), 611–622. https://doi.org/10.1373/clinchem.2008.112797

Carlier, Y., Altcheh, J., Angheben, A., Freilij, H., Luquetti, A. O., Schijman, A. G., Segovia, M., Wagner, N., & Vinas, P. A. (2019). Congenital Chagas disease: Updated recommendations for prevention, diagnosis, treatment, and follow-up of newborns and siblings, girls, women of childbearing age, and pregnant women. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, *13*(10). https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PNTD.0007694

Carlier, Y., Torrico, F., Sosa-Estani, S., Russomando, G., Luquetti, A., Freilij, H., & Vinas, P. (2011). Congenital Chagas Disease: Recommendations for Diagnosis, Treatment and Control of Newborns, Siblings and Pregnant Women. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, *5*(10), e1250. https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0001250

Castillo, C., Muñoz, L., Carrillo, I., Liempi, A., Gallardo, C., Galanti, N., Maya, J. D., & Kemmerling, U. (2017). Ex vivo infection of human placental chorionic villi explants with Trypanosoma cruzi and Toxoplasma gondii induces different Toll-like receptor expression and cytokine/chemokine profiles. *American Journal of Reproductive Immunology (New York, N.Y. : 1989)*, *78*(1). https://doi.org/10.1111/AJI.12660

Cheloufi, S., Dos Santos, C. O., Chong, M. M. W., & Hannon, G. J. (2010). A dicer-independent miRNA biogenesis pathway that requires Ago catalysis. *Nature*, *465*(7298), 584–589. https://doi.org/10.1038/NATURE09092

Chen, X., Song, Q. L., Ji, R., Wang, J. Y., Li, Z. H., Guo, D., Yin, T. L., Wang, S. J., & Yang, J. (2022). MiR-187 regulates the proliferation, migration and invasion of human trophoblast cells by repressing BCL6-mediated activation of PI3K/AKT signaling. Placenta, 118, 20–31. https://doi.org/10.1016/j.placenta.2022.01.001

Conesa, A., Madrigal, P., Tarazona, S., Gomez-Cabrero, D., Cervera, A., McPherson, A., Szcześniak, M. W., Gaffney, D. J., Elo, L. L., Zhang, X., & Mortazavi, A. (2016). A survey of best practices for RNA-seq data analysis. *Genome Biology*, *17*(1). https://doi.org/10.1186/S13059-016-0881-8

Delorme-Axford, E., Donker, R. B., Mouillet, J. F., Chu, T., Bayer, A., Ouyang, Y., Wang, T., Stolz, D. B., Sarkar, S. N., Morelli, A. E., Sadovsky, Y., & Coyne, C. B. (2013). Human placental trophoblasts confer viral resistance to recipient cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *110*(29), 12048–12053. https://doi.org/10.1073/pnas.1304718110

Duaso, J., Rojo, G., Cabrera, G., Galanti, N., Bosco, C., Maya, J. D., Morello, A., & Kemmerling, U. (2010). Trypanosoma cruzi induces tissue disorganization and destruction of chorionic villi in an ex vivo infection model of human placenta. *Placenta*, *31*(8), 705–711. https://doi.org/10.1016/J.PLACENTA.2010.05.007

Duaso, J., Rojo, G., Jaña, F., Galanti, N., Cabrera, G., Bosco, C., López-Muñoz, R., Maya, J. D., Ferreira, J., & Kemmerling, U. (2011). Trypanosoma cruzi induces apoptosis in ex vivo infected human chorionic villi. *Placenta*, *32*(5), 356–361. https://doi.org/10.1016/J.PLACENTA.2011.02.005

Ewels, P., Magnusson, M., Lundin, S., & Käller, M. (2016). MultiQC: summarize analysis results for multiple tools and samples in a single report. Bioinformatics (Oxford, England), 32(19), 3047–3048. https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btw354

Fabbri, M., Garzon, R., Cimmino, A., Liu, Z., Zanesi, N., Callegari, E., Liu, S., Alder, H., Costinean, S., Fernandez-Cymering, C., Volinia, S., Guler, G., Morrison, C. D., Chan, K. K., Marcucci, G., Calin, G. A., Huebner, K., & Croce, C. M. (2007). MicroRNA-29 family reverts aberrant methylation in lung cancer by targeting DNA methyltransferases 3A and 3B. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *104*(40), 15805–15810. https://doi.org/10.1073/PNAS.0707628104

