



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

**Rol de miR-515-5p en la susceptibilidad a la infección con *Trypanosoma cruzi* en  
explantes de placenta humana**

**Alfredo Andrés Sepúlveda Carrasco**

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

PROFESOR GUÍA: Prof. Dra. Ulrike Kemmerling Weis  
Instituto de Ciencias Biomédicas, Facultad de Medicina

SANTIAGO, CHILE  
2022



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

**Rol de miR-515-5p en la susceptibilidad a la infección con *Trypanosoma cruzi* en  
explantes de placenta humana**

**Alfredo Andrés Sepúlveda Carrasco**

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

NOTA FINAL: .....	NOTA:	FIRMA:
PROFESOR GUÍA:	ULRIKE KEMMERLING	.....
PROFESOR CONSEJERO:	GALIA RAMÍREZ	.....
PROFESOR CONSEJERO:	LEONARDO SAENZ	.....

## ÍNDICE

<b>RESUMEN</b> .....	5
<b>ABSTRACT</b> .....	6
<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	7
<b>REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA</b> .....	8
<i>Generalidades</i> .....	8
<i>Trypanosoma cruzi</i> .....	8
<i>Ciclo biológico de Trypanosoma cruzi</i> .....	8
<i>Epidemiología de la enfermedad de Chagas</i> .....	11
<i>Enfermedad de Chagas</i> .....	11
<i>Enfermedad de Chagas congénita</i> .....	12
<i>La placenta humana</i> .....	13
<i>Trofoblasto y recambio epitelial como mecanismo de defensa contra T. cruzi</i> .....	14
<i>Regulación de la expresión de genes por miRNAs</i> .....	16
<i>miRNAs en placenta</i> .....	17
<i>miRNA 515-5p</i> .....	18
<b>HIPÓTESIS</b> .....	19
<b>OBJETIVO GENERAL</b> .....	19
<b>OBJETIVOS ESPECÍFICOS</b> .....	19
<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	20
<b>Resultados</b> .....	24
<i>HPEs pueden ser transfectados efectivamente con mimics y antagomirs miR-515-5p sin causar daño al tejido.</i> .....	24
<i>miR-515-5p modula la carga de DNA de T. cruzi en HPE</i> .....	26
<b>Discusión</b> .....	28
<b>Conclusión</b> .....	31
<b>BIBLIOGRAFÍA</b> .....	32
<b>Anexos</b> .....	38

<i>Anexo 1</i> .....	38
<i>Anexo 2</i> .....	39

## RESUMEN

La enfermedad de Chagas es causada por el protozoo parásito zoonótico *Trypanosoma cruzi*. La transmisión congénita de *T. cruzi* es epidemiológicamente relevante, aunque se reportan bajas prevalencias. Previamente se ha demostrado que el recambio epitelial del trofoblasto es parte de la respuesta antiparasitaria local de la placenta. El recambio epitelial implica la regulación de procesos celulares que incluyen a la proliferación, diferenciación y apoptosis y que, además, son regulados por el parásito. Por otro lado, la infección *ex vivo* de explantes placentarios humanos (HPE) con *T. cruzi* induce un perfil de miRNAs específico que incluye miRNAs placenta-específicos del *cluster* C19MC como es el miR-515-5p. Interesantemente, este miRNA está relacionado con la regulación de la diferenciación del trofoblasto. MiR-515-5p regula la diferenciación del trofoblasto al inhibir al factor de transcripción hGCM1 (human glial cell missing-1 factor), que a su vez regula la expresión de otros genes fundamentales para la diferenciación. Así, durante la diferenciación del trofoblasto la expresión de miR-515-5p es inhibida. En la presente Memoria de Título se demostró que: i) *T. cruzi* disminuye la expresión de miR-515-5p durante la infección *ex vivo* de explantes de placenta humana (HPE); ii) los HPE pueden ser efectivamente transfectados con mimics y antagomirs de miR-515-5p; iii) la transfección no causa daño tisular en los HPE y iv) miR-515-5p modula la susceptibilidad a la infección con *T. cruzi*. Se concluye que la susceptibilidad a la infección en la placenta humana está mediada, al menos parcialmente, por miR-515-5p.

**Palabras Claves:** Zoonosis, *Trypanosoma cruzi*, placenta humana, miRNAs, miR-515-5p, susceptibilidad a la infección

## ABSTRACT

*Trypanosoma cruzi*, a zoonotic protozoan parasite, is the causative agent of Chagas disease. Congenital transmission is a significant Public Health problem despite its low transmission rates. Previously, it has been demonstrated that the epithelial turnover is part of local placental antiparasitic mechanisms. The epithelial turnover implies regulation of cellular processes that include proliferation, differentiation, and apoptosis. On the other hand, *ex vivo* infection of human placental explants with *T. cruzi* induces a specific miRNA profile that includes the placenta-specific miR-515-5p codified in the C19MC *cluster*. Interestingly, this miRNA is related to trophoblast differentiation through inhibition of the transcription factor hGCM1 (human glial cell missing-1 factor), which in turn induces the expression of other fundamental genes for trophoblast differentiation. Thus, during trophoblast differentiation, miR-515-5p expression is inhibited. This Undergraduate Thesis evaluated the possible role of miR-515-5p during *ex vivo* infection of human placental explants (HPE). Results indicated that: i) *T. cruzi* decrease miR-515-5p expression during *ex vivo* infection of HPE; ii) HPE can be effectively transfected with miR-515-5p mimics and antagomirs; iii) transfection does not cause tissue damage of HPE, and iv) miR-515-5p modulate susceptibility to *T. cruzi* infection.

It was concluded, that the susceptibility to *ex vivo* infection of human placental explants is at least partially mediated by the placenta-specific miR-515-5p.

