



**UNIVERSIDAD DE CHILE**  
**FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS**  
**ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS**



***TRYPANOSOMA CRUZI* INDUCE DESORGANIZACIÓN  
TISULAR EN VELLOSIDADES CORIÓNICAS PLACENTARIAS  
HUMANAS EN UN MODELO DE INFECCIÓN *EX VIVO***

**JUAN GABRIEL DUASO INOSTROSA**

Memoria para optar al Título  
Profesional de Médico Veterinario.  
Departamento de Medicina Preventiva  
Animal.

**PROFESOR GUÍA: ULRIKE KEMMERLING, MSc, PhD.**

Financiamiento: Proyectos Bicentenario Anillo ACT 29 y ACT 112, Bicentenario Redes de Cooperación  
entre Anillos RED 07, Fondecyt 1180166

**SANTIAGO, CHILE**

**2010**



UNIVERSIDAD DE CHILE



FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS  
ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS

**TRYPANOSOMA CRUZI INDUCE DESORGANIZACIÓN TISULAR  
EN VELLOSIDADES CORIÓNICAS PLACENTARIAS HUMANAS EN  
UN MODELO DE INFECCIÓN EX VIVO**

**JUAN GABRIEL DUASO INOSTROSA**

Memoria para optar al Título  
Profesional de Médico Veterinario  
Departamento de Medicina Preventiva Animal

NOTA FINAL: .....

		NOTA	FIRMA
PROFESOR GUÍA:	ULRIKE KEMMERLING WEIS	7.0 (siete coma cero)	
PROFESOR CONSEJERO:	NORBEL GALANTI GARRONE	7.0 (siete coma cero)	
PROFESOR CONSEJERO:	FERNANDO FREDES MARTINEZ	7.0 (siete coma cero)	

SANTIAGO – CHILE

## INDICE

<b>RESUMEN</b> .....	<b>4</b>
<b>SUMMARY</b> .....	<b>5</b>
<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>6</b>
<b>REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA</b> .....	<b>7</b>
<i>Trypanosoma cruzi</i> .....	8
Manifestaciones clínicas de la enfermedad de Chagas .....	11
Fase aguda.....	11
Fase crónica .....	11
Diagnóstico .....	12
Enfermedad de Chagas Congénita.....	12
Interacción entre <i>T. cruzi</i> y MEC del hospedero: .....	17
Infección de vellosidades coriónicas placentarias por <i>T. cruzi</i> .....	21
<b>HIPOTESIS</b> .....	<b>23</b>
<b>OBJETIVO GENERAL</b> .....	<b>24</b>
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	24
<b>MATERIAL Y MÉTODOS</b> .....	<b>25</b>
Cultivos celulares.....	25
Obtención de formas infectivas de <i>T. cruzi</i> .....	25
Obtención de placentas .....	25
Técnicas histológicas.....	26
Inmunohistoquímica.....	29
Inmunofluorescencia.....	30
TUNEL.....	31
Extracción y cuantificación de DNA.....	32
Reacción de polimerasa en cadena (PCR).....	33
Determinación de actividad enzimática tipo caspasa – 3 .....	33
Análisis estadístico .....	34
Bioseguridad.....	34
Bioética.....	34

<b>RESULTADOS .....</b>	<b>35</b>
Estandarización del modelo de infección de vellosidades coriónicas de placenta humana <i>ex vivo</i> por tripomastigotes de <i>T. cruzi</i> .....	35
Determinación de alteraciones histopatológicas en los distintos compartimentos de las vellosidades coriónicas humanas infectadas <i>ex vivo</i> con <i>T. cruzi</i> .....	36
<i>T. cruzi</i> induce destrucción y desprendimiento del sinciciotrofoblasto .....	36
<i>T. cruzi</i> induce desorganización y destrucción selectiva de las láminas basales .....	37
<i>T. cruzi</i> induce degradación y desorganización de colágeno I de la MEC del tejido conectivo fetal .....	39
<i>T. cruzi</i> induce apoptosis en las vellosidades coriónicas infectadas <i>ex vivo</i>	40
<b>DISCUSIÓN .....</b>	<b>42</b>
<b>CONCLUSION .....</b>	<b>48</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>63</b>

## INDICE DE FIGURAS

<b>FIGURA 1</b>	Países con enfermedad de Chagas endémica .....	49
<b>FIGURA 2</b>	Tasa de incidencia de la enfermedad de Chagas en Chile .....	50
<b>FIGURA 3</b>	Ciclo biológico de <i>T. cruzi</i> . .....	51
<b>FIGURA 4</b>	Formas celulares de <i>T. cruzi</i> .....	52
<b>FIGURA 5</b>	Barrera placentaria .....	53
<b>FIGURA 6</b>	Detección de <i>T. cruzi</i> en vellosidades coriónicas infectadas <i>ex vivo</i> con el parásito .....	54
<b>FIGURA 7</b>	Análisis histopatológico de vellosidades coriónicas infectadas <i>ex vivo</i> con <i>T. cruzi</i> .....	55
<b>FIGURA 8</b>	<i>T. cruzi</i> induce destrucción y desprendimiento del sinciotrofoblasto. ....	56
<b>FIGURA 9</b>	<i>T. cruzi</i> induce disminución de macromoléculas glicosiladas. ....	57
<b>FIGURA 10</b>	<i>T. cruzi</i> induce destrucción selectiva de las láminas basales. ....	58
<b>FIGURA 11</b>	<i>T. cruzi</i> induce destrucción y desorganización de colágeno I en el tejido conectivo fetal. ....	60
<b>FIGURA 12</b>	<i>T. cruzi</i> induce fragmentación de DNA en las vellosidades coriónicas. ....	61
<b>FIGURA 13</b>	<i>T. cruzi</i> induce la generación, mediada por caspasas, de neo-epitopos de citoqueratina 18 .....	62
<b>FIGURA 14</b>	<i>T. cruzi</i> induce actividad tipo caspasa – 3 en vellosidades coriónicas. ....	63

## RESUMEN

La enfermedad de Chagas congénita es una patología endémica en América Latina, la que se presenta con una menor frecuencia en otros países. Se asocia a partos prematuros, abortos y patología placentaria.

Los mecanismos de infección e invasión tisular del parásito *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*) son poco claros. Para estudiar parte de estos mecanismos, se incubaron *ex vivo* explantes de vellosidades coriónicas humanas sanas con el parásito. La infección exitosa de los explantes de vellosidades coriónicas humanas fue determinada por detección del parásito mediante inmunofluorescencia y PCR. Los efectos de la infección con el parásito se determinó mediante métodos inmunohistoquímicos, histoquímicos, bioquímicos y de biología molecular. *T. cruzi* induce destrucción y desprendimiento del sinciotrofoblasto, desorganización selectiva de las láminas basales y desorganización del colágeno I del tejido conectivo fetal. Estos resultados sugieren una actividad proteolítica del parásito sobre las láminas basales y tejido conectivo como mecanismo de infección al feto con *T. cruzi*. Adicionalmente, el parásito induce apoptosis en las vellosidades coriónicas. Los efectos observados son función del número de parásitos utilizados.

## SUMMARY

Congenital Chagas' disease, endemic in Latin America and also present with lower frequency in other countries, is associated with premature labor, miscarriage, and placentitis. The mechanism of tissue invasion and infection of human placenta by the parasite *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*) remains unclear. In order to explore some morphological aspects and apoptosis of this infection in the placenta, we incubated chorionic villous explants from normal human placenta *ex vivo* with the parasite and studied the resulting effects by immunohistochemical, histochemical, biochemical and molecular biology methods. Infection of the chorionic villi with the parasite was confirmed by immunofluorescence and PCR. *T. cruzi* induces syncytiotrophoblast destruction and detachment, selective disorganization of basal lamina and disorganization of collagen I in the connective tissue of villous stroma. Our results suggest a participation of the proteolytic activity of the parasite on the placental basal lamina and connective tissue in the mechanism of infection of the fetus by *T. cruzi*. Additionally, the parasite induces apoptosis in chorionic villi. These effects are a function of the number of parasites used for the infection.

# INTRODUCCIÓN

La enfermedad de Chagas es producida por el protozoo hemoflagelado *Trypanosoma cruzi* del orden Kinetoplastida, familia Trypanosomatidae (World Health Organization, 2002). Este parásito presenta un ciclo de vida indirecto, que tiene a insectos hematófagos (triatominos), como vector biológico, y como hospederos vertebrados a mamíferos, incluido el hombre. En los últimos años la transmisión vectorial ha ido en descenso debido a distintos programas de control de vectores y otras formas de transmisión, como la transmisión congénita, han adquirido importancia epidemiológica (Schmunis, 2007).

La transmisión congénita es vía placenta, donde el parásito debe cruzar la barrera placentaria compuesta por trofoblasto, tejido conectivo fetal y láminas basales que rodean al endotelio de los vasos fetales y que separan al trofoblasto del tejido conectivo fetal (Kemmerling *et al.*, 2010). El modelo de infección *ex vivo* de vellosidades coriónicas con el parásito permite, además de estudiar los mecanismos de transmisión congénita, avanzar en el conocimiento general sobre los mecanismos de infección e invasión tisular del parásito.

Esta memoria estudia algunas de las alteraciones tisulares que ocurren en los distintos compartimentos de las vellosidades coriónicas humanas incubadas con *T. cruzi*. La siguiente hipótesis afirma que: “La infección *ex vivo* con *Trypanosoma cruzi* de vellosidades coriónicas placentarias humanas induce alteraciones tisulares y apoptosis”. Se utilizaron metodologías histológicas convencionales, histoquímicas, inmunofluorescencia e inmunohistoquímicas para estudiar el daño tisular y la muerte celular, así como metodologías de biología molecular para detectar la presencia del *T. cruzi* (para la determinación del tipo de muerte celular inducida en las vellosidades coriónicas se utilizaron las descritas anteriormente y adicionalmente técnicas bioquímicas).



## REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

La enfermedad de Chagas o Tripanosomiasis americana es producida por el protozoo hemoflagelado *Trypanosoma cruzi* (Chagas, 1909) del orden Kinetoplastida, familia Trypanosomatidae. Esta enfermedad está presente en el continente americano desde más de 9000 años (Aufderheide *et al.*, 2004). Actualmente es una de las mayores preocupaciones en materia de salud pública para América Latina, siendo después de la malaria, la enfermedad ligada a vectores, de mayor prevalencia y mortalidad. La enfermedad se extiende desde el paralelo 42° latitud Norte hasta el paralelo 46° latitud Sur, abarcando desde el sur de Estados Unidos hasta el sur de Argentina y Chile (World Health Organization, 2002) **(Fig. 1)**.

Existen por lo menos 28 millones de personas expuestas al riesgo de la infección, estimándose un total de 15 millones de casos (World Health Organization, 2002), cifras con las que Chile contribuye en aproximadamente 150000 casos presumiblemente infectados. Las tasas de incidencia de la enfermedad de Chagas se han mantenido relativamente constante entre los años 1995 y 2005 **(Fig. 2)**. En el último informe del Ministerio de Salud sobre la enfermedad de Chagas en Chile se concluye, que la notificación de esta patología va en aumento, debido básicamente a dos factores: (1) desde el año 1986 la notificación y desde el año 1996 el tamizaje en donantes son obligatorios y (2) debido al mayor interés en la patología desde el año 1991, ya que países del Cono Sur han incentivado diversos programas de control de transmisión vectorial y transfusional (Olea, 1998).

Las áreas endémicas en Chile comprenden desde la Región de Arica y Parinacota a la Región del Libertador Bernardo O'Higgins, incluyendo la Región Metropolitana, donde reside el 67% de la población del país. Aunque es una enfermedad de prevalencia rural y periurbana, la población expuesta en Chile correspondería a 850000 personas (Olea, 1998).

Según la Organización Mundial de la Salud, las tasas de mortalidad varían entre 8 y 12% dependiendo del país estudiado, la edad, estado fisiológico de los pacientes y modalidad de tratamiento recibido (World Health Organization, 2002).

### ***Trypanosoma cruzi***

*Trypanosoma cruzi* es un protozoo hemoflagelado con un ciclo de vida indirecto, que tiene a insectos hematófagos (triatominos), como vector biológico, y como hospederos vertebrados a mamíferos, incluido el hombre. Los principales triatóminos vectores de *T. cruzi* en Sudamérica son *Triatoma infestans* (vinchuca), *Rhodnius prolixus* y *Panstrongylus megistus*. Además de *T. infestans* (ciclo domiciliario), en Chile se encuentran *Mepraia spinolai* y *gajardoi* (ciclo silvestre). (World Health Organization, 2002). Se han descrito tres ciclos de transmisión de la enfermedad: doméstico, peridoméstico y silvestre (Amino *et al.*, 2002).

El ciclo doméstico es el de mayor relevancia para el hombre; se presenta en áreas rurales y periurbanas, generalmente por la picadura de un insecto parasitado por *T. cruzi*. El insecto inmediatamente después de alimentarse deposita sobre la piel del individuo sus deyecciones contaminadas con tripomastigotes metacíclicos (infectivos). Estos ingresan al individuo a través de piel y mucosas, facilitado por el rascado en la zona de la picadura y por enzimas proteolíticas de la saliva del insecto (Amino *et al.*, 2002). Una vez en el torrente sanguíneo, los tripomastigotes son fagocitados por células presentadoras de antígeno, diferenciándose a amastigotes, forma de replicación citoplasmática obligada. Tras cierto número de divisiones, los amastigotes se diferencian a tripomastigotes, lisan las células infectadas, ingresan a la circulación e infectan a los distintos tejidos blanco, como miocardio, músculo esquelético, músculo liso visceral, células de la glía del sistema nervioso central y placenta (Prata, 2001). Cuando un insecto vector se alimenta de un mamífero, los tripomastigotes sanguíneos ingresan al tracto digestivo del insecto y en su intestino medio se diferencian a epimastigotes, estadio replicativo extracelular. Estos epimastigotes, a medida que avanzan en el

tracto intestinal, se replican y luego se diferencian a tripomastigotes metacíclicos, completando así el ciclo de vida de *T. cruzi* (**Fig. 3**) (Tyler y Engman, 2001). En este ciclo de transmisión (doméstico), perros y gatos son los principales reservorios que contribuyen a la mantención de la infección. En el ciclo peridoméstico de la infección, los principales reservorios son roedores domésticos, ganado caprino, bovino, equino y ovino. En el ciclo silvestre o selvático los principales reservorios son mamíferos del hábitat silvestre. Estos animales, aunque de escaso acceso al humano, son los que permiten la mantención del *T. cruzi* e impiden la completa erradicación del parásito (Tyler y Engman, 2001).

Las tres formas celulares que adopta el parásito durante su ciclo biológico, se caracterizan por tamaño y por las posiciones relativas del flagelo, kinetoplasto y núcleo (Prata, 2001):

1. Tripomastigotes: Células de aproximadamente 20 micrómetros de largo, kinetoplasto subterminal y fusiformes. Los tripomastigotes se encuentran en la sangre de los mamíferos y en el intestino posterior de los triatominos. Constituyen la forma infectiva para el mamífero y la forma celular que disemina la infección por vía sanguínea. Es la forma celular no replicativa del parásito (**Fig. 4 A**)
2. Epimastigotes: Células de aproximadamente 20 micrómetros de largo, kinetoplasto anterior al núcleo y fusiformes. Los epimastigotes se encuentran en el intestino de los insectos vectores, donde se multiplican en forma extracelular. La capacidad de replicación extracelular de esta forma celular del parásito ha permitido mantenerlos en cultivos axénicos. (**Fig. 4 B**)
3. Amastigotes: Células de aproximadamente 2 micrómetros de diámetro, esféricas y con flagelo no emergente. Se multiplica dentro de las células del hospedero mamífero hasta producir su ruptura (8 – 9 divisiones celulares). Antes de su liberación de las células del hospedero, los amastigotes se diferencian a tripomastigotes que invaden la sangre, desde la que pueden

ingresar nuevamente a cualquier otra célula nucleada. Los amastigotes pueden cultivarse dentro de células musculares, fibroblastos y macrófagos, de las que se pueden obtener formas tripomastigotes infectivas (Morello *et al.*, 1987; Burleigh y Andrews, 1995; Yoshida, 2006). **(Fig. 4 C)**

*Trypanosoma cruzi* se divide básicamente en dos grupos genéticos divergentes o linajes (*T. cruzi* I y II), que pertenecerían a dos ambientes ecológicos distintos (Di Noia *et al.*, 2002; Freitas *et al.*, 2005; Manoel-Caetano y Silva 2007; Cerqueira *et al.*, 2008). *T. cruzi* I es detectado principalmente en el ciclo selvático, infectando habitualmente a animales silvestres y *T. cruzi* II se asocia con la patología humana (Di Noia *et al.*, 2002; Freitas *et al.*, 2005; Manoel-Caetano y Silva 2007). Además de la forma transmisión vectorial existen otras formas de contagio como las transfusiones sanguíneas, responsable del 10% de los casos en países como EE.UU., donde la creciente inmigración latina ha diseminado la enfermedad (Andrade *et al.*, 2005). El contagio también puede producirse por trasplante de órganos, transmisión congénita en madres chagásicas (Prata, 2001) y a través de la ingesta de alimentos y bebidas contaminadas con excrementos de triatomíneos (Jamison *et al.*, 2006).

Las probabilidades de contraer la enfermedad de Chagas están directamente relacionadas con las condiciones de pobreza de la vivienda. Los triatomíneos se guarecen en grietas y tejados, por lo cual viviendas construidas en forma precaria resultan ideales para este insecto (World Health Organization, 2002). La constante migración campo-ciudad que se ha visto aumentada en los últimos 40 años, ha cambiado el modelo epidemiológico clásico de la Tripanosomiasis americana asociada a viviendas rurales, convirtiéndola en una enfermedad rural y urbana (World Health Organization, 2002).

## **Manifestaciones clínicas de la enfermedad de Chagas**

La enfermedad de Chagas presenta tres fases clínicas, con diferentes signos y síntomas (Atías, 1998):

### **Fase aguda**

Esta fase comienza inmediatamente después del ingreso del parásito. Se caracteriza por una elevada parasitemia, debido a la intensa multiplicación parasitaria en células presentadora de antígenos y la posterior liberación de tripomastigotes a la circulación periférica. Los pacientes pueden presentar manifestaciones de infección generalizada tales como fiebre, anorexia, linfadenopatías regionales, hepato y esplenomegalia moderada, edema bpalpebral unilateral o signo de Romaña y miocarditis. Esta sintomatología es más frecuente en niños.

Sin tratamiento, el 5 – 10% de los pacientes sintomáticos muere a causa de encefalomiелitis o falla cardíaca severa y, raramente, por muerte súbita (Prata, 2001).

### **Fase de latencia**

Los casos de infección aguda que no presentan manifestaciones clínicas pasan a una fase de latencia que puede extenderse por meses e incluso años. En esta fase los parásitos raramente pueden ser detectados en circulación sanguínea, ya que el grado de parasitemia es bajo (Soares *et al.*, 2001).

### **Fase crónica**

La aparición del estado crónico puede tardar años o décadas después de la infección inicial. En áreas endémicas, entre el 15 y 20% de los pacientes manifiestan la fase crónica, la que se asocia a la presencia de megacolon y megaesófago producto de la denervación del sistema nervioso autónomo, arritmia cardíaca y cardiomegalia con insuficiencia progresiva (Prata, 2001) y, un gran

impacto negativo en la capacidad laboral del individuo. En esta etapa, la enfermedad puede ser inhabilitante y causa directa o concurrente de mortalidad. El curso de la enfermedad depende de diferentes factores: carga parasitaria en el sitio de la inoculación, grupo genético y cepa del parásito, primoinfección o reinfección, estado inmunológico del hospedero y tipo de vector (Coura, 2007).

## **Diagnóstico**

El diagnóstico puede hacerse por observación microscópica de los parásitos en sangre fresca durante la fase aguda. Infecciones crónicas requieren de procedimientos diagnósticos más sensibles con amplificación de genes de los parásitos por medio de PCR. Otra opción es el xenodigánóstico que consiste en tener triatominos libres de parásitos y dejar que succionen sangre desde el paciente clínicamente sospechoso y examinar las deyecciones de las vinchucas 30 y 60 días después para observar la presencia de parásitos. La detección inmediata de enfermedad de Chagas crónica requiere de la demostración de anticuerpos específicos anti-*T. cruzi* en suero de pacientes o en test basados la detección del DNA parasitario PCR (Teixeira *et al.*, 2006).