Ferreira, L. R. P., Ferreira, F. M., Laugier, L., Cabantous, S., Navarro, I. C., Da Silva Cândido, D., Rigaud, V. C., Real, J. M., Pereira, G. V., Pereira, I. R., Ruivo, L., Pandey, R. P., Savoia, M., Kalil, J., Lannes-Vieira, J., Nakaya, H., Chevillard, C., & Cunha-Neto, E. (2017). Integration of miRNA and gene expression profiles suggest a role for miRNAs in the pathobiological processes of acute Trypanosoma cruzi infection. *Scientific Reports 2017 7:1*, *7*(1), 17990-. https://doi.org/10.1038/s41598-017-18080-9

Friedländer, M. R., Chen, W., Adamidi, C., Maaskola, J., Einspanier, R., Knespel, S., & Rajewsky, N. (2008). Discovering microRNAs from deep sequencing data using miRDeep. *Nature Biotechnology*, *26*(4), 407–415. https://doi.org/10.1038/nbt1394

Fu, G., Brkić, J., Hayder, H., & Peng, C. (2013). MicroRNAs in Human Placental Development and Pregnancy Complications. *International Journal of Molecular Sciences 2013, Vol. 14, Pages 5519-5544*, *14*(3), 5519–5544. https://doi.org/10.3390/ijms14035519

Fu, G., Ye, G., Nadeem, L., Ji, L., Manchanda, T., Wang, Y., Zhao, Y., Qiao, J., Wang, Y. L., Lye, S., Yang, B. B., & Peng, C. (2013). MicroRNA-376c impairs transforming growth factor-β and nodal signaling to promote trophoblast cell proliferation and invasion. *Hypertension (Dallas, Tex. : 1979)*, *61*(4), 864–872. https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.111.203489

Guerrero-Muñoz, J., Medina, L., Castillo, C., Liempi, A., Fernández-Moya, A., Araneda, S., Ortega, Y., Rojas-Pirela, M., Maya, J. D., & Kemmerling, U. (2023). MicroRNA-512-3p mediates Trypanosoma cruzi-induced apoptosis during ex vivo infection of human placental explants. *Placenta*, *143*, 117–123. https://doi.org/10.1016/j.placenta.2023.10.009

Ha, M., & Kim, V. N. (2014). Regulation of microRNA biogenesis. *Nature Reviews Molecular Cell Biology 2014 15:8*, *15*(8), 509–524. https://doi.org/10.1038/nrm3838

Hart, S. N., Therneau, T. M., Zhang, Y., Poland, G. A., & Kocher, J. P. (2013). Calculating sample size estimates for RNA sequencing data. *Journal of Computational Biology : A Journal of Computational Molecular Cell Biology*, *20*(12), 970–978. https://doi.org/10.1089/cmb.2012.0283

He, L., & Hannon, G. J. (2004). MicroRNAs: small RNAs with a big role in gene regulation. *Nature Reviews. Genetics*, *5*(7), 522–531. https://doi.org/10.1038/nrg1379

Heazell, A. E. P., & Crocker, I. P. (2008). Live and Let Die – Regulation of Villous Trophoblast Apoptosis in Normal and Abnormal Pregnancies. *Placenta*, *29*(9), 772–783. https://doi.org/10.1016/J.PLACENTA.2008.07.003

Hong, L. Z., Zhou, L., Zou, R., Khoo, C. M., Chew, A. L. S., Chin, C., & Shih, S. (2021). Systematic evaluation of multiple qPCR platforms, NanoString and miRNA-Seq for microRNA biomarker discovery in human biofluids. Scientific Reports, 11(1), 4435. https://doi.org/10.1038/s41598-021-83365-z

Kemmerling, U., Osuna, A., Schijman, A. G., & Truyens, C. (2019). Congenital Transmission of Trypanosoma cruzi: A Review About the Interactions Between the Parasite, the Placenta, the Maternal and the Fetal/Neonatal Immune Responses. *Frontiers in Microbiology*, *10*(AUG). https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01854