**Key words:** Zoonosis, *Trypanosoma cruzi*, human placenta, miRNAs, miR-515-5p, susceptibility to infection

## INTRODUCCIÓN

La enfermedad de Chagas (CD por sus siglas en inglés) o Tripanosomiasis americana es una parasitosis zoonótica causada por el protozoo (orden *kinetoplastida*) *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*). Este parásito presenta un ciclo de vida complejo, donde *T. cruzi* requiere de un vector biológico y de un hospedero mamífero, incluido el ser humano. La CD es endémica de Latinoamérica; sin embargo, se han manifestado casos en América del Norte, Europa y Oceanía, en parte por la transmisión congénita. Así, la transmisión congénita, pese a su baja tasa de transmisión, representa la principal ruta de contagios en países no endémicos y es responsable del 22,5 % de los nuevos casos por año.

La transmisión congénita de *T. cruzi* depende de múltiples factores, como lo son la virulencia del parásito, el estado inmunológico en que se encuentra la madre y el feto, así como las respuestas locales de la placenta. La barrera placentaria es la principal barrera anatómica que dificulta la transmisión del parásito. El recambio epitelial del trofoblasto, primer tejido fetal en contacto con la sangre materna, es uno de los mecanismos locales que impiden la transmisión parasitaria. Este recambio epitelial implica que las células del estrato basal (citotrofoblasto) proliferen y luego se diferencien (fusionan) con el estrato superficial (sinciciotrofoblasto), para finalmente ser liberados hacia la sangre materna como nodos apoptóticos. Todos estos procesos celulares implican profundos cambios en la expresión génica, la que a su vez es regulada por diferentes factores que incluye a moléculas de RNA pequeños no codificantes como los microRNAs (miRNAs). Los miRNA regulan a la expresión génica a nivel postranscripcional mediante la degradación de los RNAs mensajeros (mRNAs) o la inhibición de su traducción. El miR-515-5p, pertenece a un “cluster” placenta-específico (C19MC), que se relaciona con la diferenciación celular del trofoblasto y además es modulado en presencia del parásito. Trabajos previos en el laboratorio han demostrado que *T. cruzi* disminuye la expresión de miR-515 en explantes de placenta humana (HPE) por lo que en esta Memoria de Título se estudió el rol de miR-515-5p en la susceptibilidad a la infección por *T. cruzi* en HPE. Conocer más sobre los mecanismos celulares y moleculares de la placenta en respuesta al parásito permitirá identificar nuevas herramientas diagnósticas y terapéuticas para tratar la CD.

## REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

### Generalidades

La CD es considerada por la Organización Mundial de la Salud como una enfermedad tropical desatendida (WHO, 2010; Rassi *et al.*, 2012). Además, la CD es una zoonosis potencialmente mortal, y aunque la mayoría de los pacientes infectados son asintomáticos, alrededor de un 30 a 40% de ellos desarrollan enfermedades cardíacas, desórdenes gastrointestinales, o ambos (Rassi *et al.*, 2010; Sales *et al.*, 2017). El parásito es transmitido principalmente por insectos vectores de la familia de los triatomíneos; sin embargo existen otros mecanismos de transmisión no vectoriales que incluyen a: transfusión sanguínea, trasplante de órganos, transmisión oral, y la transmisión congénita (Rassi *et al.*, 2012).

### *Trypanosoma cruzi*

*T. cruzi* es un protozoo hemoflagelado perteneciente al orden *Kinetoplastidae* y es el agente causal de la CD o Tripanosomiasis americana. El parásito presenta un ciclo de vida indirecto por transmisión vectorial donde participa un insecto hematófago como vector biológico y un mamífero como hospedador definitivo (WHO, 2010). Existen múltiples cepas y clones de *T. cruzi*, debido a sus diferencias genéticas, biológicas y bioquímicas, las cuales se clasifican en siete unidades de tipificación discretas (DTUs, por sus siglas en inglés) TcI-TcVI y Tc-bat, las que se asocian con la virulencia y tropismo tisular (Kemmerling *et al.*, 2019; Zingales, 2018).

### Ciclo biológico de *Trypanosoma cruzi*

El ciclo biológico de *T. cruzi* es complejo y comprende tres formas celulares (epimastigote, tripomastigote y amastigote) presentes en el insecto vector y el hospedero mamífero. Estas formas celulares se identifican por su morfología característica (posiciones relativas del flagelo, kinetoplasto y núcleo) y estado funcional (Prata, 2001; Yoshida, 2006). ***Tripomastigote:*** El tripomastigote representa el estado extracelular infectante no replicativo del parásito, se caracteriza por ser fusiforme, medir unos 20  $\mu\text{m}$  largo y 2  $\mu\text{m}$  de diámetro, presentar un kinetoplasto anterior al núcleo. Los tripomastigotes se encuentran en: (a) el