## **Enfermedad de Chagas Congénita**

En los últimos años la transmisión congénita de *T. cruzi* ha adquirido cada vez más importancia epidemiológica, siendo parcialmente responsable de la “globalización de la enfermedad de Chagas” (Schmunis, 2007), constituyéndose en un problema de salud pública cada vez más relevante (Carlier *et al.*, 2005; Torrico *et al.*, 2005; Lescure *et al.*, 2008). Debido al control de vectores, los casos nuevos por año han disminuido considerablemente, desde 700000 en 1990 a 41000 en el 2006. Sin embargo, los casos de Chagas congénito en 2006 fueron 14385, por lo que esta forma de transmisión adquiere cada vez más importancia en materias de Salud Pública (World Health Organization, 2002). La seroprevalencia en mujeres embarazadas puede llegar hasta un 80% y las tasas

de infección congénita varían entre un 1-21% (Kirchhoff, 1993; Blanco *et al.*, 2000; Shippey *et al.*, 2005; Torrico *et al.*, 2005; Burgos *et al.*, 2007, World Health Organization, 2007). En Brasil la tasa de transmisión congénita es de un 1% y en Argentina, Bolivia, Chile y Paraguay varía entre un 4 – 12%. En Chile se reportan anualmente 800 – 1000 casos de enfermedad de Chagas congénita (Lorca, *et al.*, 2006). La transmisión vertical no puede ser prevenida debido a que los drogas disponibles para el tratamiento de la enfermedad de Chagas pueden ser teratogénicas (Castro *et al.*, 2006).

Los requisitos para considerar un caso como Chagas congénito son los siguientes:

1. Madre del bebé seropositiva para *T. cruzi*.
2. Detección postparto de parásitos en el recién nacido.
3. Detección de parásitos o de anticuerpos específicos anti-*T. cruzi* (generados en el hijo) en un momento más tardío, siempre y cuando se descarte la contaminación por transfusión sanguínea o transmisión por el vector (Carlier, 2005).

La placenta es el lugar principal de intercambio de nutrientes y gases entre la madre y el feto (Moore y Persaud, 2004; Syme *et al.*, 2004). Adicionalmente, juega un rol importante en la síntesis de hormonas, péptidos y esteroides fundamentales para un embarazo exitoso (Syme *et al.*, 2004). La placenta se compone de una porción fetal desarrollada a partir del corión frondoso y una porción materna o decidua basal que procede del endometrio (Moore y Persaud, 2004; Cross, 2006). La membrana o barrera placentaria está formada por tejidos extrafetales que separan la sangre materna de la fetal. Esta barrera se compone hasta las 20 semanas de sincitiotrofoblasto, citotrofoblasto, tejido conectivo de las vellosidades coriónicas libres y endotelio de los capilares fetales además de las láminas basales presentes entre los distintos compartimentos celulares. Posterior a las 20 semanas la placenta sufre adaptaciones que mejoran el intercambio metabólico, las células del citotrofoblasto disminuyen, los núcleos del sincitiotrofoblasto se

acumulan formando nodos, los capilares fetales se acercan al trofoblasto (**Fig. 5**). Esta re-estructuración favorece el intercambio metabólico por la formación de delgadas zonas citoplasmáticas sin núcleos y de esta manera la membrana placentaria se transforma en una barrera de menor grosor (Moore y Persaud, 2004; Kemmerling *et al.*, 2010). La muerte celular programada de tipo apoptosis juega un rol importante en la re-estructuración placentaria, facilitando la rápida eliminación de células no deseadas sin inflamación (Belkacemi *et al.*, 2009).

Se han descrito diversos agentes patógenos que son capaces de atravesar la barrera placentaria e infectar tanto a la placenta como al feto humano. Entre estos se cuentan virus de la inmunodeficiencia adquirida humana (HIV), hepatitis B y C, varicella zoster, rubéola, parvovirus B19 (Koi *et al.*, 2001) y citomegalovirus (Koi *et al.*, 2001; Halwachs-Baumann, 2006) así como *Mycoplasma* (Dische *et al.*, 1979). También se han descrito enfermedades parasitarias, además de *T. cruzi*, entre éstas destacan las infecciones por *Plasmodium falciparum*, agente causal de la malaria (Desai *et al.*, 2007; Rogerson *et al.*, 2007), *Schistosoma* (Friedman *et al.*, 2007), *Toxoplasma gondii* (Correa *et al.*, 2007) y *Trypanosoma brucei* (Rocha *et al.*, 2004).

La integridad de la célula hospedera puede representar un valioso requisito previo para la supervivencia y el desarrollo de agentes patógenos. La prevención de la muerte celular parece ser un factor decisivo en el resultado de una infección, ya que puede facilitar la proliferación intracelular de algunos patógenos (Belkacemi *et al.*, 2009). Por otra parte, algunos patógenos pueden inducir apoptosis con el fin de inhibir la respuesta inflamatoria y así favorecer su diseminación (Weinrauch y Zychlinsky, 1999).

Varios agentes patógenos, como el citomegalovirus (Chan y Guilbert, 2006) y parásitos como *T. gondii* (Abbasi, 2003) y *P. falciparum* (Crocker *et al.*, 2004) pueden inducir apoptosis en la placenta humana. Hay varias evidencias de que *T. cruzi* provoca un daño tisular importante durante la infección congénita



(Bittencourt, 1976). Sin embargo, en la literatura actual no existe ningún estudio sobre la inducción de apoptosis durante la infección de *T. cruzi* en la placenta humana.

Durante el embarazo existe en la respuesta inmune celular un predominio Th2 sobre Th1, lo que favorece la tolerancia inmunológica hacia el feto (Raghupathy, 2001; Lin *et al.*, 2005; Raghupathy y Kalinka, 2008), pero también aumenta la susceptibilidad hacia algunas enfermedades autoinmunes e infecciones intracelulares (Guilbert *et al.*, 1993; Lin *et al.*, 2005). Entre las infecciones intracelulares que muestran una exacerbación durante el embarazo se cuentan el síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA) (Derrien *et al.*, 2005), infecciones asociadas al SIDA (Margono *et al.*, 1994), malaria (Gamain *et al.*, 2006) y toxoplasmosis (Biedermann *et al.*, 1995).

En relación a la transmisión placentaria de *T. cruzi* se han realizado estudios sobre el estado inmunológico tanto de la madre como del feto. Así, en recién nacidos no infectados de madres chagásicas se observa una alta activación de su respuesta inmune innata con una mayor capacidad de sus monocitos de producir citoquinas pro-inflamatorias (IL1- $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ ) y anti-inflamatorias (IL-10) así como receptores para TNF- $\alpha$ , respecto a recién nacidos infectados o recién nacidos sanos de madres sanas (Hermann *et al.*, 2004; Carlier, 2005; Truyens *et al.*, 2005; Hermann *et al.*, 2006). Por lo tanto, los recién nacidos no infectados de madres chagásicas son capaces de montar una respuesta inmune de células T CD8+ similar a un adulto (Hermann *et al.*, 2002). A su vez las madres transmisoras presentan una mayor carga parasitaria asociada a parasitemias más altas, una menor capacidad de células mononucleares sanguíneas de producir IFN- $\gamma$ , incapacidad de producir IL-2 en respuesta específica al parásito (Hermann *et al.*, 2004; Carlier, 2005; Alonso-Vega *et al.*, 2005), una mayor capacidad de producir IL-10 (citoquina anti-inflamatoria) (Alonso-Vega *et al.*, 2005) y bajos niveles de TNF circulantes (García *et al.*, 2008). Por el contrario, las madres chagásicas no transmisoras presentan una alta activación monocitaria (Alonso-Vega *et al.*, 2005;

Carlier 2005; Hermann *et al.*, 2006) y altos niveles de TNF circulantes (García *et al.*, 2008).

Existen algunos estudios que describen las lesiones histopatológicas de placentas de madres transmisoras y no transmisoras de enfermedad de Chagas. Estos análisis se hicieron con técnicas histológicas de rutina (tinción hematoxilina-eosina) y las lesiones placentarias fueron descritas como “corionitis”, “corioamnionitis” y “edema de cordón” (Fernández-Aguilar *et al.*, 2005). Lamentablemente no se aplicaron técnicas histoquímicas ni inmunohistoquímicas para determinar con mayor certeza presencia de parásitos, así como alteraciones moleculares o celulares a nivel de las vellosidades coriónicas.

En otro estudio se clasificaron las células inflamatorias presentes en placentas infectadas por *T. cruzi*, encontrándose un predominio de macrófagos CD68+, linfocitos T (razón CD4+:CD8+ entre 0,04 y 0,38) algunas células NK (natural killer) y casi nula o nula presencia de linfocitos B (Altemani *et al.*, 2000). El predominio de células mononucleares es característico de cualquier respuesta inflamatoria crónica a un agente infeccioso (Kumar *et al.*, 2005). Podría llamar la atención la razón CD4+:CD8+; sin embargo, el predominio de los linfocitos citotóxicos se podría explicar por una respuesta hacia un patógeno intracelular (Hermann *et al.*, 2002). En este estudio no diferencian entre madres chagásicas transmisoras y no transmisoras y tampoco se describe en mayor detalle la histopatología de las placentas. Se diferencian las placentas obtenidas a partir de partos con recién nacidos vivos y otras a partir de partos con mortinatos. En los casos de mortinatos se observaron extensas áreas de necrosis y abundantes parásitos, comparado con los casos de nacidos vivos (Altemani *et al.*, 2000).

## **Mecanismos de Infección e Invasión de *T. cruzi***

Se ha estudiado con algún detalle la invasión del parásito a células en cultivo. Por el contrario, son escasos los trabajos que analizan el proceso de invasión parasitaria en tejidos y órganos. La penetración de *T. cruzi* a células del hospedero ocurre a través de un proceso complejo, de varias etapas, que involucra a moléculas tanto del parásito como del hospedero. La unión del parásito a las células del hospedero es mediada por receptores, *T. cruzi* posee una serie de moléculas de superficie que interactúan diferencialmente con moléculas tanto de células como de la matriz extracelular (MEC) del hospedero (Yoshida, 2006).

La invasión celular de *T. cruzi* induce señales de calcio y activación de vías de transducción de señales tanto en el parásito como en el hospedero (Yoshida, 2006; 2008). La capacidad del parásito de generar señales de calcio en el hospedero se relaciona con su infectividad (Manque *et al.*, 2003; Yoshida, 2008). La activación de las vías de transducción de señales que llevan a la generación de señales de calcio requiere de dos peptidasas (Burleigh y Woolsey, 2002), una serina endopeptidasa, oligopeptidasa B (Burleigh y Andrews, 1995) y una cisteína proteasa lisosomal secretada, cruzipaína (Scharfstein *et al.*, 2000).

### **Interacción entre *T. cruzi* y MEC del hospedero**

Los tejidos se forman de células y matriz extracelular (MEC). La MEC presenta un componente fibrilar compuesto por fibras colágenas y elásticas y un componente no fibrilar o sustancia fundamental, antiguamente denominado sustancia amorfa. La sustancia fundamental está compuesta por glicoaminoglicanos (GAGs), proteoglicanos y glicoproteínas. Los GAGs y proteoglicanos son responsables de la viscosidad de la MEC, debido que son macromoléculas aniónicas y por ende altamente hidrofílicas. Las glicoproteínas son moléculas adhesivas con una gran capacidad de interactuar con receptores celulares y otros elementos de la MEC. La MEC también forma las láminas basales, estructuras que se ubican entre tejidos epiteliales y conectivos. Las láminas basales compartimentalizan tejidos, relacionan el epitelio al tejido conectivo vecino, regulan la concentración de

moléculas señalizadoras como hormonas y factores de crecimiento y participan en procesos de cicatrización y reparación tisular, entre otros (Junqueira y Carneiro, 2005). Otra función muy importante es de modular la concentración y actividad de citocinas y quimiocinas durante la respuesta inmune e inflamatoria (Kumar *et al.*, 2005).

Entre los componentes moleculares de las láminas basales se cuentan las glicoproteínas laminina y fibronectina, colágenos IV y VII además de proteoglicanos como el heparansulfato (Junqueira y Carneiro, 2005).

Durante la invasión tisular del parásito, la interacción entre el *T. cruzi* y moléculas de la MEC es fundamental (Marino *et al.*, 2003). El parásito necesita atravesar la lámina basal ubicada entre los distintos epitelios y tejido conectivo adyacente y movilizarse dentro del mismo. La unión del parásito a elementos de la MEC facilita la invasión celular del parásito (Marino *et al.*, 2003; Nde *et al.*, 2006). Los macrófagos constituyen las primeras células del tejido conectivo en ser invadidas por *T. cruzi* (Burleigh y Woolsey, 2002). Estas células son fundamentales en el proceso inflamatorio, ya que participan en el inicio de una respuesta inmune más específica (Kumar *et al.*, 2005). Durante la respuesta inflamatoria se producen interacciones célula-célula y célula-MEC las que son mediadas por moléculas de adhesión e integrinas (Marino *et al.*, 2003). El parásito presenta moléculas de superficie, como las glicoproteínas gp85 (Marino *et al.*, 2003) y gp83 (Nde *et al.*, 2006), mediante las cuales se une a moléculas de la MEC. Entre las moléculas de la MEC a las cuales se puede unir *T. cruzi* se ha descrito a glicoproteínas como laminina (Giordano *et al.*, 1999; Marino *et al.*, 2003; Nde *et al.*, 2006) y fibronectina (Marino *et al.*, 2003), glicosaminoglicanos sulfatados como el heparansulfato (Lima *et al.*, 2002) y elementos del citoesqueleto (filamentos intermedios) expuestos en la membrana plasmática como la citoqueratina 18 (Magdesian *et al.*, 2001; Marino *et al.*, 2003). Existen evidencias que la fibronectina promueve la adhesión y endocitosis del parásito por parte de macrófagos y fibroblastos (Wirth y Kierszenbaum, 1984; Ouaisi *et al.*, 1985; Marino *et al.*, 2003). *T. cruzi* presenta

otra molécula de superficie, penetrina, mediante la cual se une a heparina, heparansulfato y colágeno, promoviendo la adhesión e internalización a los fibroblastos (Ortega-Barria y Perreira, 1991). La unión de gp83 a laminina promueve la internalización del parásito a macrófagos (Nde *et al.*, 2006) y activa a la vía de transducción de señales MAPK ERK1/2 (Villalta *et al.*, 1998) y PLC (Villalta *et al.*, 1999).

El parásito secreta proteasas (cruzipaínas) capaces de degradar a componentes de la MEC como colágeno I, IV y fibronectina exponiendo criptitopos (Santana *et al.*, 1997; Scharfstein y Morrot, 1999). Fragmentos de fibronectina plasmática presentan una actividad tipo factores de crecimiento que inducen la diferenciación de tripomastigotes a la forma replicativa intracelular de amastigote (Ouaissi *et al.*, 1985). El heparansulfato a su vez aumenta la actividad catalítica de la cruzipaína (Lima *et al.*, 2002) lo que favorecería el avance del parásito en el tejido. Cruzipaína tendría además un efecto antiapoptótico en cardiomiocitos en cultivo, ya que activa diversas vías de transducción de señales tales como las PI3K y MAPK ERK1/2 (Aoki *et al.*, 2004) que, como está descrito anteriormente, se activan durante la internalización del parásito.

Se ha postulado que las alteraciones de la MEC provocadas por la presencia del parásito no sólo promueven su movilidad en el tejido y su ingreso a las células sino además alteran la presencia de citoquinas y quimiocinas, lo cual le permite al *T. cruzi* modular y evadir el proceso inflamatorio y la respuesta inmune (Marino *et al.*, 2003; Mendes-da-Cruz *et al.*, 2006). Se ha propuesto el uso de aptámeros de RNA para interferir la interacción entre parásito y laminina, fibronectina, trombospondina o heparansulfato y así inhibir la invasión celular, objetivo que se logra parcialmente en cultivos celulares (Ulrich *et al.*, 2002).

Por el contrario, se han descrito alteraciones en la composición de la MEC en el miocardio de pacientes con miocarditis chagásica crónica; específicamente se observa un aumento en la cantidad de colágeno (Higuchi *et al.*, 1999). En ratones infectados con *T. cruzi* se ha descrito una sobre expresión de laminina, fibronectina, colágeno III y IV y una disminución de colágeno I (Andrade *et al.*, 1989). En cultivos tridimensionales de cardiomiocitos se observa un aumento significativo de fibronectina, laminina y colágeno IV después de 6 días post-infección con *T. cruzi* (Garzoni *et al.*, 2008). Alteraciones de la MEC se han descrito también en otros órganos de ratones infectados con *T. cruzi*. Así se observa en timo un aumento de fibronectina (Mendes-da-Cruz *et al.*, 2006) y colágeno IV; en bazo y linfonodos se encuentra además un aumento en la expresión de laminina (Marino *et al.*, 2003). Es probable, que durante la infección con, *T. cruzi*, en una primera etapa el parásito promueve la degradación de la MEC y luego como respuesta del hospedero se produce un aumento en los componentes de la MEC. Por ende, las interacciones parásito-MEC durante la etapa de invasión inducen alteraciones tanto extra como intracelulares. Las alteraciones de la MEC facilitan el avance del parásito por el tejido y modulan la presencia de moléculas (factores de crecimiento, citoquinas, quimiocinas) que a su vez permite al parásito modificar la respuesta inflamatoria e inmune. Por otro lado estas interacciones del parásito con la MEC inducen vías de transducción de señales que facilitan la entrada de *T. cruzi* a las células, paso fundamental en el ciclo de vida del parásito, ya que requiere el medio intracelular para replicarse en el hospedero mamífero (Andrade y Andrews, 2005).

## **Infección de vellosidades coriónicas placentarias por *T. cruzi***

La inducción de alteraciones celulares y la interacción con la MEC durante la infección con *T. cruzi* han sido estudiados principalmente en cultivos de células de mamífero. Estos cultivos corresponden a líneas celulares y no a cultivos primarios. Los estudios en tejidos humanos se centran en exámenes histopatológicos de necropsias de pacientes chagásicos, que no informan sobre mecanismos de invasión.

No obstante, se ha utilizado el tejido placentario humano como posible modelo de estudio de la infección tisular *ex vivo* del parásito (Sartori *et al.*, 2003; Lin *et al.*, 2004; Lujan *et al.*, 2004; Mezzano *et al.*, 2005; Sartori *et al.*, 2005; Shippey *et al.*, 2005). La posibilidad de contar con un tejido para el estudio de la invasión parasitaria permite trabajar en condiciones que se asemejan más a los procesos que ocurren *in vivo*. Otra ventaja de este modelo es la posibilidad de usar un tejido de origen humano. La placenta, que es expulsada del cuerpo materno durante el alumbramiento, no cumple nuevas funciones en los organismos que le dieron origen. Es un tejido de fácil obtención después del parto y su uso no compromete la salud de madre ni del recién nacido.

El tejido placentario ha sido usado ampliamente en estudios básicos biomédicos (Grimm, 1955; Seeho *et al.*, 2008). Cultivos de explantes de vellosidades coriónicas se han utilizado en estudios sobre los efectos de presiones parciales de O<sub>2</sub> (especialmente hipoxia) en el tejido placentario en relación a patologías como la pre-eclampsia (Benyo *et al.*, 1997; James *et al.*, 2006; Robinson *et al.*, 2008; Seeho *et al.*, 2008). Adicionalmente se ha usado este modelo en estudios de diferenciación celular (Fujiwara, 2007), efectos de fármacos (Gedeon y Koren, 2006), invasión celular viral (Halwachs-Baumann, 2006) y parasitaria intracelular como *T. cruzi* (Sartori *et al.*, 2003; Lin *et al.*, 2004; Lujan *et al.*, 2004; Mezzano *et al.*, 2005; Sartori *et al.*, 2005).

Así, se ha infectado *ex vivo* vellosidades coriónicas de placentas obtenidas de alumbramientos en partos por cesárea (Sartori *et al.*, 2003; Lin *et al.*, 2004; Lujan *et al.* 2004; Mezzano *et al.*, 2005; Sartori *et al.*, 2005). Algunos de estos trabajos describen alteraciones en los microfilamentos de actina en el sincitiotrofoblasto (Sartori *et al.*, 2003), fosfatasa alcalina placentaria (Mezzano *et al.*, 2005; Sartori *et al.*, 2005) y disminución del receptor para el factor de crecimiento epidérmico (Lin *et al.*, 2004). En estos trabajos se utiliza una concentración de parásitos alta ( $10^6$  parásitos/ml). Por lo que es necesario establecer nuevas condiciones óptimas infección en este modelo.

En la presente memoria se propone establecer las condiciones óptimas de infección *ex vivo* de vellosidades coriónicas humanas con *T. cruzi* y estudiar las alteraciones tisulares, específicamente a nivel de MEC e inducción de apoptosis, provocadas por el parásito en la barrera placentaria.



## **HIPOTESIS**

La infección *ex vivo* con *T. cruzi* de vellosidades coriónicas placentarias humanas induce alteraciones tisulares y apoptosis.