Klein, M. D., Tinajeros, F., Del Carmen Menduiña, M., Málaga, E., Condori, B. J., Verástegui, M., Urquizu, F., Gilman, R. H., & Bowman, N. M. (2021). Risk Factors for Maternal Chagas Disease and Vertical Transmission in a Bolivian Hospital. Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America, 73(7), e2450–e2456. https://doi.org/10.1093/cid/ciaa1885

Koga, K., Izumi, G., Mor, G., Fujii, T., & Osuga, Y. (2014). Toll-like receptors at the maternal-fetal interface in normal pregnancy and pregnancy complications.

American Journal of Reproductive Immunology, *72*(2), 192–205. https://doi.org/10.1111/AJI.12258;SUBPAGE:STRING:ACCESS

Kozomara, A., Birgaoanu, M., & Griffiths-Jones, S. (2019). miRBase: from microRNA sequences to function. *Nucleic Acids Research*, *47*(D1), D155–D162. https://doi.org/10.1093/nar/gky1141

Lalevée, S., Lapaire, O., & Bühler, M. (2014). miR455 is linked to hypoxia signaling and is deregulated in preeclampsia. Cell Death And Disease, 5(9), e1408. https://doi.org/10.1038/cddis.2014.368

Lee, Y., Kim, M., Han, J., Yeom, K. H., Lee, S., Baek, S. H., & Kim, V. N. (2004). MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. The EMBO journal, 23(20), 4051–4060. https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7600385

Li, N., Hou, R., Yang, T., Liu, C., & Wei, J. (2021). miR-193a-3p Mediates Placenta Accreta Spectrum Development by Targeting EFNB2 via Epithelial-Mesenchymal Transition Pathway Under Decidua Defect Conditions. *Frontiers in Molecular Biosciences*, *7*, 613802. https://doi.org/10.3389/fmolb.2020.613802

Li, Q., Wei, X., Zhang, Y., Zeng, W., & Lin, Y. (2025). Trophoblast adaptation to hypoxia: balance and dysfunction. Cell communication and signaling : CCS, 23(1), 538. https://doi.org/10.1186/s12964-025-02531-2

Love, M. I., Huber, W., & Anders, S. (2014). Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biology*, *15*(12). https://doi.org/10.1186/S13059-014-0550-8

Mantione, K. J., Kream, R. M., Kuzelova, H., Ptacek, R., Raboch, J., Samuel, J. M., & Stefano, G. B. (2014). Comparing bioinformatic gene expression profiling methods: microarray and RNA-Seq. Medical science monitor basic research, 20, 138–142. https://doi.org/10.12659/MSMBR.892101

Medina, L., Castillo, C., Liempi, A., Guerrero-Muñoz, J., Rojas-Pirela, M., Maya, J. D., Prieto, H., & Kemmerling, U. (2020). Trypanosoma cruzi and Toxoplasma gondii Induce a Differential MicroRNA Profile in Human Placental Explants. *Frontiers in Immunology*, *11*. https://doi.org/10.3389/FIMMU.2020.595250

Medina, L., Guerrero-Muñoz, J. A., Liempi, A. I., Castillo, C., Ortega, Y., Sepúlveda, A., Salomó, F., Maya, J. D., & Kemmerling, U. (2022). Ex Vivo Infection of Human Placental Explants by Trypanosoma cruzi Reveals a microRNA Profile Similar to That Seen in Trophoblast Differentiation. *Pathogens (Basel, Switzerland)*, *11*(3). https://doi.org/10.3390/pathogens11030361

Mestdagh, P., Van Vlierberghe, P., De Weer, A., Muth, D., Westermann, F., Speleman, F., & Vandesompele, J. (2009). A novel and universal method for microRNA RT-qPCR data normalization. *Genome Biology*, *10*(6). https://doi.org/10.1186/GB-2009-10-6-R64

Metzker, M. L. (2010). Sequencing technologies the next generation. *Nature Reviews Genetics*, *11*(1), 31–46. https://doi.org/10.1038/nrg2626