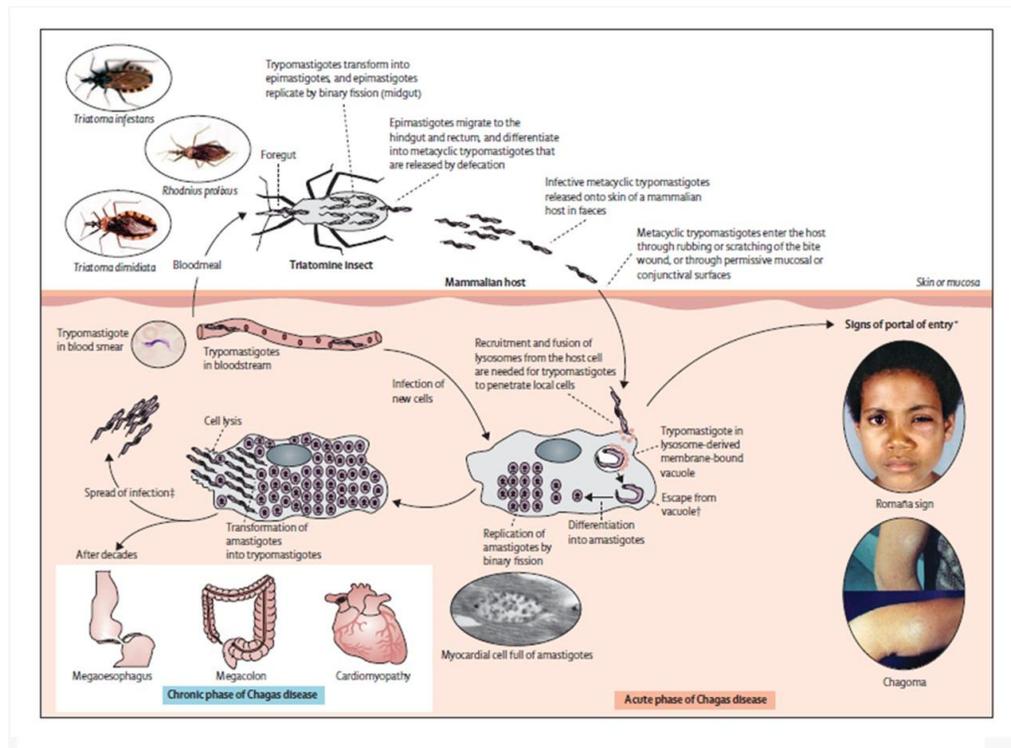
sistema circulatorio de los hospederos mamíferos, (b) en el intestino posterior y deyecciones de los triatominos (Prata, 2001; De Souza, 2002; Yoshida, 2006).

***Epimastigote:*** El epimastigote es también fusiforme, mide unos 20 – 40  $\mu\text{m}$  de largo y presenta un kinetoplasto anterior al núcleo. Corresponde al estadio extracelular replicativo y no es infectante. El epimastigote se encuentra en el intestino medio del triatomo donde se multiplica, para luego diferenciarse a tripomastigote metacíclico infectante en intestino posterior del mismo (Prata, 2001; De Souza, 2002; Yoshida, 2006).

***Amastigote:*** La forma amastigote corresponde a la forma intracelular replicativa en el hospedero mamífero, donde puede experimentar hasta 8-9 divisiones celulares. Es de forma redondeada, de unos 2 micrómetros de diámetro y sin flagelo emergente. El amastigote se diferencia intracelularmente a tripomastigote y como tal provoca la ruptura de la célula hospedera (lisis celular) y entra al torrente sanguíneo para infectar a las células de los órganos blancos o cualquier otra célula nucleada o ser ingerido por un triatomo (Prata, 2001; De Souza, 2002; Yoshida, 2006).

Cuando el insecto triatomo se alimenta de la sangre de un mamífero infectado con *T. cruzi*, los tripomastigotes sanguíneos ingresan al tracto digestivo del insecto, y en su intestino medio se diferencian a epimastigotes, éstos a medida que avanzan por el lumen intestinal, se replican y luego se diferencian a tripomastigotes metacíclicos que son altamente infectivos. El insecto vector, en el momento de alimentarse de la sangre, deposita sus deyecciones contaminadas con tripomastigotes metacíclicos (Tyler y Engman, 2001) sobre la piel o mucosas del mamífero. El ingreso al organismo estaría facilitado por las lesiones provocadas por rasguños en la zona de la picadura y por enzimas proteolíticas de la saliva del insecto. Una vez en el organismo del mamífero, los tripomastigotes son fagocitados por células presentadoras de antígenos (principalmente macrófagos) pero pueden infectar cualquier otra célula nucleada, diferenciándose intracelularmente a amastigotes. Tras cierto número de divisiones, los amastigotes se transforman a tripomastigotes, lisan las células infectadas, ingresan a la circulación e infectan a distintos tejidos blanco, como miocardio, músculo esquelético, músculo liso visceral y glía del sistema nervioso central (Prata, 2001; Kemmerling *et al.*, 2010; Zuma *et al.*, 2020) y en caso de preñez, la placenta (Kemmerling *et al.*, 2019). Si este mamífero infectado es utilizado como alimento por la misma u otra

vinchuca, los tripomastigotes circulantes ingresan al tracto digestivo del insecto vector, completando así el ciclo biológico de *T. cruzi* (**Figura 1**).



**Figura 1. Ciclo Biológico de *T. cruzi*.** El insecto vector (triatomino) ingiere tripomastigotes sanguíneos al alimentarse de la sangre de un mamífero infectado con el parásito. A medida que los parásitos avanzan por el tracto digestivo del insecto vector, estos se diferencian a epimastigotes, la forma replicativa extracelular del parásito. En el intestino posterior del insecto vector los epimastigotes se diferencian nuevamente a tripomastigotes metacíclicos. El insecto, al alimentarse nuevamente, deyección inmediatamente sus desechos contaminados con parásitos que ingresan al nuevo hospedero 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 células, alcanzan la circulación sanguínea y se diseminan por todo el organismo, quedando expuestos para que sean ingeridos por un insecto vector, cerrando así el ciclo biológico (Rassi y Marin-Neto, 2010).

Además de la transmisión vectorial, existen otras formas de transmisión que incluye la vía hematológica, a través de transfusiones sanguíneas o trasplante de órganos; la vía oral, por consumo de agua y alimentos contaminados, y la vía congénita de madre a hijo (Pérez-Molina and Molina 2018; Kemmerling *et al.*, 2019).