## OBJETIVO GENERAL

Estudiar el efecto a nivel celular y tisular de la infección *ex vivo* de vellosidades coriónicas placentarias con *T. cruzi*.

## OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Estandarizar el modelo de infección de vellosidades coriónicas de placenta humana *ex vivo* con tripomastigotes de *T. cruzi* en relación a:
  - a) El número mínimo de parásitos necesarios para lograr la infección.
  - b) El tiempo mínimo de contacto entre parásitos y vellosidades placentarias para lograr la infección.
2. Determinar alteraciones histopatológicas en los distintos compartimentos de las vellosidades coriónicas humanas infectadas *ex vivo* con *T. cruzi*.
3. Determinar la degradación y destrucción de la matriz extracelular en las vellosidades coriónicas de placenta humana durante la infección *ex vivo* con *T. cruzi*, específicamente:
  - a) Degradación y desorganización de componentes de las láminas basales presentes en las vellosidades coriónicas:
    - Laminina.
    - Fibronectina.
    - Colágeno IV.
    - Heparansulfato.
  - b) Degradación y desorganización de colágeno I de la MEC del tejido conectivo fetal.
4. Determinar la inducción de apoptosis en las vellosidades coriónicas de placenta humana durante la infección *ex vivo* con *T. cruzi*

## MATERIAL Y MÉTODOS

**Cultivos celulares:** Células VERO® (fibroblastos de riñón de mono verde africano) (ATCC® CCL-81) fueron sembrados en frascos de cultivo Falcon de 25 cm<sup>2</sup> a una densidad de 4000 células/cm<sup>2</sup>, en medio RPMI suplementado con bicarbonato de sodio 0,22%, estreptomina 100 µg/mL, penicilina 100 µg/mL y suero fetal bovino al 10% para crecimiento o al 5% para mantenimiento. Las células fueron cultivadas a 37°C en una atmósfera húmeda con 5% CO<sub>2</sub>, substituyendo el medio cada 24 a 48 horas. (Salas *et al.*, 2008).

**Obtención de formas infectivas de *T. cruzi*:** Células VERO® en semiconfluencia fueron inoculadas con 1 – 2 ml de cultivo de epimastigotes cepa DM28c envejecido (fase estacionaria). Este cultivo presenta aproximadamente un 5% de la forma infectiva tripomastigote. Los tripomastigotes invaden a las células VERO®, se diferencian intracelularmente en amastigotes y como tales proliferan; después de 4 o 5 días se diferencian nuevamente a tripomastigotes, lisan las células VERO® y son liberados de esta manera al medio de cultivo. Se colectó el medio de cultivo y se centrifugó a 500 x g por 5 minutos para separar las células en suspensión. El centrifugado se dejó en reposo durante 30 minutos a 37° C de modo que los tripomastigotes asciendan hacia el sobrenadante. Este sobrenadante fue recolectado y centrifugado a 3000 x g durante 10 minutos a fin de obtener en el sedimento las formas infectivas de *T. cruzi*. Los tripomastigotes fueron resuspendidos en medio RPMI y el número de células fue determinado en una cámara de Neubauer (Vieites *et al.*, 2009).

**Obtención de placentas:** Se obtuvieron placentas de término del Servicio de Obstetricia y Ginecología del Hospital San José, Servicio de Salud Metropolitano Norte. Los procedimientos de obtención de placentas, manejo de las mismas y formulario de consentimiento informado fueron aprobados por

el Comité de Ética Humana de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile (**anexo 1**).

Las placentas fueron obtenidas en alumbramientos por cesárea para asegurar la asepsia y preservación de la muestra. Las placentas provenían de madres sanas con embarazos monogestacionales y fetos con crecimiento normal. Los criterios de exclusión para la obtención de placentas fueron cualquier patología materna, fetal o placentaria. Los órganos se recogieron en tampón fosfato salino pH 7,2 (PBS, NaCl 135 mM, KCl 2,7 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 10 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,8 mM) estéril a 4°C y fueron procesados durante los 30 minutos siguientes al alumbramiento. Se disecaron cotiledones a 5 cm de la inserción del cordón umbilical cuyas caras placentarias maternas y fetales fueron desechadas. Se obtuvieron trozos de tejido de vellosidades coriónicas de aproximadamente 0,5 cm<sup>3</sup> del centro del cotiledón, los cuales fueron lavadas al menos 5 veces con PBS e incubadas en medio RPMI suplementado con antibióticos y 10% suero fetal bovino inactivado (Lin *et al.*, 2004).

**Infección *ex vivo* de vellosidades coriónicas con *T. cruzi*:** Las vellosidades coriónicas fueron incubadas en presencia y ausencia de diferentes concentraciones de tripomastigotes de la cepa DM28c (10<sup>2</sup> a 2x10<sup>6</sup>) y a diferentes tiempos (1, 2, 6, 12, 24, 48 y 72 horas) en medios de cultivo RPMI suplementado con antibióticos y 10% suero fetal bovino inactivado (Lin *et al.*, 2004).

**Técnicas histológicas:** Las vellosidades coriónicas fueron fijadas durante 24 horas en formaldehído 4% preparada en un tampón fosfato pH 7,3. Posteriormente fueron lavadas en agua corriente durante 2 horas, deshidratadas mediante inmersión en concentraciones crecientes de etanol (80%, 90%, 95%, 100%, 100%, 100%) por 10 minutos cada vez, aclaradas en xilol 100% 3 veces durante 15 minutos e incluidas en parafina fundida a 60° C (Kiernan, 2008). Posteriormente se obtuvieron cortes de 5 µm de espesor para

técnicas histológicas de rutina, histoquímicas e inmunohistoquímicas. La inmunodetección de los componentes de las láminas basales requirió cortes de 8  $\mu\text{m}$  de espesor. Los cortes fueron colocados en portaobjetos silanizados con carga positiva (Superfrost® plus, Thermo scientific). Posteriormente los cortes fueron desparafinados en xilol 100% 3 veces por 15 minutos, e hidratados en concentraciones decrecientes de etanol (100%, 100%, 100%, 95%, 80%, 70% y agua destilada) por 10 minutos cada vez. Los preparados fueron sometidos a las diferentes técnicas descritas más abajo y montados con Entellan (Merck®) (Kiernan, 2008), observados en un microscopio (Nikon, Optiphot-2 o Leitz Wetzlar) y las imágenes fueron capturadas con un equipo de digitalización (Canon Powershot SX100 15) acoplado al microscopio y procesadas empleando el programa computacional GIMP. Los preparados sometidos a inmunofluorescencia o TUNEL fueron observados en un microscopio de epifluorescencia Nikon Eclipse E400 (Tokio, Japón) y las imágenes fueron capturadas con una cámara Nikon Digital Sight y procesadas con el software NIS-Elements F 3.0 e ImageJ 1.43.

Tinción Hematoxilina-eosina: Este método fue utilizado para el análisis histológico de rutina. La hematoxilina es un colorante básico que tiñe estructuras basófilas de color azul-violeta oscuro. La eosina es un colorante ácido que tiñe estructuras acidófilas de color rojo o rosado.

Las muestras fueron teñidas por 2 minutos en hematoxilina de Mayer, lavados en agua corriente por 5 minutos, seguido de lavados en agua destilada por 2 minutos, teñidos en eosina acuosa al 10% acidificada con ácido acético glacial por 3 minutos para luego ser enjuagados con agua destilada (Kiernan, 2008) y procesados según descrito anteriormente.

Tinción de ácido peryódico-schiff (PAS): Este método se utiliza para identificar el glicógeno en tejidos. El ácido peryódico oxida los grupos hidroxilo de hexosas neutras a aldehídos, que son visualizados con el reactivo de Schiff resultando un color rojo púrpura (Thompson, 1966). Las membranas basales

presentan macromoléculas con una alta proporción de hidratos de carbono (Junqueira, *et al.*, 1979), por lo cual se tiñen mediante la reacción de PAS (Kiernan, 2008).

Las muestras fueron procesadas para análisis histológico de rutina, como descrito anteriormente. Se utilizó el kit de tinción PAS (kit PERIODIC ACID-SCHIFF (PAS) STAINING SYSTEM) de Sigma-Aldrich®, según las instrucciones informadas por el fabricante. Los cortes fueron desparafinados e hidratados como ya fue descrito anteriormente, sumergidos en agua desionizada, tres veces por 5 minutos cada vez, luego sumergidos en solución de ácido peryódico, durante 5 minutos a temperatura ambiente, lavados al menos 10 veces en agua destilada cambiando el agua cada vez, sumergidos en reactivo de Schiff, durante 15 minutos a temperatura ambiente y lavados durante 5 minutos en agua corriente. El contraste nuclear se realizó mediante tinción nuclear con hematoxilina de Gill por 90 segundos, finalmente fueron deshidratadas, aclaradas y montadas en medio Entellan® como ya fue descrito. Adicionalmente se realizaron controles de la técnica mediante la aplicación, en los cortes previo a la tinción, de  $\alpha$ -amilasa (4  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) durante 30 minutos a 37° C.

Tinción de picro rojo sirio: Este método histoquímico se utiliza para determinar los elementos fibrilares de la MEC, específicamente colágeno I y III. El rojo sirio es un colorante fuertemente aniónico que tiñe a las fibras de colágeno mediante sus grupos de ácido sulfónico con residuos básicos presentes en las moléculas de colágeno. La molécula de rojo sirio es alargada y se une en forma paralela a las moléculas de tropocolágeno. Esta asociación paralela entre colorante y tropocolágeno resulta en un aumento de la birrefringencia, que se aprecia en un microscopio óptico con luz polarizada. El colágeno I se observa de color rojo o naranja mientras que el colágeno III se observa de color verde. (Junqueira *et al.*, 1979).

Las muestras fueron procesadas para análisis histológico de rutina, como descrito anteriormente. Las muestras fueron teñidas por 8 minutos con hematoxilina de Mayer, lavados con agua corriente por 10 minutos, sumergidos en una solución de picro rojo sirio (0,5 g Direct red 80 (Sigma-Aldrich®), en 500 ml. de solución acuosa sobresaturada de ácido pícrico (Sigma-Aldrich®)) por una hora, lavados dos veces con agua destilada acidificada al 0,5% con ácido acético glacial, y lavados con agua destilada 3 veces cambiando el agua cada vez.

**Inmunohistoquímica:** Las muestras fueron procesadas para técnicas inmunohistoquímicas de rutina. Se utilizó el kit ABC-R.T.U Vectastain Universal® (ScyTek, ACA) para la técnica de inmunoperoxidasa, para la detección de los diversos antígenos en los cortes de las vellosidades coriónicas incubadas en presencia o ausencia del parásito.

Los cortes desparafinados fueron incubados con bloqueador de peroxidasas endógenas (ScyTek, ACA) y suero normal equino R.T.U al 2,5% (ScyTek, ACA). La dilución de los anticuerpos primarios, tiempo y temperatura óptima de incubación fueron determinados experimentalmente en el laboratorio:

Anti-laminina: (ABR® MA1-21194) en una dilución 1:20 v/v durante toda la noche a 4° C.

Anti-fibronectina: (ABR® MA1-83176) en una dilución 1:50 v/v durante toda la noche a 4° C.

Anti-heparansulfato: (Novocastra® NCL-CD44-2) en una dilución 1:40 v/v durante toda la noche a 4° C.

Anti-colageno IV: (Novocastra® NCL-COLL-IV) en una dilución 1:100 v/v durante toda la noche a 4° C.

Anti-lactógeno placentario: (Novocastra® NCL-PLp) en una dilución 1:250 v/v durante 1 hora a T° ambiente.

Anti-citoqueratina 18: (Roche®, M-30 CytoDEATH, Catalog N°: 2140322) en una dilución 1:200 v/v durante toda la noche a 4° C.

Posteriormente, las muestras fueron incubadas con un anticuerpo secundario biotinilado (Kit RTU Vectastain (ScyTek, ACA)) y el complejo antígeno-anticuerpo revelado con el cromógeno diaminobencidina (DAB). El contraste nuclear se realizó con Hematoxilina de Mayer. Los controles negativos de la técnica inmunohistoquímica fueron realizados mediante la sustitución de los anticuerpos primarios con PBS. Para la inmunodetección de lactógeno placentario se utilizaron cortes de 5 µm y para la inmunodetección de laminina, fibronectina, colágeno IV, heparansulfato y citoqueratina 18 se necesitaron cortes de 8 µm. La detección de estos últimos antígenos se realizó post-tratamiento de recuperación de antígeno mediante incubación en un tampón citrato de sodio (Antigen Unmasking Solution® (ScyTek, ACA)) a 100° C durante 60 minutos en una vaporera Oster® (Modelo 5711-052, Oster).

**Inmunofluorescencia:** Los cortes desparafinados fueron incubados con “bloqueador de reacciones inespecíficas” (Pro-Blok (ScyTek, ACA)) por 30 minutos, luego lavado 3 veces con PBS 5 minutos cada vez y posteriormente incubados con suero normal equino R.T.U al 2,5% (ScyTek, ACA) por 20 minutos. El anticuerpo primario monoclonal mAb25 (Anti-T. cruzi “flagellar calcium binding protein” Gentileza Dr. Sergio Schenkman, Departamento de Microbiología, Inmunología y Parasitología, Universidad Federal de Sao Paulo, SP. Brasil) fue aplicado en una dilución 1:100 v/v durante toda la noche a 4° C. Posteriormente, las muestras fueron lavadas 3 veces con PBS por 5 minutos cada vez, e incubadas con anticuerpo secundario fluorescente (1:400 v/v) (Fluorescein Anti-Mouse IgG (H+L) VECTOR (ScyTek, ACA)) durante 1 hora y lavadas con PBS como se explica anteriormente. Luego las muestras fueron teñidas con DAPI (4',6- diamidino-2-fenilindol dicloridrato, PIERCE ®; 1 µg/ml) por 5 minutos, lavadas dos veces en PBS por 3 minutos cada vez, y montadas con medio para fluorescencia (VECTASHIELD® VECTOR (ScyTek, ACA)). Los controles negativos de la técnica inmunofluorescencia fueron realizados mediante la sustitución de los anticuerpos primarios con PBS. Todo el proceso fue realizado en una cámara húmeda y en ausencia de luz. Las



muestras se observaron en un microscopio de epifluorescencia como fue descrito anteriormente.

**TUNEL:** La visualización de apoptosis se realizó mediante la técnica de TUNEL (TdT-mediated dUTP Nick-End Labeling). Esta técnica se basa en la adición catalítica de fluoresceína-12-dUTPs a los extremos OH 3' libres del DNA, por acción de una nucleotidil transferasa terminal recombinante. La fragmentación del DNA, característica de las células apoptóticas, produce una alta cantidad de extremos 3' libres por lo que los núcleos celulares positivos a la reacción presentan fluorescencia verde (Kiernan, 2008).

Para ello, los cortes fueron montados en portaobjetos silanizados con carga positiva (Superfrost® plus, Thermo scientific), desparafinados mediante dos inmersiones sucesivas en xilol durante 5 minutos cada una, hidratadas en concentraciones decrecientes de alcohol etílico (100%, 100%, 95%, 85%, 70% y 50%) durante 3 minutos cada vez, sumergidas en solución de cloruro de sodio al 0,85% por 5 minutos y lavadas con PBS por 10 minutos, para luego someterlos a la técnica de TUNEL utilizando el kit DeadEnd™ Fluorometric TUNEL System, Promega® de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Las muestras fueron permeabilizadas en solución de proteinasa K (20 µg/ml) por 10 minutos, lavadas en PBS por 5 minutos, incubadas en tampón de equilibrio (200 mM cacodilato de potasio 25 mM, Tris-HCl pH 6,6, 0,2 mM DTT, 0,25 mg/ml, 2,5 mM cloruro de cobalto) por 10 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente cada corte de tejido fue incubado con 51 µl de la mezcla de reacción TdT (45 µl de tampón de equilibrio, 5 µl de mezcla de nucleótidos (50µM fluoresceína-12-dUTP, 100 µM d ATP, 10 mM Tris-hcl (pH 7,6), 1 mM EDTA, 1 µl de enzima rTdT), cubiertas con cubreobjetos plásticos e incubadas durante 60 minutos a 37° C; en cámara húmeda. La reacción enzimática fue detenida mediante inmersión en tampón 2 X SCC (NaCl 300 mM, citrato de sodio 29,9 mM, pH 7,2) durante 15 minutos. Las muestras fueron lavadas dos veces en PBS por 5 minutos cada vez y los núcleos fueron teñidas con DAPI

(4',6- diamidino-2-fenilindol dicloridrato, PIERCE ®; 1 µg/ml) por 5 minutos, lavadas dos veces en PBS por 3 minutos cada vez, y montadas con medio para fluorescencia (VECTASHIELD® VECTOR (ScyTek, ACA)). Tanto la reacción enzimática de la nucleotidil transferasa terminal como la tinción con DAPI se realizaron en ausencia de luz. Las muestras se observaron en un microscopio de epifluorescencia como descrito anteriormente. El índice apoptótico se obtuvo por recuento de núcleos positivos a la reacción de TUNEL versus células totales, con un recuento de 200 núcleos en duplicado.

**Extracción y cuantificación de DNA:** Las muestras de placenta fueron lavadas 10 veces en PBS, posteriormente se extrajo el DNA genómico mediante el kit Wizard® Genomic DNA Purification Kit (Promega) según instrucciones del fabricante. El tejido fue homogenizado a 4° C en 600 µl de solución para lisis de núcleos. El homogenado fue incubado a 65° C por 20 minutos, posteriormente se agregó 3 µl de RNasa para ser incubado a 37° C por 20 minutos y enfriada a temperatura ambiente. Luego se precipitaron las proteínas del homogenado mediante 200 µl de solución para precipitación de proteínas y un centrifugado a 15000 x g por cuatro minutos. Se recolectó el sobrenadante, el cual se agregó a un tubo con 600 µl de alcohol isopropílico a temperatura ambiente. El contenido del tubo fue mezclado por inversión y centrifugado a 15000 x g por 1 minuto, el sobrenadante fue recolectado y se agregó a un tubo con 600 µl de etanol. El contenido del tubo fue mezclado por inversión, centrifugarlo a 15000 x g por 1 minuto. El etanol fue aspirado y el precipitado (DNA) se dejó secar al aire por 15 minutos, y fue hidratado en 100 µl de solución de hidratación de DNA mediante incubación por una hora a 65° C.

El DNA fue cuantificado mediante el kit Quant-iT™ dsDNA BR Assay (Invitrogen®) según instrucciones del fabricante. Se preparó una solución de 200 µl (198 µl de Quant-iT™ dsDNA BR buffer, 1 µl de Quant-iT™ dsDNA BR reagent y 1 µl de DNA genómico) que fue incubada por dos minutos a

temperatura ambiente, posteriormente la absorbancia de la fluorescencia fue leída en un fluorímetro (Quibit® fluorometer).

**Reacción de polimerasa en cadena (PCR):** Para la reacción de PCR se preparó una mezcla de 25  $\mu$ l conteniendo 100 ng de DNA genómico (cuantificado mediante fluorometría en Quibit® fluorometer Invitrogen®),  $MgCl_2$  50 mM, 0,2 mM de cada dNTP, 1.5 U de Taq polimerasa y 32 pmol de cada partidor. Los ciclos termales fueron: 5 min de denaturación a 95° C, seguidos de 20 ciclos de 30 segundos a 95° C, 30 segundos a 60° C y 1 min a 72° C. La extensión final fue de 7 min a 72° C. Se amplificaron fragmentos del gen codificante para la endonucleasa NL1Tc de *T. cruzi* amplificando un segmento de 984 pares de bases. Los partidores usados fueron: Sentido 5'-GGGGTACCATGGAGCCATTTACATGGCTG-3' y antisentido 5'-CCCAAGCTTTATAAGCGCTCTCGTGAAAGC-3'. Los amplificados de DNA se separaron en geles de agarosa al 1% preparados en tampón Tris-borato-EDTA (Tris-HCl 89 mM pH 8,0, Acido bórico 89 mM, EDTA 2 mM) y se tiñeron con bromuro de etidio.