Mezzano, L., Morán, J. P., Moreira-Espinoza, M. J., Triquell, M. F., Mezzano, J., Díaz-Luján, C. M., & Fretes, R. E. (2022). Chagas disease affects the human placental barrier's turnover dynamics during pregnancy. Memórias Do Instituto Oswaldo Cruz, 117, e210304. https://doi.org/10.1590/0074-02760210304

Mor, G., & Cardenas, I. (2010). The Immune System in Pregnancy: A Unique Complexity. *American Journal of Reproductive Immunology*, *63*(6), 425–433. https://doi.org/10.1111/j.1600-0897.2010.00836.x

Morales-Prieto, D. M., Chaiwangyen, W., Ospina-Prieto, S., Schneider, U., Herrmann, J., Gruhn, B., & Markert, U. R. (2012a). MicroRNA expression profiles of trophoblastic cells. *Placenta*, *33*(9), 725–734. https://doi.org/10.1016/j.placenta.2012.05.009

Mouillet, J. F., Ouyang, Y., Coyne, C. B., & Sadovsky, Y. (2015). MicroRNAs in placental health and disease. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, *213*(4 0), S163. https://doi.org/10.1016/j.ajog.2015.05.057

Mouillet, J., Ouyang, Y., Sadovsky, E., Kothandan, V. K., Sorenson, H. L., Badeau, L. J., Sarkar, S. N., Chu, T., Sorkin, A., & Sadovsky, Y. (2025). The Chromosome 19 miRNA cluster guards trophoblasts against overacting innate immunity. Communications Biology, 8(1), 1511. https://doi.org/10.1038/s42003-025-08923-x

Noguer-Dance, M., Abu-Amero, S., Al-Khtib, M., Lefèvre, A., Coullin, P., Moore, G. E., & Cavaillé, J. (2010). The primate-specific microRNA gene cluster (C19MC) is imprinted in the placenta. *Human Molecular Genetics*, *19*(18), 3566–3582. https://doi.org/10.1093/hmg/ddq272

O'Connell, R. M., Rao, D. S., & Baltimore, D. (2012). microRNA regulation of inflammatory responses. *Annual Review of Immunology*, *30*, 295–312. https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-020711-075013

Ouyang, M., Li, Y., Ye, S., Ma, J., Lu, L., Lv, W., Chang, G., Li, X., Li, Q., Wang, S., & Wang, W. (2014). MicroRNA Profiling Implies New Markers of Chemoresistance of Triple-Negative Breast Cancer. *PLOS ONE*, *9*(5), e96228. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0096228

Peltier, H. J., & Latham, G. J. (2008). Normalization of microRNA expression levels in quantitative RT-PCR assays: identification of suitable reference RNA targets in normal and cancerous human solid tissues. *RNA (New York, N.Y.)*, *14*(5), 844–852. https://doi.org/10.1261/rna.939908

Pfaffl M. W. (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. Nucleic acids research, 29(9), e45. https://doi.org/10.1093/nar/29.9.e45

Pfaffl, M. W., Tichopad, A., Prgomet, C., & Neuvians, T. P. (2004). Determination of stable housekeeping genes, differentially regulated target genes and sample integrity: BestKeeper--Excel-based tool using pair-wise correlations. *Biotechnology Letters*, *26*(6), 509–515. https://doi.org/10.1023/B:BILE.0000019559.84305.47

Rassi, A., Rassi, A., & Marin-Neto, J. A. (2010). Chagas disease. *The Lancet*, *375*(9723), 1388–1402. https://doi.org/10.1016/S0140-6736(10)60061-X

Robbins, J. R., & Bakardjiev, A. I. (2012). Pathogens and the placental fortress. *Current Opinion in Microbiology*, *15*(1), 36–43. https://doi.org/10.1016/J.MIB.2011.11.006

Ruby, J. G., Jan, C. H., & Bartel, D. P. (2007). Intronic microRNA precursors that bypass Drosha processing. *Nature*, *448*(7149), 83–86. https://doi.org/10.1038/NATURE05983

Saito, Y., & Jones, P. A. (2006). Epigenetic activation of tumor suppressor microRNAs in human cancer cells. *Cell Cycle (Georgetown, Tex.)*, *5*(19), 2220–2222. https://doi.org/10.4161/CC.5.19.3340

Salas Clavijo, N. A., Postigo, J. R., Schneider, D., Santalla, J. A., Brutus, L., y Chippaux, J.-P. (2012). Prevalence of Chagas disease in pregnant women and incidence of congenital transmission in Santa Cruz de la Sierra, Bolivia. Acta Tropica, 124(1), 87–91. https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2012.06.012.