## Epidemiología de la enfermedad de Chagas

Se estima que globalmente, 7 millones de personas se encuentran infectados con *T. cruzi*, incluyendo a 1.125.000 mujeres en edad fértil. La CD es endémica en 21 países de América Latina donde causa más de 7000 muertes por año y donde más de 25 millones de personas corren el riesgo de contraer la infección (**Figura 2**). Importantly, la CD puede causar discapacidad de por vida. Adicionalmente no existen tratamientos eficientes y seguros, más aún el acceso a estos no es equitativo (Parker y Sethi, 2011). La presencia de la CD en países no endémicos se debe principalmente a la migración de personas desde América Latina y a la transmisión congénita. Así, la mayoría de los casos de CD congénita (CCD) derivan de madres infectadas por la vía vectorial en la niñez en áreas endémicas. La tasa media de transmisión materno-fetal en la fase crónica de la CD en América Latina se estima en 4,7% (Howard *et al.*, 2013; WHO, 2015).

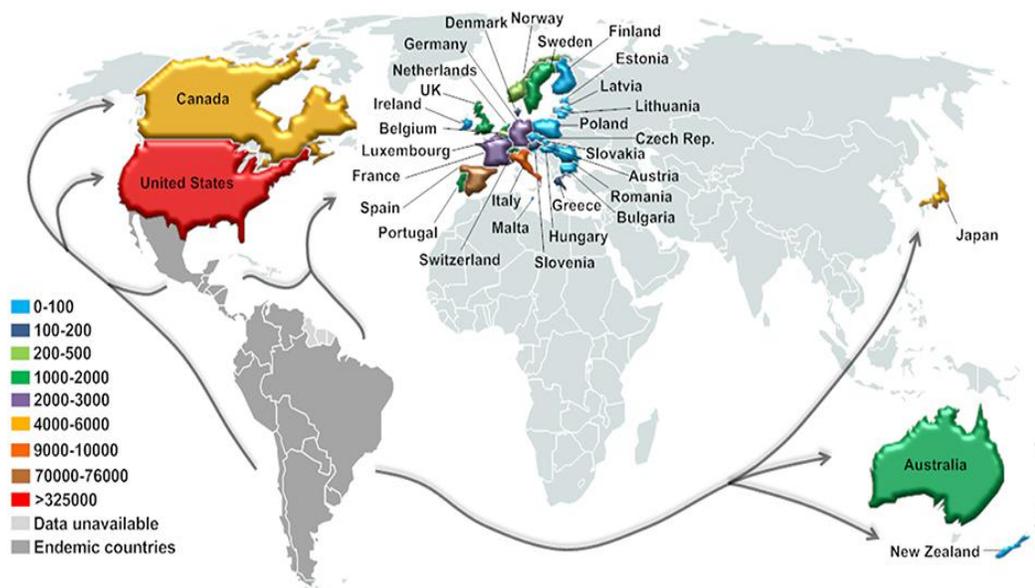


Figura 2. Estimación de la población mundial infectada con *Trypanosoma cruzi*. La enfermedad de Chagas es endémica en el continente americano, afectando a 21 países. Adicionalmente se está detectando esta patología en países no endémicos debido a formas de transmisión no vectorial (transfusiones, trasplantes y congénita) (Freitas *et al.*, 2019).

## Enfermedad de Chagas

La CD presenta dos fases clínicas, una aguda y otra crónica. La fase aguda comienza

inmediatamente después de la inoculación del parásito y es generalmente asintomática. Se caracteriza por una elevada parasitemia. Los casos sintomáticos presentan manifestaciones de infección generalizada, edema en la zona de la picadura, también llamado chagoma de inoculación (en seres humanos si es en la zona periocular, se conoce como signo de Romaña) y miocarditis. 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). La CD puede tener una presentación clínica más grave en niños menores de 5 años, ancianos, personas inmunodeprimidas o infectados con un alto número de parásitos (WHO, 2015). Posteriormente, se inicia la fase crónica de la enfermedad. El 60-70% de los pacientes no presentan síntomas clínicos evidentes y tampoco se detecta la presencia de parásitos circulantes. Se caracteriza por la ausencia de evidencia clínico-patológica y generalmente los pacientes presentan un electrocardiograma normal o pequeñas alteraciones en el ritmo cardíaco. Sin embargo, al usar técnicas más sensibles como Holter de ritmo cardíaco o ecocardiografía, se ha descrito que prácticamente la totalidad de los pacientes tienen algún grado de compromiso cardíaco (Punukollu *et al.*, 2007; Rassi y Marin-Neto, 2010; Muñoz-Saravia *et al.*, 2012). A esta etapa también se la denomina fase indeterminada.

El 30-40% de los pacientes crónicos, se vuelven sintomáticos y sufren de alteraciones cardíacas y/o digestivas. Esta sintomatología puede aparecer incluso 10 a 30 años post-infección. El 90% de los pacientes sintomáticos presentan compromiso cardíaco con síntomas y signos derivados de una falla cardíaca conocida como cardiomiopatía chagásica crónica. El 10% restante desarrolla enfermedad digestiva, principalmente megaesófago y megacolon, y alteraciones en el sistema nervioso periférico (Muñoz-Saravia *et al.*, 2012).

### **Enfermedad de Chagas congénita**

La transmisión congénita de *T. cruzi* ocurre en aproximadamente el 5% de las mujeres chagásicas embarazadas. La infección congénita implica una transmisión prenatal *in utero* o una transmisión perinatal (al momento del parto) de parásitos vivos que persisten después del nacimiento. Se excluye la transmisión post-natal de parásitos (principalmente a través de la leche materna), la transmisión de parásitos muertos, DNA parasitario, u otras moléculas liberadas de los parásitos a la madre que pueden ser encontradas en sangre fetal (Carlier *et al.*, 2020).