**Determinación de actividad enzimática tipo caspasa – 3:** Las vellosidades coriónicas humanas control e infectadas con  $10^5$  y  $10^6$  tripomastigotes de *T. cruzi* durante 24 horas fueron homogenizadas en un tampón de lisis celular (CaspACETM Assay System, Colorimetric, Promega) y posteriormente centrifugados a 16000 x g durante 10 minutos a 4° C. El ensayo se realizó utilizando el Kit de ensayo de la caspasa 3 de acuerdo a las instrucciones del fabricante (Sigma CASP-3-C), que también contiene el inhibidor de la caspasa 3 Ac-DEVD-CHO (acetil-Asp-Glu-Val-Asp-AL, Sigma). La mezcla de reacción contenía 200 mg de proteína total (determinado por el método de Bradford (Bradford, 1976), 64 ml de solución tampón de ensayo caspasa, 4 ml de DMSO, 20 ml de DTT (100 mM), y 4 ml del sustrato Ac-DEVD-PNA (N-acetil-Asp-Glu-Val-Asp-p-nitroanilida) (10 mM). Alícuotas de las mezclas de ensayo fueron co-incubadas en presencia del inhibidor de la caspasa 3 Ac-DEVD-CHO

(50 mM). Las muestras fueron incubadas durante 24 horas a 37°C. La degradación del sustrato Ac-DEVD-PNA por caspasa – 3 genera p-nitroanilina, que presenta un color amarillo que es medido en un espectrofotómetro a 405 nm. Las diferencias de absorbancia entre las muestras con y sin inhibidor de la caspasa 3 fueron considerados como actividades tipo caspasa – 3 y se expresaron como actividades enzimáticas específicas (pMol pNA liberado/mg/h).

**Análisis estadístico:** Los resultados fueron expresados en promedio más desviación estándar. La significancia de las variables múltiples fue evaluada mediante ANDEVA seguido por “Dunnett’s post test” (compara todas las columnas respecto al control) (Kemmerling *et al.*, 2007).

Se utilizó el programa computacional GraphPad Software PRISM 5.0 (GraphPad Software, San Diego, EE.UU.). Se consideró un  $p < 0,05$  como estadísticamente significativo.

**Bioseguridad:** El laboratorio cuenta con los requerimientos básicos de Bioseguridad, certificado por la "Unidad de Prevención de Riesgos y Bioseguridad de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile" (**anexo 2**). **Las formas infectivas del parásito fueron manipuladas por la profesora guía.**

**Bioética:** Este estudio cuenta con la aprobación del “Comité de Ética Humana de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile” (**anexo 3**).

## RESULTADOS

### **Estandarización del modelo de infección de vellosidades coriónicas de placenta humana *ex vivo* por tripomastigotes de *T. cruzi***

Se incubaron trozos de tejido placentario ( $0,5 \text{ cm}^3$ ) durante 24 – 96 horas en presencia y ausencia de distintas concentraciones de tripomastigotes cepa DM28c (10000 - 2000000) en un volumen final de 1 ml de medio de cultivo.

Mediante inmunofluorescencia se evidenció infección a las 24 horas con  $10^5$  parásitos (**Fig. 6 E – H**). La técnica más sensible de PCR permitió detectar DNA parasitario en las vellosidades coriónicas infectadas con tan sólo  $10^3$  parásitos (**Fig. 6 I**).

Adicionalmente, se determinó la mantención de las estructuras de las vellosidades coriónicas en cultivo. Para ello fueron procesadas mediante técnicas histológicas convencionales y teñidas con hematoxilina-eosina. Se observó que las vellosidades coriónicas humanas pierden su morfología normal después de 4 – 5 días en cultivo.

Se logró establecer una infección *ex vivo* de vellosidades coriónicas con *T. cruzi* incubando el tejido placentario con  $10^5$  parásitos durante 24 horas.

## **Determinación de alteraciones histopatológicas en los distintos compartimentos de las vellosidades coriónicas humanas infectadas *ex vivo* con *T. cruzi***

Se observan severas alteraciones histopatológicas en las vellosidades coriónicas incubadas con distintas concentraciones de parásito (**Fig. 7**). El daño tisular es proporcional a la concentración de parásitos utilizados para la infección *ex vivo*. Se observa destrucción y separación del sinciciotrofoblasto al tejido conectivo fetal vecino. El tejido conectivo fetal también muestra un marcado daño. Se observó la posible presencia del parásito en las vellosidades coriónicas incubadas con tripomastigotes (**flechas amarillas en Fig. 7**).

### ***T. cruzi* induce destrucción y desprendimiento del sinciciotrofoblasto**

El sinciciotrofoblasto es el tejido de la vellosidad coriónica, que está en contacto con el espacio intervelloso que contiene sangre materna. Durante la transmisión vertical, el primer tejido fetal con el cual los diversos patógenos pueden interactuar es el sinciciotrofoblasto. Se analizó en forma más específica esta estructura de la vellosidad coriónica mediante análisis inmunohistoquímico, utilizando un anticuerpo marcador de sinciciotrofoblasto (Ac anti-lactógeno placentario humano) (**Fig. 8**). Se incubaron vellosidades coriónicas en ausencia y presencia de  $10^5$  y  $10^6$  tripomastigotes. En las vellosidades coriónicas incubadas con el parásito se observa destrucción y desprendimiento del sinciciotrofoblasto (**Fig. 8 B y C**), efecto más evidente en las vellosidades coriónicas incubadas con la concentración más alta de tripomastigotes (**Fig. 8 C**).

## ***T. cruzi* induce desorganización y destrucción selectiva de las láminas basales**

Las láminas basales son estructuras de la MEC que se ubican entre tejidos epiteliales y tejidos conectivos. En las vellosidades coriónicas las láminas basales se ubican entre el trofoblasto y tejido conectivo fetal y alrededor de los endotelios de los capilares fetales. La formación de una barrera ante la posible invasión de patógenos constituye una de sus múltiples funciones. Por otra parte, se ha descrito que el parásito utiliza moléculas de las láminas basales como receptores para la invasión tisular. Para poder alcanzar a los capilares fetales el parásito debe atravesar las distintas láminas basales presentes en las vellosidades coriónicas. Las láminas basales presentan un alto porcentaje de moléculas glicosiladas, entre ellas glicoproteínas como laminina y fibronectina; y proteoglicanos como el heparansulfato. El análisis mediante la técnica histoquímica de ácido peryódico de Schiff (PAS) mostró una disminución marcada de estos componentes de la lámina basal en las vellosidades infectadas con el parásito respecto a las vellosidades controles (**Fig. 9**). Esta disminución fue particularmente evidente en las vellosidades incubadas con la concentración más alta de tripomastigotes (**Fig. 9 E**). Se incubaron adicionalmente cortes de vellosidades controles con  $\alpha$ -amilasa durante 30 minutos a 37° C como control de la técnica (**Fig. 9 B**); en esta muestra se observa una franca disminución de la tinción de PAS respecto al control (**Fig. 9 A**). La disminución de la tinción PAS evidencia una menor presencia de macromoléculas glicosiladas en las vellosidades infectadas con *T. cruzi*.

Posteriormente se realizó un estudio más específico de los componentes que forman parte de las láminas basales y que puedan estar afectadas por la presencia de parásito. Mediante técnicas inmunohistoquímicas se analizó las glicoproteínas laminina y fibronectina, el proteoglicano heparansulfato así como colágeno IV (**Fig. 10**).

Vellosidades coriónicas incubadas con  $10^5$  tripomastigotes muestran una marcada disminución de inmunoreactividad para heparansulfato (**Fig. 10 B**) y laminina (**Fig. 10 E**), que se pierde completamente en los explantes incubados con  $10^6$  parásitos (**Fig. 10 C y F**). La inmunoreactividad para colágeno IV se mantiene en las vellosidades coriónicas incubadas con  $10^5$  tripomastigotes (**Fig. 10 H**). Sin embargo interesantemente, en los explantes incubados con  $10^6$  tripomastigotes se pierde la inmunoreactividad en las láminas basales entre trofoblasto y tejido conectivo fetal (**Fig. 10 I asterisco amarillo**), no así en las láminas basales que rodean al endotelio fetal (**Fig. 10 I flecha amarilla**). No se observan alteraciones en la inmunoreactividad para fibronectina (**Fig. 10 J – L**).



## ***T. cruzi* induce degradación y desorganización de colágeno I de la MEC del tejido conectivo fetal**

Durante la invasión tisular, además de atravesar sinciciotrofoblasto y láminas basales, el parásito debe avanzar a través del tejido conectivo localizado entre las láminas basales ubicadas entre trofoblasto y endotelio fetal (**Fig. 5**) El tejido conectivo fetal de la vellosidad coriónica es de tipo laxo. El colágeno I constituye el principal componente fibrilar de la MEC de este tipo de tejido conectivo. Este componente de la MEC se analizó mediante la técnica histoquímica de Picro Rojo Sirio. Se observó severa desorganización del colágeno I en vellosidades coriónicas infectadas *ex vivo* con el parásito (**Fig. 11 B – C**) respecto al control (**Fig. 11 A**). El daño se evidencia por la pérdida de birrefringencia de las fibras de colágeno I. La desorganización del colágeno I es mayor en explantes incubadas con  $10^6$  tripomastigotes que con  $10^5$  parásitos (**Fig. 11 C**).

## ***T. cruzi* induce apoptosis en las vellosidades coriónicas infectadas ex vivo**

El proceso de muerte celular programada tipo apoptosis es fundamental en la mantención de la homeostasis de las vellosidades coriónicas (Belkacemi *et al.*, 2009) Se han descrito a diversos patógenos, entre ellos *T. cruzi*, capaces de inducir, retardar o inhibir la apoptosis como parte de sus estrategias de infección (Heussler *et al.*, 2001; De Souza *et al.*, 2003).

Durante el proceso de apoptosis se induce fragmentación de DNA. En las vellosidades coriónicas incubadas con tripomastigotes se observó un aumento significativo de fragmentación de DNA mediante la técnica de TUNEL respecto al control (**Fig. 12**). Se observa en A, D, G, J imágenes correspondientes a contraste de fase, en B, E, H, K imágenes correspondientes a la tinción nuclear con DAPI y en C, F, I, L imágenes correspondientes a la reacción de TUNEL. Las imágenes J-L corresponden al control de la técnica, donde se incubó a los cortes, previo a la reacción de TUNEL, con DNAasa. El índice apoptótico aumenta de un 36,93% a un 64,65% y 70,48% en las vellosidades coriónicas incubadas con  $10^5$  y  $10^6$  tripomastigotes ( $p \leq 0,05$ ,  $p \leq 0,01$ ), respectivamente (**Fig 12 M**).

Otro evento importante durante el proceso apoptótico es la degradación de proteínas celulares por acción de caspasas (Alberts *et al.*, 2008). En células epiteliales, las caspasas efectoras degradan filamentos intermedios, tales como la citoqueratina 18, exponiendo nuevos epitopos (Krol *et al.*, 2005). Se observó en las vellosidades incubadas con  $10^5$  tripomastigotes una marcada inmunoreactividad para el neo-epitopo de la citoqueratina 18 (**Fig. 13 B**). Sin embargo, las vellosidades coriónicas incubadas con  $10^6$  tripomastigotes, muestran un menor aumento en la inmunoreactividad (**Fig. 13 C**). Probablemente esta diferencia se deba a que en las muestras incubadas con el mayor número de parásito presenta un mayor daño a nivel de sinciotrofoblasto, el proceso de apoptosis esté en una etapa más avanzada y, por ende, el neo-epitopo se ha degradado.

Adicionalmente, realizamos una aproximación más funcional de las enzimas proteolíticas involucradas en el proceso de apoptosis. Se determinó la actividad tipo caspasa – 3 utilizando a Ac-DEVD-pNA como sustrato colorimétrico para esta enzima. En vellosidades coriónicas incubadas con  $10^5$  y  $10^6$  tripomastigotes la actividad tipo caspasa – 3 aumenta 5 y 9,5 veces, respectivamente ( $p \leq 0,05$ ) (**Fig. 14**).

Por ende es posible afirmar que el parásito induce muerte celular programada tipo apoptosis en vellosidades coriónicas humanas durante el proceso de infección e invasión tisular.

## DISCUSIÓN

Durante la transmisión vertical el parásito cruza la barrera placentaria (Bittencourt, 1976; Andrade, 1982; Nisida *et al.*, 1999; Carlier, 2005). Para alcanzar a los capilares fetales, el parásito debe atravesar desde el espacio intervelloso, las siguientes estructuras: sinciciotrofoblasto, citotrofoblasto, lámina basal, tejido conectivo fetal, lámina basal del capilar fetal, y endotelio fetal.

El modelo de infección *ex vivo* de vellosidades coriónicas humanas, ya ha sido utilizado previamente por otros autores (Sartori *et al.*, 2003; Lin, *et al.* 2004; Mezzano, *et al.*, 2005). Sin embargo, estos autores han utilizado solo una concentración de parásitos ( $10^6$  parásitos por ml). Por lo tanto, era importante establecer una concentración mínima de parásitos para la infección *ex vivo* de las vellosidades coriónicas humanas por *T. cruzi*. Se logro reducir, en un orden de magnitud, la concentración de parásitos ( $10^5$  /ml) necesarios para obtener una infección *ex vivo* exitosa y reproducible en explantes de vellosidades coriónicas. Se consideró a la infección como exitosa cuando se pudo detectar el parásito tanto por PCR como por inmunofluorescencia (**Fig. 6**).

El tiempo mínimo necesario para lograr una infección exitosa fue de 24 horas, tiempo que fue también determinado por otros autores (Sartori *et al.*, 2003; Triquell *et al.*, 2009). Se ha utilizado sistemas de perfusión dual de placenta humana con concentraciones aún más altas de parásitos ( $10^7$  parásitos /ml) (Stuart *et al.*, 2005). En estos experimentos se describen “irregularidades como amastigotes”. Sin embargo, estructuras similares observadas durante el desarrollo de esta memoria no presentan inmunoreactividad para antígenos específicos del parásito.

La primera barrera que debe atravesar el parásito es el sinciciotrofoblasto. Durante la infección *ex vivo* de los explantes de vellosidades coriónicas con tripomastigotes de *T. cruzi*, se induce la destrucción y el desprendimiento de esta capa tisular. Concentraciones más altas del parásito ( $10^6$ ) inducen un mayor daño tisular que

las concentraciones más bajas ( $10^5$ ) (**Fig. 7 y 8**). Otros patógenos como citomegalovirus (Chan y Guilbert, 2006) y parásitos como *P. falciparum* (Crocker *et al.*, 2004) y *T. gondii* (Abbasi *et al.*, 2003) también provocan lesiones del sinciciotrofoblasto. La destrucción y el desprendimiento del sinciciotrofoblasto, tejido que está en contacto con la sangre materna y en la cual diversos patógenos pueden circular, podría constituir un mecanismo de defensa tratando de evitar la infección congénita. La tasa de transmisión congénita de distintos patógenos es variable, la de *T. cruzi* se describe entre un 1 – 20 % (World Health Organization, 2002). Esta tasa de transmisión es relativamente baja, por lo que deben existir mecanismos placentarios locales capaces de evitar la transmisión. El desprendimiento o descamación de tejidos epiteliales, forma parte de la primera barrera de defensa de un organismo frente a agentes infecciosos (Junqueira y Carneiro, 2005).

Después de invadir las células de trofoblasto, el parásito debe atravesar el tejido conectivo fetal. La lámina basal, una estructura especializada de moléculas de la MEC, situado entre trofoblasto y el tejido conjuntivo fetal sería la siguiente barrera para el parásito. Otra lámina basal rodea al endotelio de los capilares fetales y constituiría parte de la última barrera que debe atravesar cualquier patógeno que necesita alcanzar la circulación fetal. El parásito presenta moléculas de la superficie, como gp85 (Marino *et al.*, 2003) y gp83 (Nde *et al.*, 2006), con las que se une a las glicoproteínas laminina y fibronectina (Marino *et al.*, 2003; Nde *et al.*, 2006) y proteoglicanos como el heparansulfato (Lima *et al.*, 2002). Durante la infección *ex vivo* de los explantes de vellosidades coriónicas con tripomastigotes de *T. cruzi*, se induce una desorganización selectiva de distintos componentes de las láminas basales. Se observa una marcada disminución de moléculas glicosiladas presentes en las láminas basales como se evidencia con la tinción de PAS (**Fig. 9**). Específicamente se observa una disminución de la inmunoreactividad para laminina y heparansulfato en las vellosidades coriónicas incubadas con  $10^5$  tripomastigotes, la que se pierde completamente con  $10^6$  parásitos. Colágeno IV pierde la inmunoreactividad en la lámina basal contigua al

trofoblasto, no así en las láminas basales que rodean al endotelio de los capilares fetales. Probablemente la destrucción de esta glicoproteína en las láminas basales endoteliales se produce en una etapa más tardía de la infección. Interesantemente, no se observan cambios en la inmunoreactividad para fibronectina (**Fig. 10**). La disminución de la inmunoreactividad en laminina, heparansulfato y colágeno IV se podría deber también a un cambio conformacional en estas moléculas con enmascaramiento del antígeno necesario para la detección con el anticuerpo. Sin embargo, si existiese tal cambio conformacional la estructura de las láminas basales también quedaría alterada, facilitando probablemente la invasión parasitaria. La disminución de la reactividad para PAS apoya la hipótesis de destrucción de moléculas glicosiladas más que un enmascaramiento de epitopos.

Estas moléculas han sido estudiadas también en otros tejidos, tales como bazo y ganglios linfáticos. En estos tejidos se observa un aumento de expresión de laminina (Marino *et al.*, 2003). Estos estudios se han efectuado en modelos murinos, diferente al modelo humano empleado en esta memoria. Se ha propuesto que el parásito induce un aumento de expresión de laminina que le permite unirse a estas moléculas de la MEC e invadir a las células inmersas en esta estructura y luego destruirla para movilizarse en el tejido (Marino *et al.*, 2003). La presencia de laminina es fundamental para una infección efectiva, ya que el silenciamiento del gen de la laminina inhibe la invasión celular del parásito (Nde *et al.*, 2006). El parásito posee proteasas tales como la cruzipaina que es capaz de degradar el colágeno IV y fibronectina así como otros componentes de la MEC, facilitando así la exposición de nuevos epitopos a los que *T. cruzi* se une (Scharfstein y Morrot 1999). De esta manera puede favorecer la unión a laminina y por ende la invasión celular.

Entre el trofoblasto y capilares fetales, el tejido conectivo fetal es otro obstáculo importante para el parásito. En la infección *ex vivo* de la vellosidad coriónica humana el parásito induce una severa desorganización del colágeno I como lo

demuestra la tinción con picro rojo sirio-hematoxilina (**Fig. 11**). La degradación del colágeno I se debe probablemente a la presencia de cruzipaina (Scharfstein y Morrot, 1999) o a la secreción de metaloproteinasas tipo gelatinasas B que son capaces de degradar al colágeno I (Nogueira *et al.*, 2010). Las metaloproteinasas, específicamente las MMP-2 y MMP-9 pueden ser inducidas en el tejido por el parásito, como se ha observado en el miocardio en ratones con enfermedad de Chagas aguda. La inhibición de estas enzimas reduce la miocarditis y mejora la supervivencia durante la fase aguda de la infección en este modelo (Gutiérrez *et al.*, 2008). En otros tejidos, específicamente en tejido conectivo que forma la lámina propia de los túbulos seminíferos de ratones, la infección por *T. cruzi*, también induce la desorganización del colágeno I (Carvalho *et al.*, 2009). Otro punto importante a considerar es que el colágeno es un componente fundamental de la red tridimensional que forma la MEC. Esta red tridimensional está formada por los distintos tipos de colágenos, fibras elásticas, glicoaminoglicanos, proteoglicanos y glicoproteínas (Junqueira y Carneiro, 2005). Si se destruye este "esqueleto básico" de la MEC, la conformación normal de MEC y el tejido se desorganiza, condición que facilitaría la movilización del parásito dentro de ellos. Además, se ha propuesto que las alteraciones de MEC producidas por la presencia del parásito no sólo promueven su movilidad en los tejidos y su entrada en las células, sino también alteran la presencia de citocinas y quimiocinas, que a su vez permite a *T. cruzi* modular y evadir la respuesta inmune (Marino *et al.*, 2003).

La integridad de la célula hospedera es, muchas veces, un requisito para la supervivencia y el desarrollo de agentes patógenos. La activación o la prevención de la muerte celular parece ser un factor decisivo en el resultado de una infección, ya que puede facilitar o dificultar el control de patógenos y la propagación de estos (De Souza *et al.*, 2003). El proceso de muerte celular tipo apoptosis puede ser modulado durante la infección con diferentes microorganismos, como bacterias, virus y protozoos (De Souza *et al.*, 2003). Diversos patógenos inducen apoptosis en células del sistema inmune y evaden de esta manera el sistema de defensa del

organismo. Por otro lado, la inhibición de apoptosis de una célula hospedera puede permitir la proliferación intracelular de un patógeno (Weinrauch y Zychlinsky, 1999).

*Trypanosoma cruzi* puede inducir, retardar o inhibir la apoptosis en células del hospedero (Heussler *et al.*, 2001; Dosreis y Lopes, 2009). Tanto los parásitos intracelulares como las células hospedera sufren apoptosis durante la infección con *T. cruzi*. Estos procesos se han observado durante estudios de invasión celular *in vivo* e *in vitro* (De Souza *et al.*, 2003). Las principales células blanco, en las cuales *T. cruzi* induce apoptosis son macrófagos comparado con otras células de mamífero (De Souza, 2002; De Souza *et al.*, 2003), por lo que la inducción de apoptosis sería un mecanismo de evadir la respuesta inmune.