Sanchez, L., Messenger, L. A., Bhattacharyya, T., Gilman, R. H., Mayta, H., Colanzi, R., Bozo, R., Verástegui, M., Miles, M. A., & Bern, C. (2022). Congenital Chagas disease in Santa Cruz Department, Bolivia, is dominated by Trypanosoma cruzi lineage V. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene, 116(1), 80–84. https://doi.org/10.1093/trstmh/trab089

Schmittgen, T. D., & Livak, K. J. (2008). Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method. *Nature Protocols 2008 3:6*, *3*(6), 1101–1108. https://doi.org/10.1038/nprot.2008.73

Shen, L., Zeng, H., Fu, Y. *et al*. (2024) Specific plasma microRNA profiles could be potential non-invasive biomarkers for biochemical pregnancy loss following embryo transfer. BMC Pregnancy Childbirth 24, 351. https://doi.org/10.1186/s12884-024-06488-x

Sosa-Estani, S., & Segura, E. L. (2006). Etiological treatment in patients infected by Trypanosoma cruzi: experiences in Argentina. *Current Opinion in Infectious Diseases*, *19*(6), 583–587. https://doi.org/10.1097/01.qco.0000247592.21295.a5

Telleria, J., & Costales, J. A. (2025). An Overview of *Trypanosoma cruzi* Biology Through the Lens of Proteomics: A Review. *Pathogens 2025, Vol. 14, Page 337, 14*(4), 337. https://doi.org/10.3390/PATHOGENS14040337

Tinajeros F, Rodríguez-Olguin BA, Cutshaw MK(2024). Prevalence of Maternal Chagas Disease and Vertical Transmission Rates in Bolivia: A Systematic Review and Meta-Analysis. The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene. 110(4):663-668. doi:10.4269/ajtmh.23-0579

Vandesompele, J., De Preter, K., Pattyn, F., Poppe, B., Van Roy, N., De Paepe, A., & Speleman, F. (2002). Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biology*, *3*(7). https://doi.org/10.1186/gb-2002-3-7-research0034

Wang, Z., Gerstein, M., & Snyder, M. (2009). RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics. *Nature Reviews. Genetics*, *10*(1), 57–63. https://doi.org/10.1038/nrg2484

Winter, J., Jung, S., Keller, S., Gregory, R. I., & Diederichs, S. (2009). Many roads to maturity: microRNA biogenesis pathways and their regulation. *Nature Cell Biology*, *11*(3), 228–234. https://doi.org/10.1038/NCB0309-228

Xie, C., Künzel, S., Zhang, W., Hathaway, C. A., Tworoger, S. S., y Tautz, D. (2025). Patterns of extreme outlier gene expression suggest an edge of chaos effect in transcriptomic networks. Genome Biology, 26, Artículo 272. https://doi.org/10.1186/s13059-025-03709-0

Xie, F., Wang, J., & Zhang, B. (2023). RefFinder: a web-based tool for comprehensively analyzing and identifying reference genes. Functional &

Integrative Genomics, 23(2), 125. https://doi.org/10.1007/s10142-023-01055-7

Zingales B. (2018). Trypanosoma cruzi genetic diversity: Something new for something known about Chagas disease manifestations, serodiagnosis and drug sensitivity. Acta tropica, 184, 38–52. https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2017.09.017

Zoubir K, Descamps V, Aubry A, Helle F, Francois C, Castelain S, Brochot E and Demey B (2023) Comparison of two RT-qPCR methods targeting BK polyomavirus microRNAs in kidney transplant recipients. Front. Med. 10:1281625. doi: 10.3389/fmed.2023.1281625

Zuma, A. A., dos Santos Barrias, E., & de Souza, W. (2020). Basic Biology of Trypanosoma cruzi. *Current Pharmaceutical Design*, *27*(14), 1671–1732. https://doi.org/10.2174/1381612826999201203213527