Las mujeres embarazadas infectadas pueden transmitir el parásito tanto en la fase aguda como crónica de la enfermedad pudiendo repetirse en cada embarazo y transmitirse de una generación a otra. En la mayoría de los casos la transmisión congénita se da en madres seropositivas que se encuentran en la fase crónica indeterminada o asintomática de la enfermedad (Cofre *et al.*, 2016).

La enfermedad de Chagas congénita (CCD) es una infección parasitaria aguda y alrededor del 60% de los fetos infectados son asintomáticos al momento de nacer. Importantemente, la CCD puede ser tratada eficientemente con terapia antiparasitaria durante el primer año de vida. Sin embargo, cuando no es diagnosticada a tiempo, la infección progresa a una infección crónica (Carlier *et al.*, 2020).

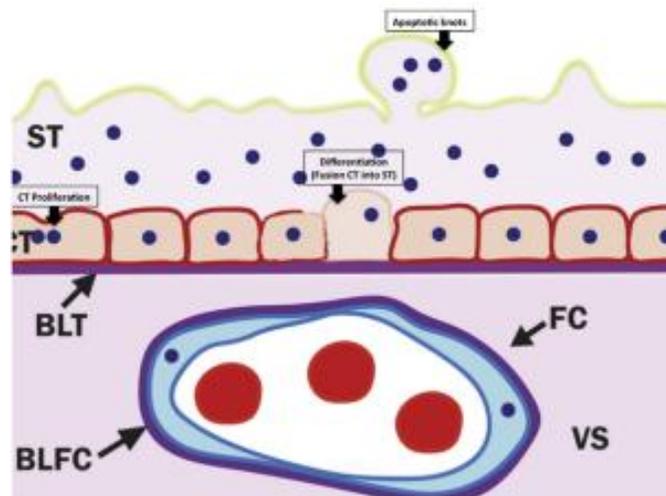
A pesar del alto porcentaje de caso asintomáticos, la infección con *T. cruzi* aumenta el riesgo de parto prematuro, bajo peso de nacimiento y rotura prematura de membranas producto de la inflamación placentaria. Las tasas de transmisión del parásito durante el embarazo varían dependiendo del trimestre en el cual se encuentre. En el primer trimestre la transmisión congénita es baja y se asocian a abortos; a medida que avanza el embarazo la probabilidad de transmisión aumenta debido a cambios funcionales de placenta que permiten un adecuado intercambio metabólico entre madre y feto. La mayoría de los recién nacidos con CCD son asintomáticos, sin embargo, estos pueden presentar complicaciones como convulsiones, hepato-esplenomegalia, cardiomegalia, *distress* respiratorio, entre otros. La mortalidad de la CCD es del 5% y está asociada altas parasitemias en el recién nacido con miocarditis y meningo - encefalitis como presentación clínica (Cofre *et al.*, 2016).

La probabilidad de infección congénita depende de factores parasitarios, del sistema inmune materno y fetal, así como de la placenta (Kemmerling *et al.*, 2019), siendo esta última, la menos estudiada.

### **La placenta humana**

La placenta es un anexo embrionario que tiene como función mantener el embarazo, a través del intercambio de gases y nutrientes, y producción hormonal, así como modular la respuesta inmune materna y fetal en desarrollo (Kemmerling *et al.*, 2019; Liempi, 2014). La placenta humana es de tipo hemocorial vellositaria, lo que implica que el tejido fetal está en contacto directo con la sangre materna. La unidad morfofuncional básica corresponde a la

vellosidad coriónica libre, en la cual se encuentra la barrera placentaria, formada por el trofoblasto y el estroma vellositario que es un tejido conectivo. El trofoblasto es un epitelio bi-estratificado que está separado por una lámina basal del estroma vellositario, que contiene los capilares fetales, fibroblastos y macrófagos (**Figura 3**). Esta barrera placentaria debe ser atravesada por los distintos patógenos, incluido *T. cruzi*, para infectar al feto durante la trasmisión congénita. El mantenimiento de la barrera placentaria está asegurado parcialmente por el recambio del trofoblasto (Liempi *et al*, 2016).



**Figura 3. Barrera placentaria y recambio del trofoblasto.** La barrera placentaria está ubicada en las vellosidades coriónicas libres conformada por el trofoblasto y el estroma veloso (VS). La sangre materna rodea y genera contacto con el trofoblasto en el espacio intervellosario placentario. El trofoblasto está conectado y separado del estroma veloso (VS), (tejido conectivo fetal) por una membrana basal (BLT); el VS contiene además a los capilares fetales (FC) rodeados a su vez por otra membrana basal (BLFC). El trofoblasto, un epitelio en continua renovación, está formado por dos capas celulares: el citotrofoblasto basal (CT) y el sincitiotrofoblasto superficial (ST). Las células del CT son las únicas con capacidad proliferativa; durante la diferenciación celular las células del CT se incorporan en forma continua al ST mediante fusión celular, la que es contrarrestada por la formación de nodos apoptóticos que son eliminados hacia la sangre materna presente en el espacio intervellosario (IVS) (Liempi *et al*, 2016).