Se han descrito patógenos que inducen la apoptosis en la placenta humana como el citomegalovirus (Chan y Guilbert, 2006) y parásitos como *T. gondii* (Abbasi, 2003) y *P. falciparum* (Crocker *et al.*, 2004).

Este es el primer trabajo que describe la inducción de apoptosis en placenta humana por *T. cruzi*. Se induce la muerte celular tipo apoptosis en las vellosidades coriónicas tanto en el trofoblasto como en tejido conectivo fetal como se evidencia mediante la técnica de TUNEL (**Fig. 12**). Adicionalmente se cuantificó la actividad de caspasas efectoras del proceso apoptótico, actividad que se ve significativamente aumentada en las vellosidades coriónicas incubadas con el parásito (**Fig. 14**). La actividad de caspasas es función, de la concentración de parásitos. Adicionalmente se determinó la inducción de apoptosis en el sincitiotrofoblasto mediante la detección de un neo-epitopo, generado por caspasas, de citoqueratina 18 (**Fig. 13**). Interesantemente, la inmunoreactividad de este antígeno es más evidente en las vellosidades coriónicas incubadas con 105 parásitos que con una concentración mayor, contrariamente a lo observado con otros componentes de la MEC y con la inducción de muerte celular. Probablemente una cantidad más alta de parásitos, induce una mayor actividad de



caspasas, con fuerte destrucción tisular, o más temprana, que una menor concentración de parásitos.

Los resultados de esta memoria demuestran que el parásito durante su proceso de infección e invasión tisular destruye los distintos elementos de la MEC e induce apoptosis en los distintos compartimentos de las vellosidades coriónicas. El modelo de infección *ex vivo* de vellosidades coriónicas humanas, constituye por ende una excelente herramienta para estudiar los mecanismos de infección e invasión tisular del parásito.

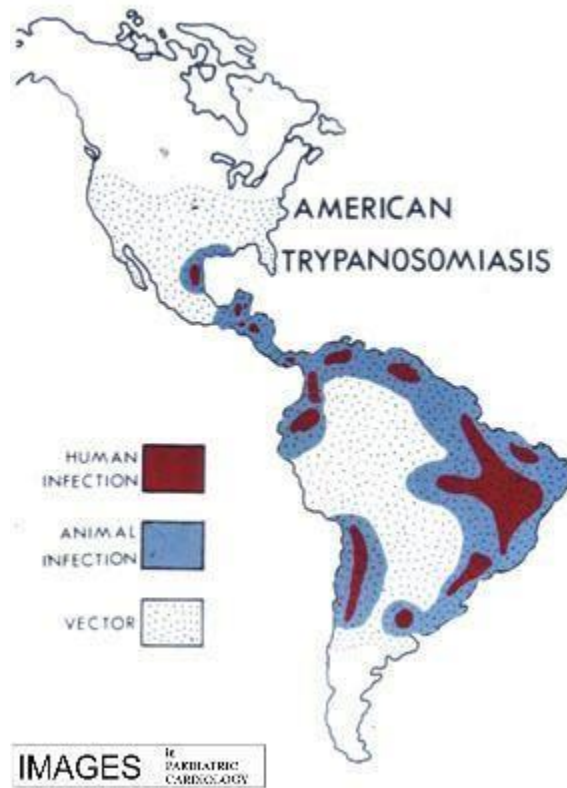
Por lo tanto en síntesis, la infección *ex vivo* de vellosidades coriónicas humanas con *T. cruzi* induce:

- Destrucción y desprendimiento del sinciciotrofoblasto.
- Desorganización y destrucción selectiva de las láminas basales.
- Desorganización y destrucción de colágeno I del tejido conectivo fetal.
- Apoptosis en los distintos compartimentos tisulares de la vellosidad coriónica.

## **CONCLUSION**

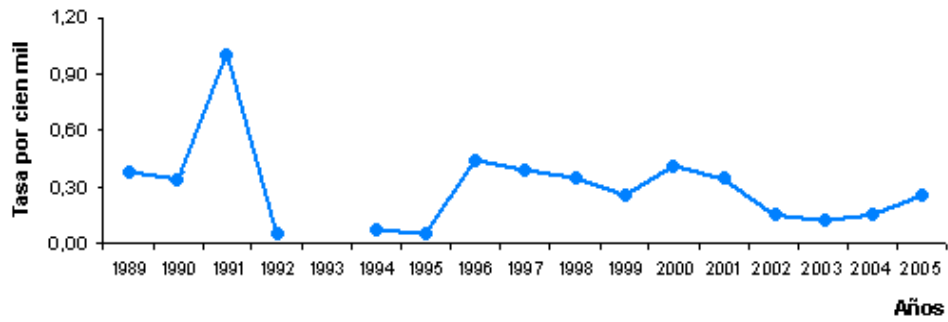
*Trypanosoma cruzi* induce daño celular y tisular severo en las vellosidades coriónicas, lo que facilitaría su ingreso a los capilares fetales y permitiría la infección del feto.

# FIGURAS



Fuente: Images. Paediatr. Cardiol. 2000; 5:29-40

**FIGURA 1** Países con enfermedad de Chagas endémica.



**Fuente: Ministerio de Salud**

\*No existen datos para 1993.

**FIGURA 2.** Tasa de incidencia de la enfermedad de Chagas en Chile.



Fuente: Organización Mundial de la Salud  
 <<http://www.who.int/tdroid/diseases/chagas/lifecycle.htm>>

**FIGURA 3** *Ciclo biológico de T. cruzi.*

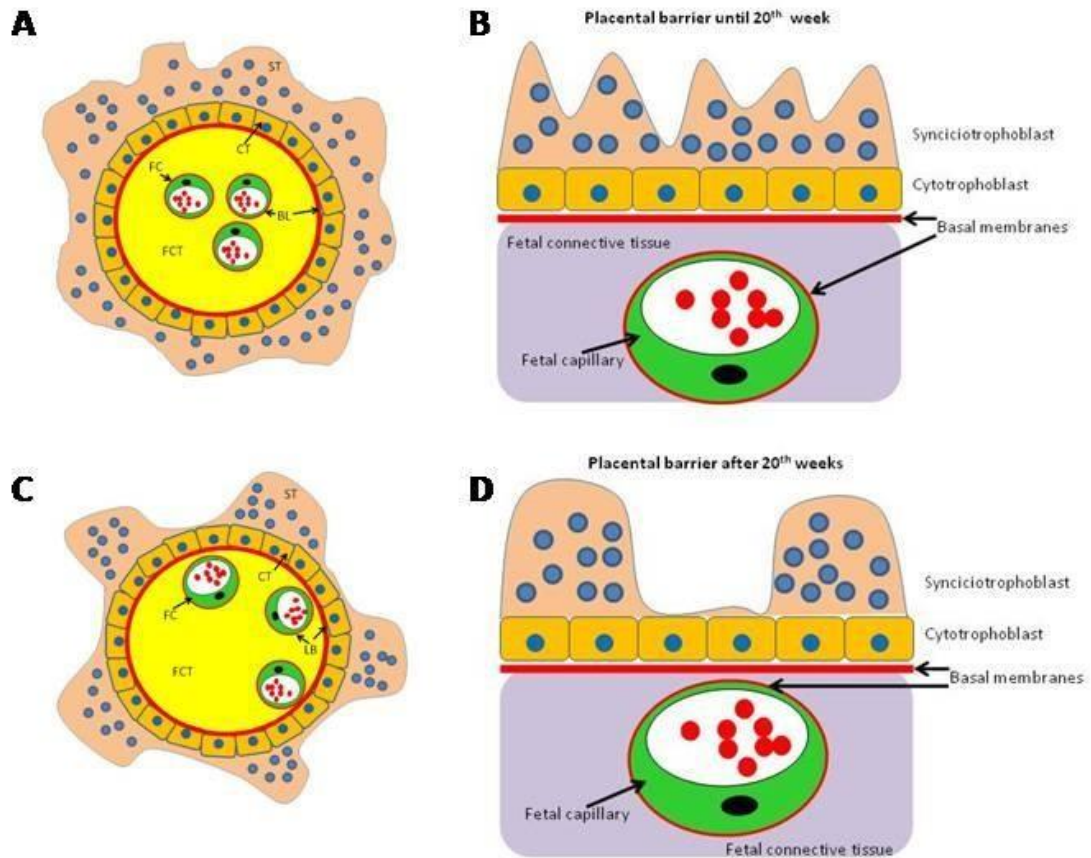
El insecto vector (triatomino) al alimentarse de sangre de un individuo infectado con el parásito junto con esta ingiere los tripomastigotes. A medida que éstos avanzan por el tracto digestivo del insecto vector se diferencian a epimastigotes, los cuales se multiplican quince a treinta veces. Cuando los epimastigotes alcanzan al intestino posterior del triatomino se diferencian nuevamente a tripomastigotes metacíclicos. El insecto al alimentarse nuevamente e inmediatamente después deyecta sus desechos contaminados con parásitos que ingresan al individuo a través del sitio de la picadura o a través de las mucosas. Los tripomastigotes penetran células nucleadas y se diferencian a amastigotes multiplicándose repetidas veces intracelularmente. Posteriormente se diferencian a tripomastigotes, lisan la célula, alcanzan la circulación y se diseminan por todo el organismo, quedando expuestos para que nuevamente sean ingeridos por un triatomino cerrando así, el ciclo biológico.



Fuente: Universidad de Texas Arlington.  
<<http://www.uta.edu/chagas/html/biolTcru.html>>

**FIGURA 4** *Formas celulares de T. cruzi.*

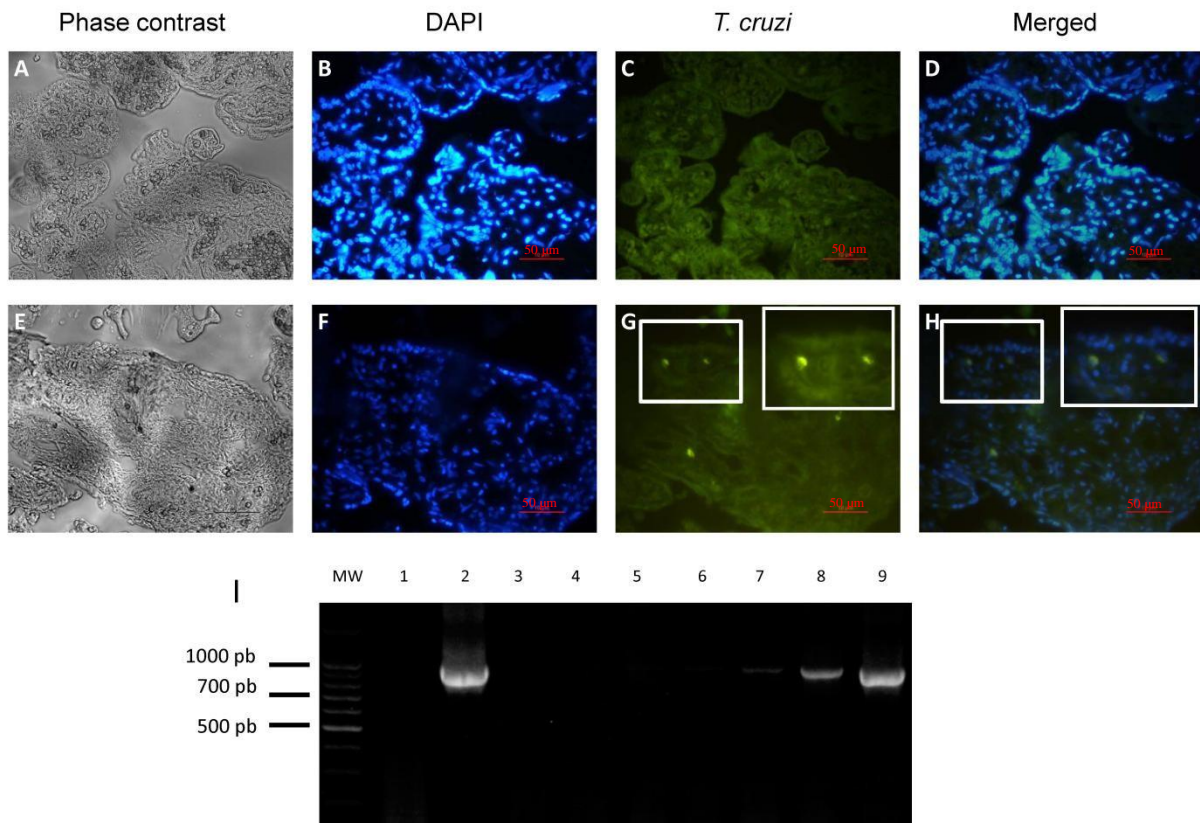
El parásito presenta tres formas celulares diferentes: **(A)** tripomastigote, forma infectante, no proliferativa; **(B)** epimastigote, forma multiplicativa que se sitúa en el tubo digestivo del agente vector y en cultivos; y **(C)** amastigote, que es la forma replicativa intracelular en los mamíferos.



Fuente: Kemmerling *et al.*, *Biological Research*, 2010. (Manuscrito 09 102, en prensa)

**FIGURA 5** Barrera placentaria.

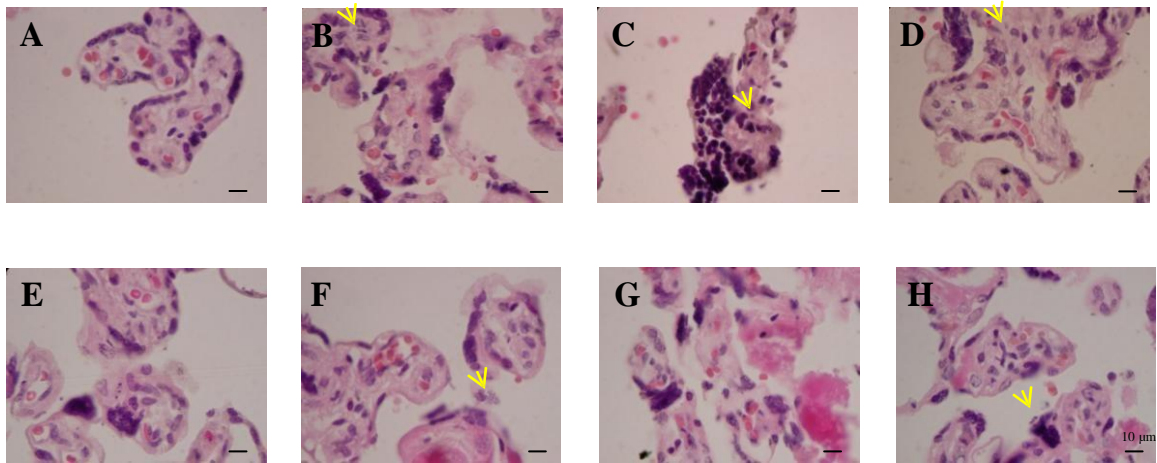
La barrera placentaria está compuesta por sinciotrofoblasto (ST), citotrofoblasto (CT), tejido conectivo fetal (FCT), capilares fetales (FC) y láminas basales entre el tejido conectivo fetal y trofoblasto (BLT) y alrededor de los capilares fetales (FCBL) (A – D). Después de la semana 20 de gestación, la placenta sufre modificaciones para favorecer el intercambio metabólico. Las células del citotrofoblasto disminuyen, los núcleos del sinciotrofoblasto se agrupan formando nodos y los capilares del tejido conectivo fetal se acercan al trofoblasto, adelgazándose la barrera placentaria (C – D).



**FIGURA 6** Detección de *T. cruzi* en vellosidades coriónicas infectadas *ex vivo* con el parásito.

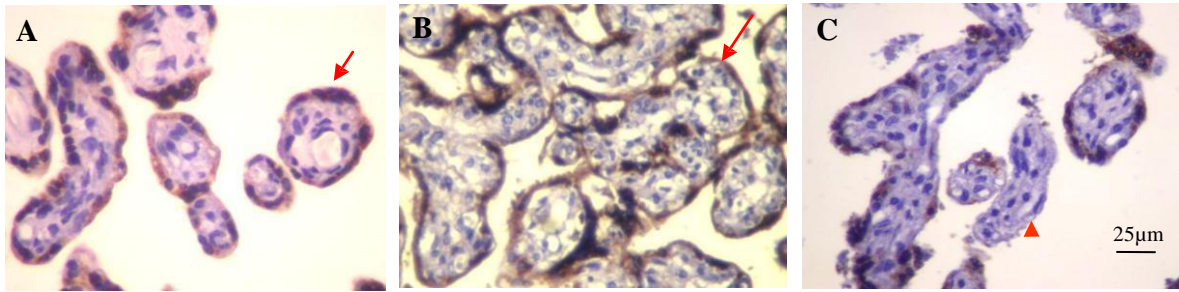
Vellosidades coriónicas humanas fueron incubadas durante 24 en ausencia (A – D) y presencia de  $10^5$  (E – H) tripomastigotes. Se observa la presencia del parásito mediante inmunodetección del antígeno “*T. cruzi* flagellar calcium binding protein”. Se detecta al parásito en el interior de las vellosidades coriónicas humanas infectadas *ex vivo* (E – H). Las muestras fueron procesadas mediante técnicas de inmunofluorescencia convencionales. En (I) se muestra la detección del parásito en vellosidades coriónicas infectadas con *T. cruzi* mediante PCR.





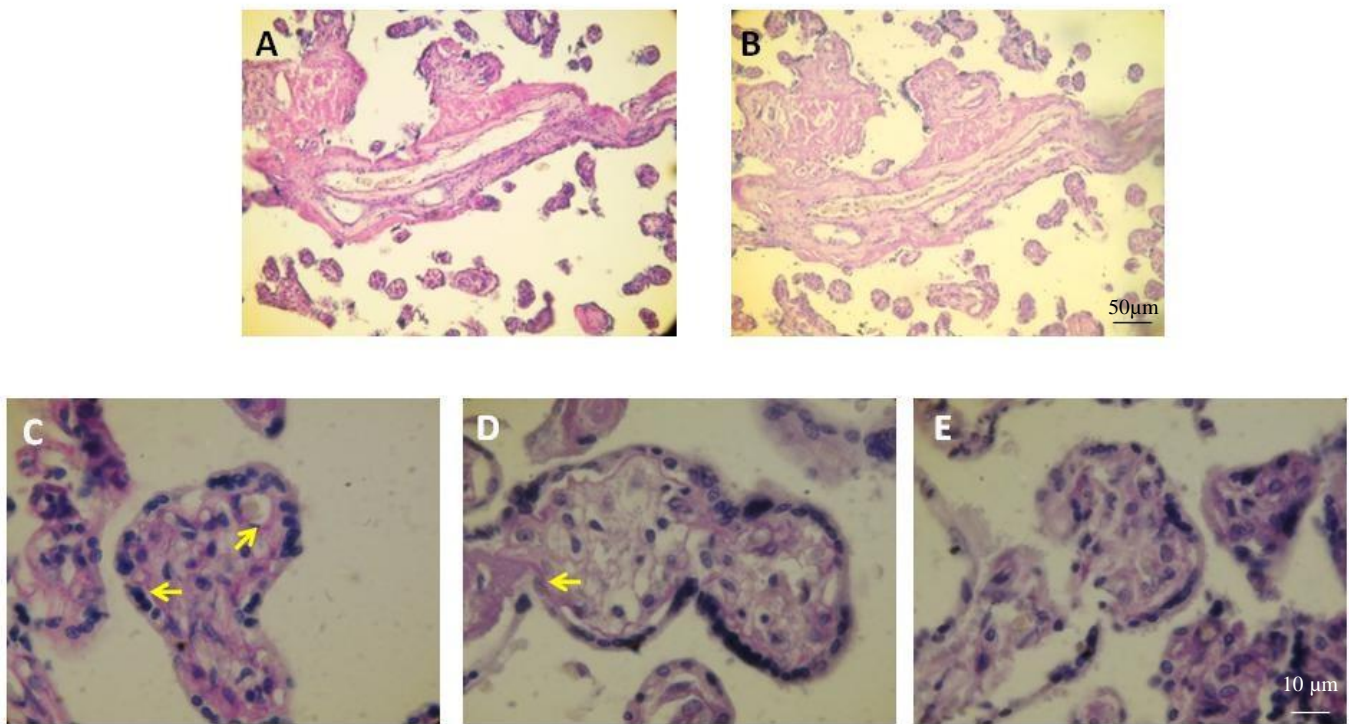
**FIGURA 7** Análisis histopatológico de vellosidades coriónicas infectadas ex vivo con *T. cruzi*.

Vellosidades coriónicas humanas fueron incubadas durante 24 horas con concentraciones decrecientes de tripomastigotes cepa DM28c de  $2 \times 10^6$  (**B**) a  $1,25 \times 10^5$  (**H**). Las vellosidades coriónicas incubadas con tripomastigotes muestran un marcado daño tisular respecto a las vellosidades controles (**A**). Se observa separación y desorganización del sinciciotrofoblasto así como destrucción del tejido conectivo fetal. Las flechas amarillas indican la posible presencia del parásito en el tejido. Las vellosidades coriónicas fueron procesadas mediante técnicas histológicas convencionales y teñidas con hematoxilina eosina.



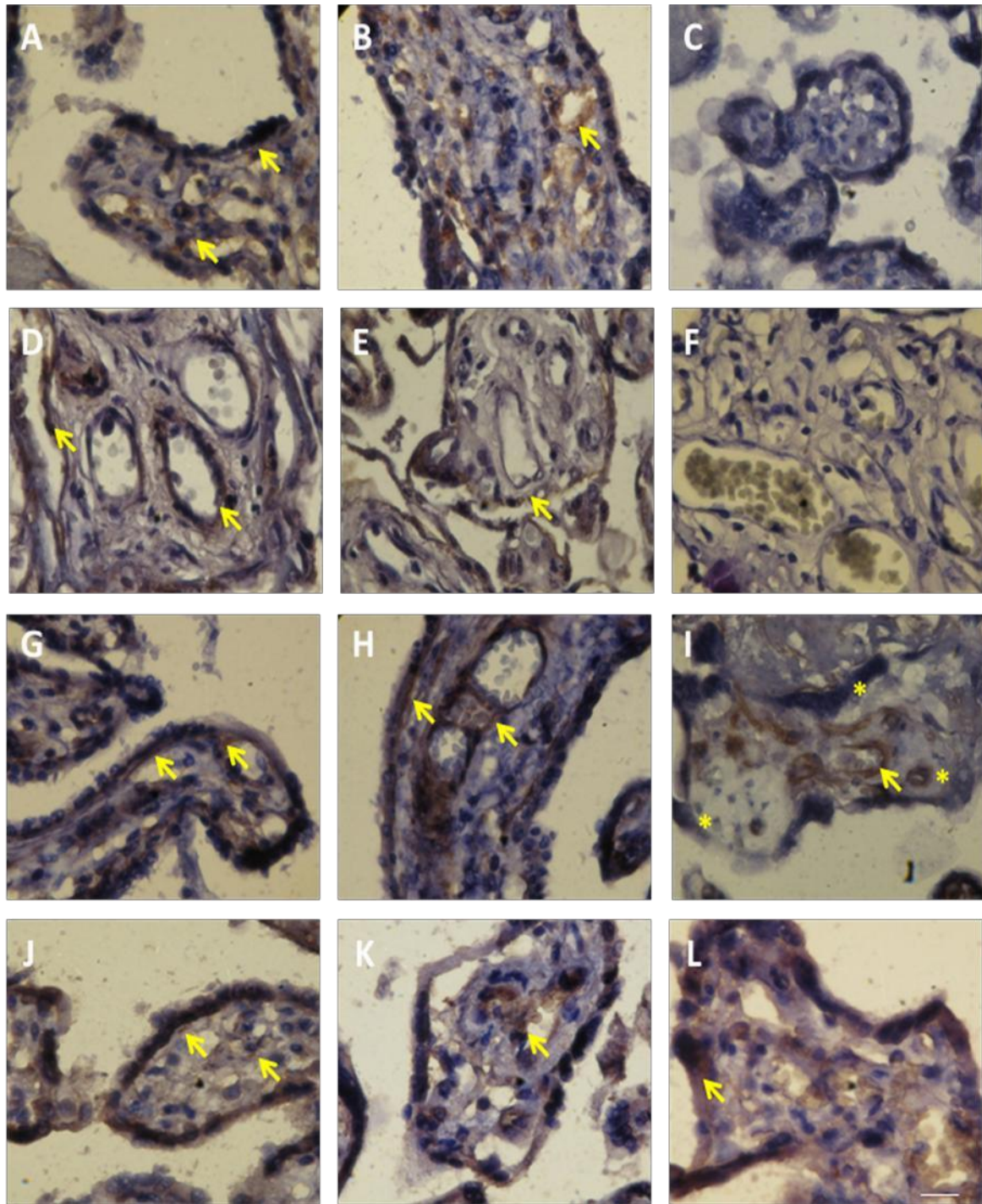
**FIGURA 8** *T. cruzi* induce destrucción y desprendimiento del sinciotrofoblasto.

Las vellosidades coriónicas incubadas con  $10^5$  (B) y  $10^6$  (C) tripomastigotes cepa DM28c durante 24 horas muestran desprendimiento y destrucción del sinciotrofoblasto respecto a las vellosidades coriónicas controles (A) evidenciado mediante la inmunodetección de lactógeno placentario humano (marcador de sinciotrofoblasto). Las flechas indican al sinciotrofoblasto mientras que el triangulo indica área de desprendimiento del sinciotrofoblasto. Las vellosidades coriónicas fueron procesadas mediante técnicas inmunohistoquímicas convencionales y la reacción antígeno anticuerpo fue revelado con DAB.



**FIGURA 9** *T. cruzi* induce disminución de macromoléculas glicosiladas.

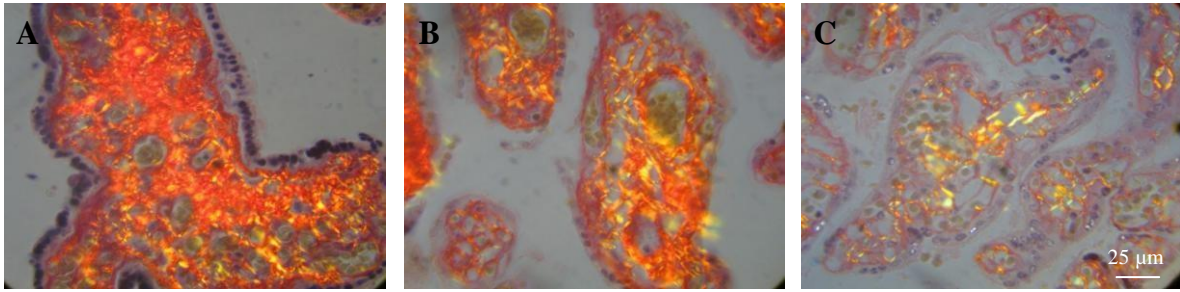
Vellosidades coriónicas humanas fueron incubadas durante 24 horas con  $10^5$  (D) y  $10^6$  tripomastigotes (E). Las vellosidades coriónicas incubadas con tripomastigotes muestran un marcado daño tisular respecto a las vellosidades controles (A-C). Las vellosidades coriónicas incubadas con el parásito (D y E) muestran menor tinción para moléculas glicosiladas (PAS) que las vellosidades controles (A y C). Las vellosidades coriónicas incubadas con la concentración más alta de parásitos (E) muestran menor tinción que las vellosidades controles (A y C) o incubadas con una menor concentración de tripomastigotes (D). En (B) se muestra imagen de un preparado histológico de vellosidades coriónicas tratadas previamente con  $\alpha$  amilasa durante 30 minutos a  $37^\circ\text{C}$  como control de la reacción de PAS. Flechas amarillas indican láminas basales PAS +.



**FIGURA 10** *T. cruzi* induce destrucción selectiva de las láminas basales.

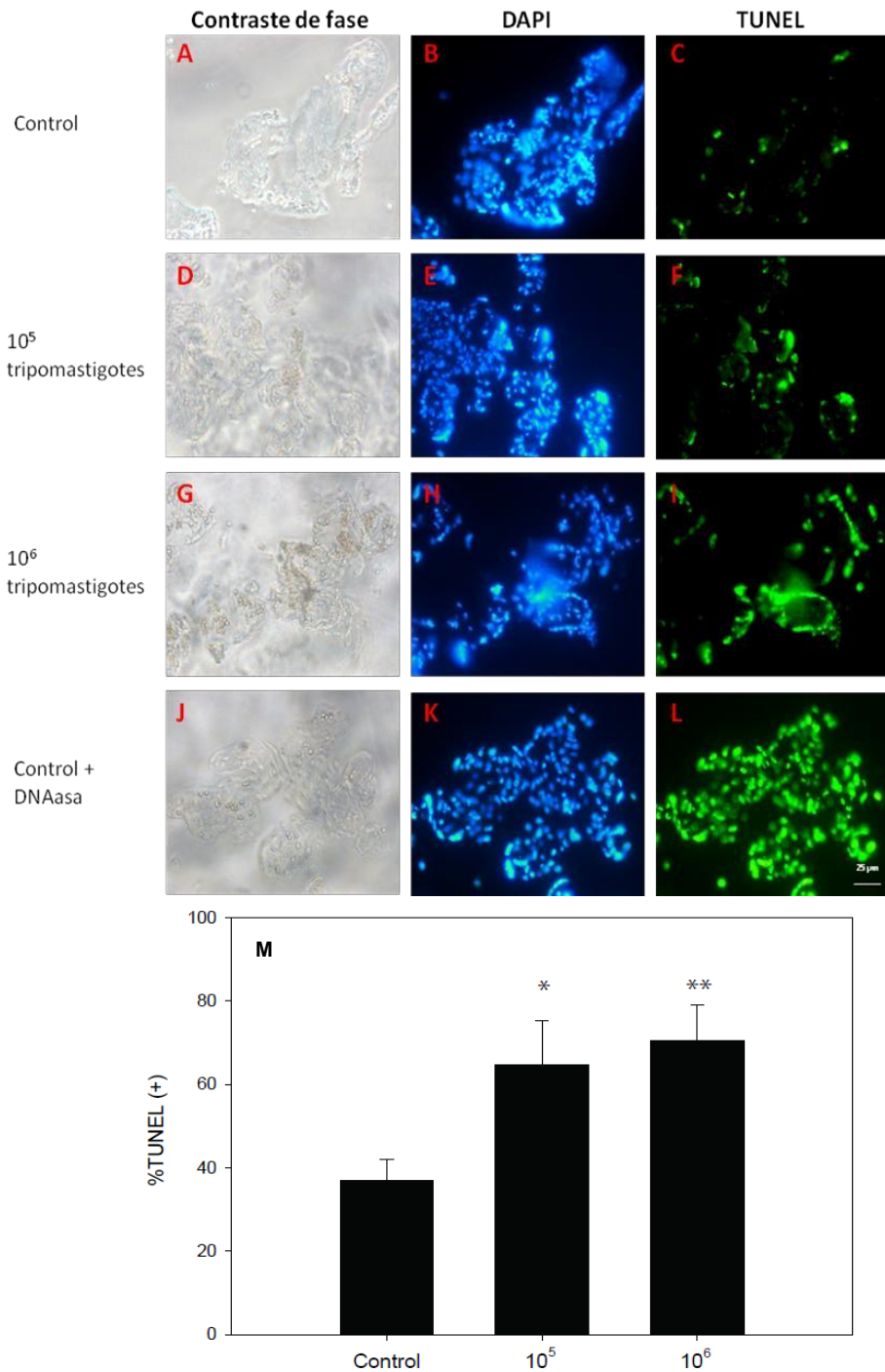
Vellosidades coriónicas humanas fueron incubadas durante 24 horas con  $10^5$  (**B, E, H, K**) y  $10^6$  (**C, F, I, L**) tripomastigotes cepa DM28c. Las vellosidades coriónicas incubadas con tripomastigotes muestran un marcado daño tisular respecto a las vellosidades controles (**A, D, G, J**). Se observa una disminución de la inmunoreactividad para heparansulfato (**B**) y

laminina **(E)** en las vellosidades incubadas con  $10^5$  tripomastigotes, y ausencia de reactividad en las vellosidades incubadas con  $10^6$  tripomastigotes **(C y F)**. En las vellosidades coriónicas incubadas con  $10^5$  tripomastigotes no se pierde la inmunoreactividad para colágeno IV. En las vellosidades coriónicas incubadas con  $10^6$  se pierde la inmunoreactividad en las láminas basales que separan el trofoblasto del tejido conectivo fetal **(I, asterisco amarillo)**, no así alrededor de los vasos sanguíneos fetales **(I)**. Las flechas amarillas indican marcas inmunopositivas para el antígeno estudiado. No se observa alteración en la inmunoreactividad para fibronectina **(J-L)**. Las vellosidades coriónicas fueron procesadas mediante técnicas inmunohistoquímicas convencionales y la reacción antígeno anticuerpo fue revelado con DAB.



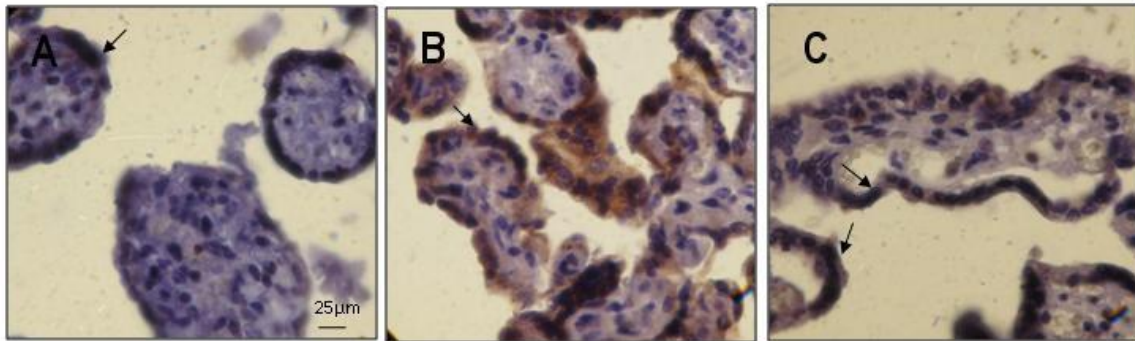
**FIGURA 11** *T. cruzi* induce destrucción y desorganización de colágeno I en el tejido conectivo fetal.

Vellosidades coriónicas humanas fueron incubadas durante 24 horas en ausencia (**A**) y, con  $10^5$  (**B**) y  $10^6$  (**C**) tripomastigotes DM28c. Las vellosidades coriónicas incubadas con tripomastigotes (**B y C**) muestran una marcada desorganización del colágeno I en el tejido conectivo fetal así como desorganización y separación del sinciciotrofoblasto. Las vellosidades coriónicas fueron procesadas mediante técnicas histológicas convencionales; el colágeno I se identificó con la técnica histoquímica de picro rojo sirio.



**FIGURA 12** *T. cruzi* induce fragmentación de DNA en las vellosidades coriónicas.

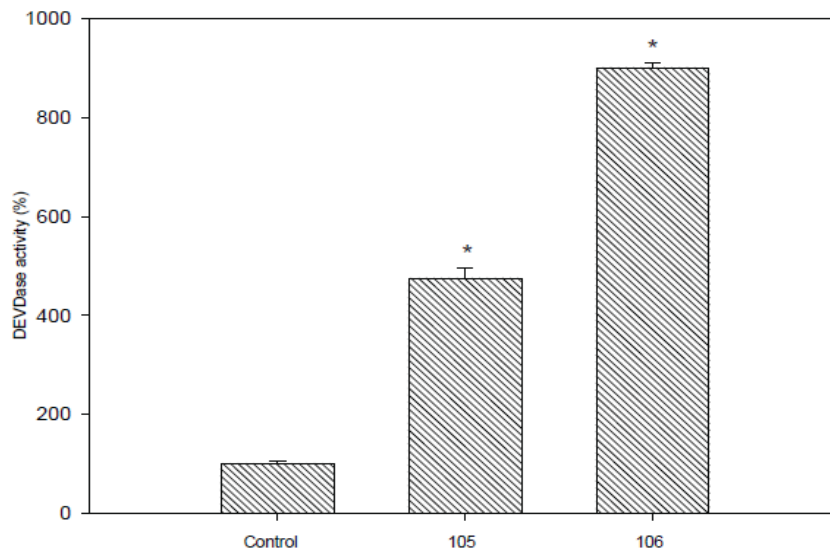
Vellosidades coriónicas humanas fueron incubadas durante 24 horas con 10<sup>5</sup> (D, E, F) y 10<sup>6</sup> (G, H, I) tripomastigotes cepa DM28c. Las vellosidades coriónicas incubadas con tripomastigotes (D – I) muestran un aumento en las células TUNEL+ (F, I) respecto a las vellosidades controles (A – C). En J, K y L se muestran vellosidades coriónicas controles tratados con DNAasa. En M se muestra cuantificación de las células TUNEL+, el aumento de las células TUNEL+ respecto al control es estadísticamente significativo (\* p ≤ 0,05, \*\* p ≤ 0,01).



**FIGURA 13** *T. cruzi* induce la generación, mediada por caspasas, de neo-epitopos de citoqueratina 18.

Las vellosidades coriónicas fueron incubadas con  $10^5$  (B) o  $10^6$  (C) tripomastigotes cepa DM28c durante 24 horas. Las vellosidades coriónicas incubadas con  $10^5$  parásitos muestran una marcada inmunoreactividad para el neo-epitopo de citoqueratina 18 (flechas) (B), vellosidades coriónicas incubadas con  $10^6$  parásitos presentan una menor inmunoreactividad (C). En vellosidades controles no se aprecia inmunoreactividad para el neo-epitopo (A). Las vellosidades coriónicas fueron procesadas mediante técnicas inmunohistoquímicas convencionales y la reacción antígeno anticuerpo fue revelado con DAB.





**FIGURA 14** *T. cruzi* induce actividad tipo caspasa – 3 en vellosidades coriónicas.

Vellosidades coriónicas incubados con  $10^5$  ó  $10^6$  tripomastigotes cepa DM28c durante 24 horas muestra un aumento significativo de la actividad tipo caspasa – 3 (DEVDase). Los resultados se expresan como porcentaje relativo de la actividad tipo caspasa en las vellosidades corionicas control. Los datos se expresan como promedio  $\pm$  S.E.M.  $P < 0,01$ .

## BIBLIOGRAFÍA

- ABBASI, M.; KOWALEWSKA-GROCHOWSKA, K.; BAHAR, MA.; KILANI, RT.; WINKLER-LOWEN, B.; GUILBERT, LJ.** 2003. Infection of placental trophoblasts by *Toxoplasma gondii*. *J. Infect. Dis.* 188(4):608-16.
- ALBERTS, B.; JOHNSON, A.; LEWIS J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WALTER, P.** 2008. *Molecular biology of the cell*; Fifth Edition; Garland science; New York. USA. 1601p.
- ALONSO-VEGA, C.; HERMANN, E.; TRUYENS, C.; RODRIGUEZ, P.; TORRICO, MC.; TORRICO, F.; CARLIER, Y.** 2005. Immunological status of mothers infected with *Trypanosoma cruzi*. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 38 Suppl 2:101-4.
- ALTEMANI, AM.; BITTENCOURT, AL.; LANA, AM.** 2000. Immunohistochemical characterization of the inflammatory infiltrate in placental chagas' disease: A qualitative and quantitative analysis. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 62(2): 319-324
- AMINO, R.; MARTINS, RM; PROCOPIO, J.; HIRATA, IY.; JULIANO, MA; TRIALYSIN.** 2002. a novel pore-forming protein from saliva of hematophagous insects activated by limited proteolysis. *J Biol Chem* 277:6207-6213
- ANDRADE SG.** 1982. The influence of the strain of *Trypanosoma cruzi* in placental infections in mice. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 76:123-8.
- ANDRADE, SG.; GRIMAUD, JA.; STOCKER-GUERRET, S.** 1989. Sequential changes of the connective matrix components of the myocardium (fibronectin and laminin) and evolution of cardiac fibrosis in mice infected with *Trypanosoma cruzi*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 40(3):252-60.
- ANDRADE, LO.; ANDREWS, NW.** 2005. The *Trypanosoma cruzi*-host-cell interplay: location, invasion, retention. *Nat. Rev. Microbiol.* 3(10):819-23.

**AOKI, MP.; GUIÑAZÚ, NL.; PELLEGRINI, AV.; GOTOH, T.; MASIH, DT.; GEA, S.** 2004. Cruzipain, a major *Trypanosoma cruzi* antigen, promotes arginase-2 expression and survival of neonatal mouse cardiomyocytes. *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.* 286(2):C206-12.

**ATÍAS, A.** 1998. *Parásitología Médica*. 1ª ed. Santiago. Publicaciones Técnicas Mediterráneo Ltda. Pp. 251-264.

**AUFDERHEIDBE, AC.; SALO, W.; MADDEN, M.; STREITZ, J.; BUIKSTRA, J.; GUHL, F.; ARRIAZA, B.; RENIER, C.; WITTMERS, LE JR.; FORNACIARI, G.; ALLISON, M.** 2004 A 9,000-year record of Chagas' disease. *Proc. Nat.l Acad. Sc.i USA.* 101(7):2034-9.