### **Trofoblasto y recambio epitelial como mecanismo de defensa contra *T. cruzi***

El trofoblasto posee dos capas celulares epiteliales, el sincitiotrofoblasto (ST) y el citotrofoblasto (CT). El CT corresponde al estrato basal y presenta una alta proliferación celular (células germinativas); el ST constituye la capa superficial diferenciada que ha

perdido la capacidad de división (Kemmerling *et al.*, 2019). El ST es una capa multinucleada y continua que recubre a la superficie externa de las vellosidades coriónicas y se encuentra en contacto directo con la sangre materna. Así, el trofoblasto es el primer tejido de origen fetal contacto con agentes patógenos presentes en la sangre materna. El ST es generado y mantenido por medio de fusión sincicial por la incorporación de células del CT (Mayhew, 2014). Se ha postulado, que el trofoblasto, como epitelio de revestimiento y su mecanismo de recambio forman parte de la inmunidad innata ante patógenos (Liempi *et al.*, 2014, 2016). Así, la adhesión de los patógenos a la capa superficial del epitelio, previa infección de los tejidos adyacente (**Figura 4**) y el constante desprendimiento de la capa superficial de este impide la invasión de una proporción importante de ellos (Liempi *et al.*, 2014).

El recambio del trofoblasto implica una coordinación precisa de diferentes procesos celulares, entre los cuales se encuentra la **proliferación celular** del CT, la **diferenciación celular** y por último la **muerte celular tipo apoptosis** (Mayhew, 2014; Liempi *et al.*, 2016). Importantly, *T. cruzi* induce todos estos procesos celulares en el trofoblasto (Liempi *et al.*, 2014, 2016; Kemmerling *et al.*, 2019). Todos estos procesos mencionados anteriormente, que presenta el trofoblasto, implican profundos cambios en la expresión génica. La expresión génica es regulada por diferentes mecanismos, tanto a nivel transcripcional como postranscripcional (Ghedira, 2018). A nivel postranscripcional, los RNAs pequeños no codificantes, como los miRNAs, son parte del mecanismo regulador (Hayder *et al.*, 2018; Sadovsky *et al.*, 2015). Por otra parte, se ha descrito que la infección por *T. cruzi* no sólo altera la expresión de miRNAs en el hospedero, sino que induce en explantes de placenta humana (HPE) un perfil parásito-específico (Medina *et al.*, 2020).

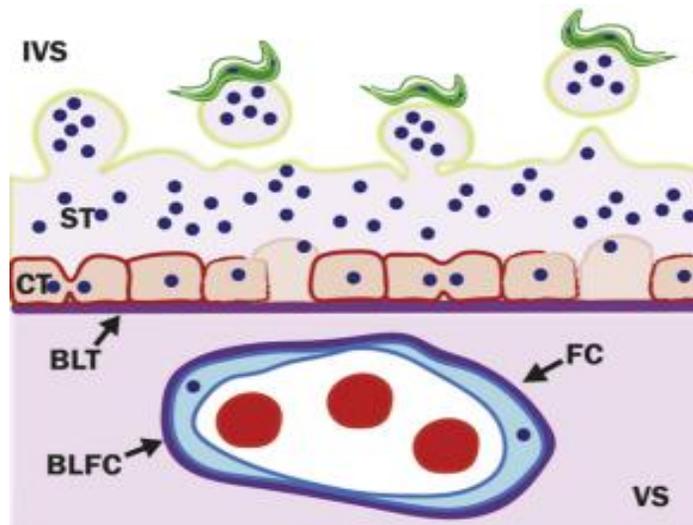


Figura 4. **El recambio epitelial del trofoblasto como mecanismo de defensa placentaria contra *T. cruzi*.** El parásito se adhiere a la superficie celular para invadir tejidos adyacentes. Debido al constante recambio epitelial en el trofoblasto, las células del estrato más superficial son removidas junto con los parásitos que se habían adherido a ellas (sinciciotrofoblasto) (Liempi *et al.*, 2016).

### Regulación de la expresión de genes por miRNAs

Los miRNAs son moléculas de RNA de una sola hebra de una longitud entre 18 y 22 nucleótidos. En humanos se han descrito más de 2.500 miRNAs, que regulan la expresión de cerca de un 30% de genes involucrados en procesos biológicos fundamentales. Los miRNAs reprimen a los RNAs mensajeros (mRNA) de manera secuencia-específica mediante dos mecanismos: a) degradación del mRNA y b) inhibición de la traducción del mRNA (Hayder *et al.*, 2018).

Más del 70% de los precursores de los miRNAs están localizados en intrones o exones de genes codificantes de proteínas; el resto está codificado en regiones intergénicas. Algunos miRNAs son transcritos como un único transcrito largo llamado *cluster*, que puede tener regiones similares y en cuyo caso se consideran una familia (O'Brien *et al.*, 2018). Los miRNAs prometen ser herramientas diagnósticas, pronósticas y terapéuticas para diferentes patologías, incluyendo neoplasias malignas (Zhang *et al.*, 2015) e infecciones (Daly y Driscoll, 2017) ya que, entre otras características: i) los cambios en la expresión de miRNAs puede ser detectados en fluidos biológicos (Zhang *et al.*, 2015); ii) la expresión de los miRNAs es tejido-específica, expresándose solo en un tipo de tejido, como el caso del *cluster*

C19MC en placenta y iii) la expresión de los miRNAs puede ser modulada tanto en su biogénesis como en su mecanismo de acción (Sadovsky *et al.*, 2015).

Cabe destacar que en *T. cruzi* no existen RNAs pequeños no codificantes canónicos tales como miRNAs y siRNAs (Franzén *et al.*, 2011), por lo que es posible el estudio específico de miRNAs de placenta humana inducidos por la infección con *T. cruzi*, sin tener interferencias de miRNAs propios del parásito.