**BELKACEMI, C.; CHEN, C.H.; ROSS, M.G.; DESAI M.** 2009 Increased Placental Apoptosis in Maternal Food Restricted Gestations: Role of the Fas Pathway. *Placenta* 30: 739–751

**BENYO, DF.; MILES, TM.; CONRAD, KP.** 1997. Hypoxia stimulates cytokine production by villous explants from the human placenta. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 82(5):1582-8.

**BIEDERMANN, K.; FLEPP, M.; FIERZ, W.; JOLLER-JEMELKA, H.; KLEIHUES, P.** 1995. Pregnancy, immunosuppression and reactivation of latent toxoplasmosis. *J. Perinat. Med.* 23(3):191-203.

**BITTENCOURT, AL.** 1976 Congenital Chagas' disease. *Am. J. Dis. Child.* 130:97-103.

**BLANCO, SB.; SEGURA, EL.; CURA, EN.; CHUIT, R.; TULIA'N, L.; FLORES, I.** 2000. Congenital transmission of *Trypanosoma cruzi*: an operational outline for detecting and treating infected infants in northwestern Argentina. *Trop. Med. Int. Health.* 5:293-301.

**BRADFORD, M.** 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248-254.

**BURGOS, JM.; ALTCHER, J.; BISIO, M.; DUFFY, T.; VALADARES, HM.; SEIDENSTEIN, ME.; PICCINALI, R.; FREITAS, JM.; LEVIN, MJ.; MACCHI, L.; MACEDO, AM.; FREILIJ, H.; SCHIJMAN, AG.** 2007 Direct molecular profiling of minicircle signatures and lineages of *Trypanosoma cruzi* bloodstream populations causing congenital Chagas disease. *Int. J. Parasitol.* 37(12):1319-27.

**BURLEIGH, BA.; ANDREWS, NW.** 1995. The mechanisms of *Trypanosoma cruzi* invasion of mammalian cells. *Annu. Rev. Microbiol.* 49:175-200.

**BURLEIGH, BA.; WOOLSEY, AM.** 2002. Cell signalling and *Trypanosoma cruzi* invasion. *Cell. Microbiol.* 4(11):701-11.

**CARLIER, Y.** 2005. Factors and mechanisms involved in the transmission and development of congenital infection with *Trypanosoma cruzi*. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 38 Suppl 2:105-7.

**CARVALHO, LO.; ABREU-SILVA, AL.; HARDOIM, DDE J.; TEDESCO, RC.; MENDES, VG.; DA COSTA, SC.; CALABRESE, KS.** 2009. *Trypanosoma cruzi* and myoid cells from seminiferous tubules: interaction and relation with fibrous components of extracellular matrix in experimental Chagas' disease. *Int. J. Exp. Pathol.* 90(1):52-7.

**CASTRO, JA.; DE MECCA, MM.; BARTEL, LC.** 2006 Toxic side effects of drugs used to treat Chagas' disease (American trypanosomiasis). *Hum. Exp. Toxicol.* 25(8):471-9.

**CERQUEIRA, GC.; BARTHOLOMEU, DC.; DAROCHA, WD.; HOU, L.; FREITAS-SILVA, DM.; MACHADO, CR.; EL-SAYED, NM.; TEIXEIRA, SM.** 2008. Sequence diversity and evolution of multigene families in *Trypanosoma cruzi*. *Mol Biochem Parasitol.* 157(1):65-72.

- CHAGAS, C.** 1909. Nova tripanosomiase humana. Estudos sobre a morfología e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi* n.gen, n.sp., agente etiológico do nova entidae mórbida do homen. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 1:159-218.
- CHAN, G.; GUILBERT, LJ.** 2006. Ultraviolet-inactivated human cytomegalovirus induces placental syncytiotrophoblast apoptosis in a Toll-like receptor-2 and tumour necrosis factor-alpha dependent manner. J. Pathol.210(1):111-20.
- CORREA, D.; CAÑEDO-SOLARES, I.; ORTIZ-ALEGRÍA, LB.; CABALLERO-ORTEGA, H.; RICO-TORRES, CP.;** 2007. Congenital and acquired toxoplasmosis: diversity and role of antibodies in different compartments of the host. Parasite Immunol. 29(12):651-60.
- COURA, JR.** 2007. Chagas disease: what is known and what is needed: a background article. Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 102 Suppl 1:113-22.
- CROCKER, IP.; TANNER, OM.; MYERS, JE.; BULMER, JN.; WALRAVEN, G.; BAKER, PN.** 2004. Syncytiotrophoblast Degradation and the Pathophysiology of the Malaria-infected Placenta. Placenta 25: 273–282
- CROSS, JC.** 2006. Placental function in development and disease. Reprod. Fertil. Dev. 18(1-2):71-6.
- DE SOUZA, W.** 2002. From the cell biology to the development of new chemotherapeutic approaches against trypanosomatids: dreams and reality. Kinetoplastid Biol. Dis. 31;1(1):3.
- DE SOUZA, EM.; ARAFFLJO-JORGE, TC.; BAILLY ,C.; LANSIAUX, A.; BATISTA, MM.; OLIVEIRA, GM.; SOEIRO, MN.** 2003. Host and parasite apoptosis following *Trypanosoma cruzi* infection in *in vitro* and *in vivo* models. Cell. Tissue. Res. 314:223–235.

**DE SOUZA, EM.; MEUSER-BATISTA, M.; BATISTA, DG.; DUARTE, BB.; ARAÚJO-JORGE, TC.; SOEIRO, MNC.** 2008. *Trypanosoma cruzi*: Alpha-2-macroglobulin regulates host cell apoptosis induced by the parasite infection in vitro. *Experimental Parasitology* 118: 331–337.

**DERRIEN, M.; FAYE, A.; DOLCINI, G.; CHAOUAT, G.; BARRÉ-SINOUSI, F.; MENU, E.** 2005. Impact of the placental cytokine-chemokine balance on regulation of cell-cell contact-induced human immunodeficiency virus type 1 translocation across a trophoblastic barrier in vitro. *J. Virol.* 79(19):12304-10.

**DESAI, M.; TER KUILE, FO.; NOSTEN, F.; MCGREADY, R.; ASAMOA, K.; BRABIN, B.; NEWMAN, RD.** 2007. Epidemiology and burden of malaria in pregnancy. *Lancet. Infect. Dis.* 7(2):93-104.

**DI NOIA, JM.; BUSCAGLIA, CA.; DE MARCH, CR.; ALMEIDA, IC.; FRASCH, AC.** 2002. A *Trypanosoma cruzi* small surface molecule provides the first immunological evidence that Chagas' disease is due to a single parasite lineage. *J. Exp. Med.* 195(4):401-13.

**DISCHE, MR.; QUINN, PA.; CZEGLÉDY-NAGY, E.; STURGESS, JM.** 1979. Genital mycoplasma infection. Intrauterine infection: pathologic study of the fetus and placenta. *Am. J. Clin. Pathol.* 72(2):167-74.

**DOSREIS, GA.; LOPES, M.** 2001. The importance of apoptosis for immune regulation in Chagas disease. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 104 (Suppl. I): 259-262

**FERNANDEZ-AGUILAR, S.; LAMBOT, MA.; TORRICO, F.; ALONSO-VEGA, C.; CÓRDOBA, M.; SUAREZ, E.; NOËL, JC.; CARLIER, Y.** 2005. Placental lesions in human *Trypanosoma cruzi* infection. *Rev Soc. Bras. Med. Trop.* 38 Suppl 2:84-6.

**FREITAS, JM.; LAGES-SILVA, E.; CREMA, E.; PENA, SD.; MACEDO, AM.** 2005. Real time PCR strategy for the identification of major lineages of *Trypanosoma cruzi* directly in chronically infected human tissues. *Int. J. Parasitol.* 35(4):411-7.

**FRIEDMAN, JF.; MITAL, P.; KANZARIA, HK.; OLDS, GR.; KURTIS, JD.** 2007. Schistosomiasis and pregnancy. *Trends Parasitol.* 23(4):159-64.

**FUJIWARA, H.** 2007. Membrane-bound peptidases regulate human extravillous trophoblast invasion. *Placenta.* 28 Suppl A:S70-5.

**GAMAIN, B.; SMITH, JD.; VIEBIG, NK.; GYSIN, J.; SCHERF, A.** 2007. Pregnancy-associated malaria: parasite binding, natural immunity and vaccine development. *Int. J. Parasitol.* 37(3-4):273-83.

**GARCÍA, MM.; DE RISSIO, AM.; VILLALONGA, X.; MENGONI, E.; CARDONI, RL.** 2008. Soluble tumor necrosis factor (TNF) Receptors (sTNF-R1 and -R2) in pregnant women chronically infected with *Trypanosoma cruzi* and their children. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 78(3):499-503.

**GARZONI, LR.; ADESSE, D.; SOARES, MJ.; ROSSI, MI.; BOROJEVIC, R.; MEIRELLES, MD.** 2008. Fibrosis and Hypertrophy Induced by *Trypanosoma cruzi* in a Three-Dimensional Cardiomyocyte-Culture System. *J. Infect. Dis.* 197(6):906-915.

**GEDEON C, KOREN G.** 2005. Designing pregnancy centered medications: drugs which do not cross the human placenta. *Placenta.* 27(8):861-8.

**GIORDANO, R., FOUTS, DL., TEWARI, D., COLLI, W., MANNING, JE., ALVES, MJM.** 1999. Cloning of a surface membrane glycoprotein specific for the infective form of *Trypanosoma cruzi* having adhesive properties to laminin. *J. Biol. Chem.* 274: 3461–3468.

**GRIMM, H.** 1955. An observation on the growth-promoting and growth-inhibiting substance of the placenta. *Z Arztl. Fortbild.* 49(15-16):531-5.

**GUILBERT, L.; ROBERTSON, SA.; WEGMANN, TG.** 1993. The trophoblast as an integral component of a macrophage-cytokine network. *Immunol. Cell. Biol.* 71 (Pt 1):49-57.

**GUTIERREZ, FR.; LALU, MM.; MARIANO, FS.; MILANEZI, CM.; CENA, J.; GERLACH, RF.; SANTOS, JE.; TORRES-DUEÑAS, D.; CUNHA, FQ.; SCHULZ, R.; SILVA, JS.** 2008. Increased Activities of Cardiac Matrix Metalloproteinases Matrix Metalloproteinase (MMP)-2 and MMP-9 Are Associated with Mortality during the Acute Phase of Experimental *Trypanosoma cruzi* Infection. *J. Infect. Dis.*197(10):1468-1476.

**HALWACHS-BAUMANN G.** 2006.The congenital cytomegalovirus infection: virus-host interaction for defense and transmission. *Curr. Pharm. Biotechnol.* 7(4):303-12.

**HERMANN, E.; TRUYENS, C.; ALONSO-VEGA, C.; EVEN, J.; RODRIGUEZ, P.; BERTHE, A.; GONZALEZ-MERINO, E.; TORRICO, F.; CARLIER, Y.** 2002 Human fetuses are able to mount an adultlike CD8 T-cell response. *Blood.* 100(6):2153-8.

**HERMANN, E.; TRUYENS, C.; ALONSO-VEGA, C.; RODRIGUEZ, P.; BERTHE, A.; TORRICO, F.; CARLIER, Y.** 2004. Congenital transmission of *Trypanosoma cruzi* is associated with maternal enhanced parasitemia and decreased production of interferon- gamma in response to parasite antigens. *J. Infect. Dis.* 189(7):1274-81

**HERMANN, E.; ALONSO-VEGA, C.; BERTHE, A.; TRUYENS, C.; FLORES, A.; CORDOVA, M.; MORETTA, L.; TORRICO, F.; BRAUD, V.; CARLIER, Y.** 2006. Human congenital infection with *Trypanosoma cruzi* induces phenotypic and functional modifications of cord blood NK cells. *Pediatr. Res.* 60(1):38-43

**HEUSSLER, VT.; KÜENZI, P.; ROTTENBERG, S.** 2001 Inhibition of apoptosis by intracellular protozoan parasites. *International Journal for Parasitology* 31: 1166-1176

**HIGUCHI, ML.; FUKASAWA, S.; DE BRITO, T.; PARZIANELLO, LC.; BELLOTTI, G.; RAMIRES, JA.** 1999. Different microcirculatory and interstitial matrix patterns in idiopathic dilated cardiomyopathy and Chagas' disease: a three dimensional confocal microscopy study. *Heart.* 82(3):279-85.



**JAMES, JL.; STONE, PR.; CHAMLEY, LW.** 2006. The effects of oxygen concentration and gestational age on extravillous trophoblast outgrowth in a human first trimester villous explant model. *Hum. Reprod.* 21(10):2699-705.

**JAMISON, D.; BREMAN, J.; MEASHAM, A.; MUSGROVE, P.** 2006. Tropical Diseases Targeted for Elimination: Chagas Disease, Lymphatic Filariasis, Onchocerciasis, and Leprosy. In *Disease Control Priorities in Developing Countries*, DCPD; World Bank.

**JUNQUEIRA, LCU.; BIGNOLAS, G.; BRENTANI, RR.** 1979. Picrosirius staining plus polarization microscopy, a specific method for collagen detection in tissue sections. *Histochem. J.* 11(4):447-55.

**JUNQUEIRA, LC.; CARNEIRO, J.** 2005. *Basic Histology: Text and Atlas*. 11 edition. McGraw-Hill Company. New York. USA. 502p.

**KEMMERLING, U.; MUÑOZ, P.; MÜLLER, M.; SÁNCHEZ, G.; AYLWIN, ML.; KLANN, E.; CARRASCO, MA.; HIDALGO, C.** 2007. Calcium release by ryanodine receptors mediates hydrogen peroxide-induced activation of ERK and CREB phosphorylation in N2a cells and hippocampal neurons. *Cell Calcium.* 41(5):491-502.

**KEMMERLING, U.; BOSCO C AND GALANTI, N.** 2010. Infection and invasion mechanism of *Trypanosoma cruzi* in the congenital transmission of Chagas' disease: A proposal. Aceptado en revista *Biological Research*. Manuscrito 09 102.

**KIERNAN, J.** 2008 *Histological and histochemical methods : theory and practice*, fourth edition. Scion publishing ltd. Kent. United Kingdom. 606p.

**KIRCHHOFF, LV.** 1993. American trypanosomiasis (Chagas' disease) a tropical disease now in the United States. *N. Engl. J. Med.* 329:639-44

**KOI, H.; ZHANG, J.; PARRY, S.** 2001. The Mechanisms of Placental Viral Infection. *Ann. NY. Acad. Sci.* 943:148-56.

**KROL, J.; MENGELE, K.; OTTL-MANTCHENKO, I.; WELK, A.; WASILEWITSCH, I.; VON STEINBURG, SP.; SCHNEIDER, KT., SCHMITT, M.** 2005 *Ex vivo* detection of apoptotic trophoblast cells applying flow cytometry and immunocytochemistry using M30 antibody directed to the cytokeratin 18 neo-epitope. *Int J. Mol. Med. Sep*;16(3):415-20.

**KUMAR, V.; ABBAS, AK.; FAUSTO, N.; ROBBINS AND COTRAN.** 2005. *Pathologic Basis of Disease.* 7th ed. St. Louis, Mo: WB Saunders.

**LESCURE, FX.; CANESTRI, A.; MELLIEZ, H.; JAURÉGUIBERRY, S.; DEVELOUX, M.; DORENT, R.; GUIARD-SCHMID, JB.; BONNARD, P.; AJANA, F.; ROLLA, V.; CARLIER, Y.; GAY, F.; ELGHOZZI MH.; DANIS, M.; PIALOUX, G.** 2008. Chagas Disease, France. *Emerg. Infect. Dis.* 14(4):644-646.

**LIMA, AP.; ALMEIDA, PC.; TERSARIOL, IL.; SCHMITZ, V.; SCHMAIER, AH.; JULIANO, L.; HIRATA, IY.; MÜLLER-ESTERL, W.; CHAGAS, JR.; SCHARFSTEIN, J.** 2002 Heparan sulfate modulates kinin release by *Trypanosoma cruzi* through the activity of cruzipain. *J. Biol. Chem.* 277(8):5875-81.

**LIN, S.; SARTORI, MJ.; MEZZANO, L.; DE FABRO, SP.** 2004. Epidermal growth factor (EGF) in the human placental infection with *Trypanosoma cruzi*. *Placenta.* 25(4):283-6.

**LIN, S.; SARTORI, MJ.; MEZZANO, L.; DE FABRO, SP.** 2005. Placental alkaline phosphatase (PLAP) enzyme activity and binding to IgG in Chagas' disease. *Placenta.* 26(10):789-95.

**LORCA, M.; SOTO, P.; RUIZ, M.; CONTRERAS, C.; SALINAS, P.; GUERRA, A.; IRRIBARRA, N.; BODOR, P.; VIVANCO, P.; ARREDONDO, A.; TRINCADO, A.; RAPHAEL, T.; EGAÑA, M.; PAVLETIC, C.; PARRA, A.** 2006. Serological study for Chagas disease in children younger than 10 years old from Valparaíso and San Antonio, Chile. *Rev. Med. Chil.* 134(10):1345-6.

**LUJÁN, CD.; TRIQUEL, MF.; SEMBAJ, A.; GUERRERO, CE.; FRETES, RE.** 2004. *Trypanosoma cruzi*: productive infection is not allowed by chorionic villous explant from normal human placenta *in vitro*. Exp. Parasitol. 108(3-4):176-81.

**MAGDESIAN, MH.; GIORDANO, R.; ULRIC, H.; JULIANO, MA.; JULIANO, L.; SCHUMACHER, RI.; COLLI, W.; ALVES, MJ.** 2001 Infection by *Trypanosoma cruzi*. Identification of a parasite ligand and its host cell receptor. J. Biol. Chem. 276(22):19382-9.

**MANOEL-CAETANO, S.; SILVA, AE.** 2007. Implications of genetic variability of *Trypanosoma cruzi* for the pathogenesis of Chagas disease. Cad. Saude. Publica. 23(10):2263-74.

**MANQUE, PM.; NEIRA, I.; ATAYDE, VD.; CORDERO, E.; FERREIRA, AT.; DA SILVEIRA, JF.; RAMIREZ, M.; YOSHIDA, N.** 2003. Cell adhesion and Ca<sup>2+</sup> signaling activity in stably transfected *Trypanosoma cruzi* epimastigotes expressing the metacyclic stage-specific surface molecule gp82. Infect. Immun. 71(3):1561-5.

**MARGONO, F.; MROUEH, J.; GARELY, A.; WHITE, D.; DUERR, A.; MINKOFF, HL.** 1994. Resurgence of active tuberculosis among pregnant women. Obstet. Gynecol. 83(6):911-4.

**MARINO, AP.; SILVA, AA.; PINHO, RT.; LANNES-VIEIRA, J.** 2003. *Trypanosoma cruzi* infection: a continuous invader-host cell cross talk with participation of extracellular matrix and adhesion and chemoattractant molecules. Braz. J. Med. Bio.l Res. 36(8):1121-33.

**MENDES-DA-CRUZ, DA.; SILVA, JS.; COTTA-DE-ALMEIDA, V.; SAVINO, W.** 2006. Altered thymocyte migration during experimental acute *Trypanosoma cruzi* infection: combined role of fibronectin and the chemokines CXCL12 and CCL4. Eur. J. Immunol. 36(6):1486-93.

**MEZZANO, L.; SARTORI, MJ.; LIN, S.; REPOSSI, G.; DE FABRO, SP.** 2005 Placental alkaline phosphatase (PLAP) study in diabetic human placental villi infected with *Trypanosoma cruzi*. Placenta. 26(1):85-92.

**MOORE, KL.; PERSEAUD, TVN.;** 2004. Embriología clínica, el desarrollo del ser Humano. 7° Edición. Elsevier. Madrid. España. 558p.

**MORELLO, A.; LETELIER, M.E.; ALDUNATE, J.; REPETTO, Y.** 1987. Enfermedad de Chagas, biotransformación de xenobióticos por el *Trypanosoma cruzi*. In: Estudios en honor de Gustavo Hoecker. Auch 14: 33-48.

**NDE, PN.; SIMMONS, KJ.; KLESHCHENKO, YY.; PRATAP, S.; LIMA, MF.; VILLALTA, F.** 2006. Silencing of the laminin gamma-1 gene blocks *Trypanosoma cruzi* infection. Infect. Immun. 74(3):1643-8.

**NISIDA, IVV.; AMATO-NETO, V.; BRAZ, LMA.; DUARTE, MIS.; UMEZAWA, ESA.** 1999. Survey of congenital Chagas' disease, carried out at three health institutions in São Paulo City, Brazil. Rev. Inst. Med. Trop .Sao Paulo. 41:305-11.

**NOGUEIRA, AC.; DE SOUZA, EP.; ELIAS, CG.; DOS SANTOS, AL.; BRANQUINHA, MH.; D'AVILA-LEVY, C.; DOSREIS, FC.; COSTA, TF.; LIMA, AP.; DE SOUZA, MC.; MEIRELLES, MN.; VERMELHO, AB.** 2010. Detection of matrix metalloproteinase-9-like proteins in *Trypanosoma cruzi*. Exp. Parasitol. 125(3):256-63.

**OLEA.** 1998. Situación Epidemiológica de la Enfermedad de Chagas en Chile. [en línea] <<http://epi.minsal.cl/epi/html/public/chagaschile.htm>> [consulta: 02-03-2010].

**ORTEGA-BARRIA, E.; PEREIRA, ME.** 1991. A novel *T. cruzi* heparin-binding protein promotes fibroblast adhesion and penetration of engineered bacteria and trypanosomes into mammalian cells. Cell. 67(2):411-21.

**OUAISSI, MA.; CORNETTE, J.; CAPRON, A.** 1985. *Trypanosoma cruzi*: modulation of parasite-cell interaction by plasma fibronectin. Eur. J. Immunol. 15(11):1096-101.

- PRATA A.** 2001. Clinical and epidemiological aspects of Chagas disease. *Lancet Infect. Dis.* 1(2):92-100.
- RAGHUPATHY, R.** 2001. Pregnancy: success and failure within the Th1/Th2/Th3 paradigm. *Semin. Immunol.* 13(4):219-27.
- RAGHUPATHY, R.; KALINKA, J.** 2008 Cytokine imbalance in pregnancy complications and its modulation. *Front. Biosci.* 1;13:985-94.
- ROBINSON, NJ.; WAREING, M.; HUDSON, NK.; BLANKLEY, RT.; BAKER, PN.; APLIN, JD.; CROCKER, IP.** 2008. Oxygen and the liberation of placental factors responsible for vascular compromise. *Lab. Invest.* 88(3):293-305.
- ROCHA, G.; MARTINS, A.; GAMA, G.; BRANDÃO, F.; ATOUGUIA, J.** 2004. Possible cases of sexual and congenital transmission of sleeping sickness. *Lancet.* 17;363(9404):247
- ROGERSON, SJ.; HVIID, L.; DUFFY, PE.; LEKE, RF.; TAYLOR, DW.** 2007. Malaria in pregnancy: pathogenesis and immunity. *Lancet. Infect. Dis.* 7(2):105-17
- SALAS, C.; TAPIA, RA.; CIUDAD, K.; ARMSTRONG, V.; ORELLANA, M.; KEMMERLING, U.; FERREIRA, J.; MAYA, JD.; MORELLO, A.** 2008. *Trypanosoma cruzi*: activities of lapachol and alpha- and beta-lapachone derivatives against epimastigote and trypomastigote forms. *Bioorg. Med. Chem.* 15;16(2):668-74.
- SANTANA, JM.; GRELLIER, P.; SCHRÉVEL, J.; TEIXEIRA, AR.** 1997. A *Trypanosoma cruzi*-secreted 80 kDa proteinase with specificity for human collagen types I and IV. *Biochem. J.* 325 (Pt 1):129-37.
- SARTORI, MJ.; PONS, P.; MEZZANO, L.; LIN, S.; DE FABRO, SP.** 2003 *Trypanosoma cruzi* infection induces microfilament depletion in human placenta syncytiotrophoblast. *Placenta.* 24(7):767-71.

**SARTORI, MJ.; MEZZANO, L.; LIN, S.; REPOSSI, G.; FABRO, SP.** 2005. Cellular components and placental alkaline phosphatase in *Trypanosoma cruzi* infection. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 38 Suppl 2:87-91.

**SCHARFSTEIN, J.; MORROT, A.** 1999. A role for extracellular amastigotes in the immunopathology of Chagas disease. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 94 Suppl. 1:51-63.

**SCHARFSTEIN, J.; SCHMITZ, V.; MORANDI, V.; CAPELLA, MM.; LIMA, AP.; MORROT, A.; JULIANO, L.; MÜLLER-ESTERL, W.** 2000. Host cell invasion by *Trypanosoma cruzi* is potentiated by activation of bradykinin B(2) receptors. *J. Exp. Med.* 192(9):1289-300.

**SCHMUNIS, GA.** 2007. Epidemiology of Chagas disease in non-endemic countries: the role of international migration. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 30;102 Suppl 1:75-85.

**SEEHO, SK.; PARK, JH.; ROWE, J.; MORRIS, JM.; GALLERY, ED.** 2008. Villous explant culture using early gestation tissue from ongoing pregnancies with known normal outcomes: the effect of oxygen on trophoblast outgrowth and migration. *Hum Reprod.* PMID: 18325889

**SHIPPEY, SH III.; ZAHN, CM.; CISAR, MM.; WU, TJ.; SATIN, AJ.** 2005. Use of the placental perfusion model to evaluate transplacental passage of *Trypanosoma cruzi*. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 192(2):586-91.

**SOARES, MB.; PONTES-DE-CARVALHO, L.; RIBEIRO-DOS-SANTOS, R.** 2001. The pathogenesis of Chagas' disease: when autoimmune and parasite-specific immune responses meet. *An. Acad. Bras. Cienc.* 73:547-559.

**STUART, H.; SHIPPEY, III.; MD.; CHRISTOPHER, M.; ZAHN, MD.; MARGARET, M.; CISAR, BS.; JOHN, WU.; ANDREW, J.; SATIN, MD.** 2005. Use of the placental perfusion model to evaluate transplacental passage of *Trypanosoma cruzi*. *American Journal of Obstetrics and Gynecology* 192, 586–91.

**SYME, MR.; PAXTON, JW.; KEELAN, JA.** 2004. Drug transfer and metabolism by the human placenta. *Clin. Pharmacokinet.* 43(8):487-514.

**TEIXEIRA AR.; NITZ, N.; GUIMARO, MC.; GOMES, C.; SANTOS-BUCH, CA.;** 2006. Chagas disease. *Postgrad. Med. J.* 82(974): 788-98.

**THOMPSON, SW.** 1996 Selected histochemical and histopatological methods, CC Thomas, Springfield, (IL), pp 520-539

**TORRICO, F.; CASTRO, M.; SOLANO, M.; RODRIGUEZ, P.; TORRICO, MC.;** **TRUYENS, C.; CARLIER, Y.** 2005. Effects of maternal infection with *Trypanosoma cruzi* in pregnancy development and in the newborn infant. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 38 Suppl 2:73-6

**TRIQUELL, MF.; DÍAZ-LUJÁN, C.; FREILIJ, H.; PAGLINI, P.; FRETES RE.** 2009. Placental infection by two subpopulations of *Trypanosoma cruzi* is conditioned by differential survival of the parasite in a deleterious placental medium and not by tissue reproduction. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene.* En prensa.

**TRUYENS, C.; HERMANN, E.; ALONSO-VEGA, C.; RODRIGUEZ, P.;** **VEKEMANS, J.; TORRICO, F.; CARLIER, Y.** 2005. Immune responses of non-infected neonates of mothers infected with *Trypanosoma cruzi*. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 38 Suppl 2:96-100.

**TYLER, K.; ENGMAN, D.** 2001. Invited Review. The life cycle of *Trypanosoma cruzi* revisited. *International Journal for Parasitology*; 31: 472-81.

**ULRICH, H.; MAGDESIAN, MH.; ALVES, MJ.; COLLI, W.** 2002. *In vitro* selection of RNA aptamers that bind to cell adhesion receptors of *Trypanosoma cruzi* and inhibit cell invasion. *J. Biol. Chem.* 277(23):20756-62.

**VIEITES, M.; OTERO, L.; SANTOS, D.; OLEA-AZAR, C.; NORAMBUENA, E.; AGUIRRE, G.; CERECETTO, H.; GONZÁLEZ, M.; KEMMERLING, U.; MORELLO, A.; MAYA, JD.; GAMBINO, D.** 2009. Platinum-based complexes of bioactive 3-(5-nitrofuryl)acroleine thiosemicarbazones showing anti-*Trypanosoma cruzi* activity. *J. Inorg. Biochem.* 103(3):411-8.

**VILLALTA, F.; ZHANG, Y.; BIBB, KE.; BURNS, JM JR.; LIMA, MF.** 1998. Signal transduction in human macrophages by gp83 ligand of *Trypanosoma cruzi*: trypomastigote gp83 ligand up-regulates trypanosome entry through the MAP kinase pathway. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 249(1):247-52.

**VILLALTA, F.; ZHANG, Y.; BIBB, KE.; PRATAP, S.; BURNS, JM JR.; LIMA, MF.** 1999. Signal transduction in human macrophages by gp83 ligand of *Trypanosoma cruzi*: trypomastigote gp83 ligand up-regulates trypanosome entry through protein kinase C activation. *Mol. Cell. Biol. Res. Commun.* 2(1):64-70.

**WEINRAUCH, Y.; ZYCHLINSKY, A.** 1999. The induction of apoptosis by bacterial pathogens. *Annu. Rev. Microbiol.* 53:155–187.

**WIRTH, JJ.; KIERSZENBAUM, F.** 1984. Fibronectin enhances macrophage association with invasive forms of *Trypanosoma cruzi*. *J. Immunol.* 133(1):460-4.

**WORLD HEALTH ORGANIZATION.** 2002. Control of Chagas' disease. Report of the WHO Expert Committee. *World Health Organ Tech. Rep. Series.* 120p.

**WORLD HEALTH ORGANIZATION.** 2007. Proyecto World Health Organization on behalf of the Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases: Reporte del grupo de trabajo científico sobre la enfermedad de Chagas". Buenos Aires, Argentina. World Health Organization. 104p.

**YOSHIDA, N.** 2006. Molecular basis of mammalian cell invasion by *Trypanosoma cruzi*. *An. Acad. Bras. Cienc.* 78(1):87-111.



**YOSHIDA N.** 2008. Trypanosoma cruzi infection by oral route How the interplay between parasite and host components modulates infectivity. *Parásitol. Int.* 57(2):105-9.

## ANEXO 1



25 JUN. 2008

### CONSENTIMIENTO INFORMADO

#### **ENFERMEDAD DE CHAGAS: MECANISMOS DE INFECCIÓN E INVASIÓN DE PLACENTA HUMANA CON *Trypanosoma cruzi***

Nombre del Investigador principal: **Ulrike Kemmerling**  
Institución: **Instituto de Ciencias Biomédicas, Facultad de Medicina, Universidad de Chile**  
Teléfonos: **9786261, 9786018, 9786783**

Le estamos invitando a participar en el proyecto de investigación "ENFERMEDAD DE CHAGAS: MECANISMOS DE INFECCIÓN E INVASIÓN DE PLACENTA HUMANA CON *Trypanosoma cruzi*".

**Objetivos:** Esta investigación tiene por objetivo estudiar los mecanismos de infección placentaria del parásito que causa la Enfermedad de Chagas.

El estudio incluirá a un número total de 80 pacientes, del Hospital Clínico de la Universidad de Chile

**Procedimientos:** Si Ud. acepta participar donará la placenta que se obtendrá durante el parto, la cual será ocupada en un momento posterior en un laboratorio de ciencias biomédicas para estudiar los mecanismos de infección placentaria del parásito que causa la Enfermedad de Chagas.

**Riesgos:** La donación de la placenta **no constituye riesgo alguno para Usted**, ya que después del parto este órgano ya no cumple funciones en el organismo de la madre ni cumple funciones para el bebé.

**Costos:** El estudio que se realizará con la placenta no tiene costo para Usted, ya que todos los procedimientos que se realizarán con la placenta serán posterior e independientes del parto.

Como participante en este estudio Ud. o su sistema previsional deberán financiar las hospitalizaciones, honorarios, exámenes y tratamientos habituales para el estudio y atención de su parto.

**Beneficios:** La participación en este estudio aportará al conocimiento sobre los mecanismos de transmisión de la Enfermedad de Chagas congénita.

**Compensación:** Ud. no recibirá ninguna compensación económica por su participación en el estudio.



25 Apr 2008

**Confidencialidad:** Toda la información derivada de su participación en este estudio será conservada en forma de estricta confidencialidad, lo que incluye el acceso de los investigadores o agencias supervisoras de la investigación. Cualquier publicación o comunicación científica de los resultados de la investigación será completamente anónima.

**Voluntariedad:** Su participación en esta investigación es totalmente voluntaria

**Complicaciones:** La donación de la placenta no interfiere con la atención habitual de un parto normal o por cesárea. Tampoco se relaciona con las posibles complicaciones propias de su enfermedad y de su curso natural.

**Derechos del participante:** Si Ud. requiere cualquier otra información sobre su participación en este estudio puede llamar a:

Investigador:

- Dra Ulrike Kemmerling, 9786261, 9786018
- Dra Cleo Bosco, 9786783
- Dr Norbel Galanti, 9786475, 9786067

Autoridad de la Institución: Director del Instituto de Ciencias Biomédicas, Facultad de Medicina, Dr. Norbel Galanti, 9786475, 9786067

**Conclusión:**

Después de haber recibido y comprendido la información de este documento y de haber podido aclarar todas mis dudas, otorgo mi consentimiento para participar en el proyecto "Enfermedad de Chagas: Mecanismos de infección e invasión de Placenta humana con *Trypanosoma cruzi*".

Nombre del sujeto

Firma

Fecha

Nombre de informante

Firma

Fecha

Ulrike Kemmerling  
Nombre del investigador

Ulrike Kemmerling  
Firma

26/6/08  
Fecha

*Si se trata de un paciente incompetente, registrar nombre del paciente y de su apoderado.*

## ANEXO 2



UNIDAD DE BIOSEGURIDAD  
FACULTAD DE MEDICINA  
UNIVERSIDAD DE CHILE

Santiago, 30 de Abril 2008.-

Señores  
**PROGRAMA FONDECYT**  
**PRESENTE**

Estimados señores

La Unidad de Prevención de Riesgos y Bioseguridad, Facultad de Medicina, Universidad de Chile certifica que ha recibido del investigador responsable Profesora Ulrike Kemmerling Weis, para su estudio el proyecto titulado **"CHAGAS DISEASE: MECHANISMS OF INFECTION AND INVASION OF HUMAN PLACENTA BY TRYPANOSOMA CRUZI"**. Laboratorio de Biología Celular y Molecular, Programa de Biología Celular y Molecular, ICBM, Facultad de Medicina, Universidad de Chile, el cual cumple con los requerimientos básicos de Bioseguridad para ser desarrollado, además se adecua a las exigencias establecidas por los manuales: CONICYT " Bioseguridad 1<sup>ra</sup> edición, 1994" y " Manual de Normas de Bioseguridad, 2<sup>da</sup> edición 2008, Centro de Control y Prevención de Enfermedades, CDC, 4<sup>o</sup> edición, Manual Bioseguridad en laboratorios , Organización Mundial de la Salud OMS, Ginebra 2005, por tal motivo nuestra Unidad da el visto bueno para su realización.

El investigador responsable Profesora Ulrike Kemmerling Weis, se compromete a cumplir con las normas de bioseguridad indicadas en los manuales antes mencionados y las establecidas en el Reglamento Interno del funcionamiento de los Laboratorios, Unidad de Prevención de Riesgos y Bioseguridad, Facultad de Medicina, Universidad de Chile. En concomitancia se hace responsable de que todos los participantes del proyecto cumplan con las normas de bioseguridad establecidas.

Tomé conocimiento: Profesora  **Ulrike Kemmerling Weis**

  
**Profesora Mónica Adriana Patzke**  
**Directora Unidad de Prevención de Riesgos y Bioseguridad**



\* Se adjunta anexo IX.1 Proyecto Fondecyt

c.c.

- Vicedecano, Dr. Ennio Vivaldi
- Director Instituto de Ciencias Biomédicas ICBM, Dr. Norbel Galanti
- Investigador responsable, Profesora Ulrike Kemmerling Weis
- Archivo



UNIVERSIDAD DE CHILE  
FACULTAD DE MEDICINA

**COMITÉ DE ÉTICA DE INVESTIGACIÓN EN SERES HUMANOS**

**ACTA DE APROBACIÓN  
PROYECTO DE INVESTIGACIÓN SERES HUMANOS**

Con fecha 24 de Junio de 2008, el Comité de Ética de Investigación en Seres Humanos de la Facultad de Medicina, Universidad de Chile, integrado por los siguientes miembros:

Dr. Manuel Oyarzún G., Médico Neumólogo, Presidente  
Sra. Marianne Gaudlitz H., Enfermera, Mg Humanidades, Vicepresidente  
Dr. Hugo Amigo C., Ph. D., Especialista en Salud Pública  
Dr. Leandro Biagini, Médico Internista  
Dra. Lucía Cifuentes, Médico Genetista  
Sra. Nina Horwitz, Sociólogo, Mg Bioética  
Sr. Claus Jahn, Representante de la Comunidad  
Dr. Miguel O'Ryan, Médico Pediatra Infectólogo  
Dr. Julio Pallavicini, Médico Psiquiatra

Ha revisado el Proyecto de Investigación titulado: **"ENFERMEDAD DE CHAGAS: MECANISMOS DE INFECCIÓN E INVASIÓN DE PLACENTA HUMANA CON *Trypanosoma cruzi*."**

y cuyo investigador responsable es: **Dra. Ulrike Kemmerling**

Quien desempeña funciones en: **Programa de Anatomía y Biología del Desarrollo, ICBM, Facultad de Medicina, Universidad de Chile**

*El Comité revisó los siguientes documentos del estudio:*

- *Proyecto de investigación in extenso*
- *Consentimiento informado*
- *CV del investigador responsable y de los Co-investigadores*
- *Carta de aceptación de las autoridades de la institución en que se realizará el estudio*
- *Carta compromiso del investigador para comunicar los resultados del estudio una vez finalizado éste.*

**Departamento de Bioética y Humanidades Médicas**  
**Teléfono: 9786923 Fax: 9786189 Email: ceiha@med.uchile.cl**



### ANEXO 3



UNIVERSIDAD DE CHILE  
FACULTAD DE MEDICINA

#### COMITÉ DE ÉTICA DE INVESTIGACIÓN EN SERES HUMANOS

El proyecto y los documentos señalados en el párrafo precedente han sido analizados a la luz de los postulados de la Declaración de Helsinki, de las Pautas Éticas Internacionales para la Investigación Biomédica en Seres Humanos CIOMS 2002, y de las Guías de Buena Práctica Clínica de ICH 1996.

Sobre la base de esta información el Comité de Ética de la Investigación en Seres Humanos de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile se ha pronunciado de la siguiente manera sobre los aspectos del proyecto que a continuación se señalan:

Este es un proyecto que tiene como objetivo estudiar los mecanismos de infección e invasión de placenta humana con *Trypanosoma cruzi*.

La investigación no es terapéutica. La población a estudiar no es cautiva. Se pedirá a las voluntarias la donación de la placenta después del parto.

Riesgos y beneficios: No hay riesgos para las personas que donen su placenta. Los beneficios están en el estudio de la infección placentaria.

Protección de los participantes (asegurada por el consentimiento informado): La protección de los participantes está asegurada en el Consentimiento Informado, voluntariedad, confidencialidad, no existe coerción.

Notificación oportuna de reacciones adversas: No es necesaria.

Compromiso del investigador responsable en la notificación de los resultados del estudio al finalizar el proyecto: Sí.

Por lo tanto, el comité estima que el estudio propuesto está bien justificado y que no significa para los sujetos involucrados riesgos físicos, psíquicos o sociales mayores que mínimos.

**Departamento de Bioética y Humanidades Médicas**  
Teléfono: 9786923 Fax: 9786189 Email: [ceiha@med.uchile.cl](mailto:ceiha@med.uchile.cl)





UNIVERSIDAD DE CHILE  
FACULTAD DE MEDICINA

**COMITÉ DE ÉTICA DE INVESTIGACIÓN EN SERES HUMANOS**

Este comité también analizó y aprobó el correspondiente documento de Consentimiento Informado en su versión corregida el 25 de Junio de 2008, que se adjunta firmado, fechado y timbrado por el CEISH.

En virtud de las consideraciones anteriores el Comité otorga la aprobación ética para la realización del estudio propuesto, dentro de las especificaciones del protocolo.



**Sra. Marianne Gaudlitz**  
Vicepresidenta  
Comité de Ética en Investigación  
en Seres Humanos

25 JUN. 2008

MGH/mva.  
c.c.: Proy. 013-2008  
Santiago, 25 de Junio de 2008.

*Departamento de Bioética y Humanidades Médicas  
Teléfono: 9786923 Fax: 9786189 Email: celha@med.uchile.cl*