### **miRNAs en placenta**

Los miRNAs en placenta regulan tanto el desarrollo de esta como sus procesos fisiológicos. Existen miRNAs placenta-específicos, algunos de ellos se expresan diferencialmente en las distintas etapas de desarrollo. En humanos, la mayoría de los miRNAs asociados al embarazo se encuentran agrupados en tres “*clusters*” entre el que destaca el C19MC en el cromosoma 19 (Morales-Prieto *et al.*, 2013). El *cluster* C19MC es uno de los más grandes del genoma humano y es expresado exclusivamente en la placenta. Este *cluster* tiene un tamaño aproximado de 100 kb y abarca 46 genes de miRNAs que producen 58 miRNAs maduros. Se localiza en 19q13.41 y se expresa únicamente en el alelo paterno, mientras que el alelo materno está silenciado epigenéticamente. El trofoblasto es considerado como la fuente principal de miRNA pertenecientes al C19MC (Donker *et al.*, 2012).

La expresión alterada de miRNAs de C19MC se ha asociado a patologías del embarazo como la preeclampsia, neoplasias malignas e infecciones (Sadovsky *et al.*, 2015; Hayder *et al.*, 2018). Algunos de estos miRNAs, tales como el **miRNA-515-5p**, están asociados a la diferenciación celular del trofoblasto.

En esta Memoria de Título se estudió el posible rol de miR-515-5p durante la interacción placenta - *T. cruzi*, determinado sus niveles de expresión y su rol en la diferenciación celular del trofoblasto inducida por el parásito.

### miRNA 515-5p

miRNA-515-5p reprime a los mRNAs de los genes codificantes para la aromatasas P450 (hCYP19A1) y hGCM1 (human glial cells missing 1 transcription factor). El factor de transcripción hGCM1 media, a su vez, la expresión de syncytina y hCG (gonadotropina coriónica humana), ambos inducidos por *T. cruzi* en explantes de placenta humana (HPE) y células BeWo (línea celular de trofoblasto) (Liempi *et al.*, 2014). Resultados previos del laboratorio (Medina *et al.*, 2021) muestran que *T. cruzi* disminuye la expresión de miRNA-515-5p en HPE (**Figura 5**) e induce la expresión de hGCM1.

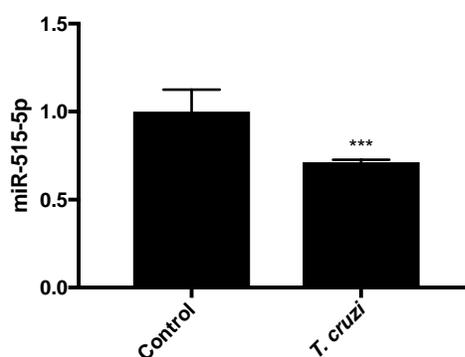


Figura 5. ***T. cruzi* inhibe la expresión de miR-515-5p en HPE.** HPE fueron incubados en presencia y ausencia de  $10^5$  tripomastigotes/mL de *T. cruzi* durante 2 horas. La expresión de miR-515-5p fue determinada por Real-Time PCR. Los datos obtenidos corresponden al menos a 3 experimentos independientes que se realizaron por triplicado y representan a la media  $\pm$  SD analizada por medio de test t de Student, \*\*\*  $p \leq 0.001$ .

En esta Memoria de Título se estudió el posible rol de miR-515-5p en la susceptibilidad a la infección con *T. cruzi* en tejido placentario.

## **HIPÓTESIS**

Los niveles de miR-515-5p en HPE modulan la infección con *T. cruzi*.

## **OBJETIVO GENERAL**

Estudiar en HPE el rol de miR-515-5p en la susceptibilidad a la infección con *T. cruzi*.

## **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

1. Determinar los niveles de expresión de miR-515-5p en HPE en respuesta a la infección con *T. cruzi*.
2. Determinar el posible rol de miR-515-5p en la probabilidad de infección de *T. cruzi* en HPE.

## MATERIALES Y MÉTODOS

- 1) **Obtención de tripomastigotes de *T. cruzi*:** Tripomastigotes cepa Ypsilon (Y) de *T. cruzi* se obtuvieron desde cultivos de células VERO® previamente infectadas con el parásito. Las células VERO® fueron cultivadas en medio RPMI (RPMI 1640, Biological Industries Ltd.) suplementado con 5% de suero fetal bovino (FBS) y antibióticos (penicilina- estreptomina) a 37°C en atmosfera húmeda de CO<sub>2</sub> al 5%. Posteriormente fueron infectadas con 1 a 2 mL de medio con tripomastigotes provenientes de un cultivo anterior; así los parásitos invaden la célula y se replican intracelularmente como amastigotes. Luego de 48-72 horas, los amastigotes se diferencian a tripomastigotes, lisan las células y son liberados al sobrenadante. El sobrenadante fue recolectado y centrifugado a 3.000 x g durante 10 minutos a fin de obtener en el sedimento las formas infectivas de *T. cruzi*. Los tripomastigotes se re-suspendieron en medio RPMI y el número de parásitos fue cuantificado mediante el uso de una cámara de Neubauer (Castillo *et al.*, 2017).
- 2) **Obtención de placenta y cultivo de HPE:** Los HPE fueron obtenidos durante el alumbramiento de partos a término (mayor a 37 semanas de gestación) por cesárea electiva, de madres sanas con embarazos monogestacionales y fetos con desarrollo normal. Los criterios de exclusión fueron cualquier patología materna, fetal o placentaria. Los órganos fueron obtenidos en el Servicio de Obstetricia y Ginecología del Hospital San José, Servicio de Salud Metropolitana Norte, Santiago, previo consentimiento informado para el uso experimental de la placenta (Anexo 1). La placenta fue recolectada y procesada no más de 30-60 minutos después del parto. El tejido placentario fue obtenido desde la parte central de los cotiledones, y las superficies materna y fetal fueron descartadas para obtener por medio de disección los HPE de un tamaño aproximado de 0,5 cm<sup>3</sup>. Los HPE fueron lavados con PBS para remover la sangre y luego incubados en medio RPMI suplementado con antibióticos y SFB al 10% (Liempi *et al.*, 2014).
- 3) **Inhibición y sobreexpresión de miR-515-5p:** Se obtuvieron los HPE como se describió más arriba y posteriormente fueron transfectados con 100 nM de un control negativo de Antagomir marcado en el extremo 5' con Cy3 (abm®) e incubados

durante 24 o 48 horas a 37°C, para evaluar la capacidad del antagomir en penetrar el HPE (Kredo-Russo y Hornstein, 2011; Rebutini, 2017). La localización fue analizada mediante microscopía de fluorescencia en un microscopio de epifluorescencia (Motic BA310; Hong Kong, China). Además, los HPE fueron transfectados con 100 nM de antagomirs o mimic de miR-515-5p o sus respectivos controles (“*scrambles*”) durante 24 horas a 37°C (Rebutini, 2017). Se utilizó el antagomiR: hsa-miR-515-5p (Cat. No. MNH02866 abm®) y el mimic de hsa-miR-515-5p (Cat. No. MCH02866 abm®). Adicionalmente se utilizaron los controles negativos para “*mimics*” (Cat. No. MCH00000 abm®) y para antagomiR (Cat. No. MNH00000 abm®). Finalmente, para la extracción de miRNAs y mRNAs, las muestras fueron mantenidas en solución RNALater® (ThermoFisher Scientific) a 4°C durante toda la noche y luego congelados a -80°C hasta su procesamiento.

- 4) **Infección *ex vivo* de HPE:** Posteriormente a la transfección, los HPE fueron incubados en ausencia y presencia de tripomastigotes de *T. cruzi* en una concentración de 10<sup>5</sup> parásitos/mL durante 24 horas en medio RPMI suplementado con SFB (Liempi *et al.*, 2015).
- 5) **Extracción de miRNAs:** Los HPE fueron homogeneizados en 1mL de RNazol® RT (Sigma-Aldrich) y procesados siguiendo el protocolo para aislamiento de miRNAs. El producto aislado de miRNAs fue conservado a -80°C hasta su posterior análisis. La concentración de miRNAs fue medida por Fluorometría con el Qubit™ RNA HS Assay Kit (Invitrogen™) y con Quant-iT™ microRNA Assay Kit (Molecular probes), respectivamente. Para la síntesis de cDNA a partir de miRNAs se usó el sistema MystiCq™ microRNA cDNA Synthesis Mix (Sigma-Aldrich) siguiendo las instrucciones del fabricante (Androvic *et al.*, 2017).
- 6) **Determinación de la expresión de miRNA por RT-qPCR:** La expresión de miR-515-5p fue determinada por RT-qPCR de dos colas. La amplificación de cDNA de miR-515-5p se realizó con 12,5 µL 2X MystiCq microRNA SYBR Green qPCR, 0,5 µL de 10µM MystiCq Universal PCR Primer, 0,5µL del Primer MystiCq microRNA qPCR Assay 10 µM (Tabla 1), 10,5µL agua libre de nucleasas, y 1 ng/µL cDNA (producto de la transcripción inversa), en 25µL de reacción para qRT-PCR. Todas las reacciones qRT-PCR se realizaron en triplicado en al menos tres oportunidades

distintas. El programa térmico para la reacción de qRT-PCR consistió en una pre-incubación/activación a 95°C por 2 minutos, seguido de 40 ciclos de PCR, desnaturalización a 95°C por 5 segundos y alineamiento a 60°C por 30 segundos, seguidos de una fase de disociación, que oscila entre los 60 a 95°C. La expresión relativa de genes fue calculada por el método de doble control comparativo  $\Delta\Delta Ct$  usando como housekeeping la expresión del snRNA U6 (RNU6-1) para miRNAs (Androvic *et al.*, 2017; Pfaffl, 2001).

- 7) **Determinación de la infección parasitaria:** Se realizó el aislamiento del DNA mediante técnicas estándar de laboratorio. La carga de DNA del parásito en los HPE se determinó mediante amplificación por PCR en tiempo real del DNA satélite de *T. cruzi* (182 pb) (TCZ-F (5'-GCTCTTGCCCACAMGGGTGC-3 ') y TCZ-R (5'-CAAGCAGCGGATAGTTCAGG- 3 ') al utilizar GAPDH humano como gen de mantenimiento (100 pb) (hGDH-F (5'-TGATGCGTGTACAAGCGTTTT-3') y hGDH-R (5'-ACATGGTATTACACCCCACTAT-3 '). Los datos se analizaron al utilizar el método de control comparativo ( $\Delta\Delta Ct$ ) (Liempi *et al.*, 2015).
- 8) **Métodos Histológicos:** Los HPE se fijaron durante 24 horas en formaldehído 4% preparado en un tampón de fosfato pH 7,4. Finalmente, fueron lavados y deshidratados en concentraciones crecientes de etanol, aclaradas en xilol e incluidas en parafina fundida a 60°C (Bancroft y Gamble, 2008). Los cortes de las muestras obtenidas fueron hechos a 5  $\mu m$  de espesor, los cuales posteriormente fueron sometidos a la tinción de Hematoxilina-eosina para análisis histológico de rutina (Bancroft y Gamble, 2008; Duaso *et al.*, 2010).
- 9) **Cuantificación de la enzima Lactato Deshidrogenasa (LDH):** Se recolectó el sobrenadante de los HPE controles y transfectados y las muestras fueron conservadas a -20°C hasta su procesamiento para la evaluación de la actividad de la LDH, la cual fue determinada con el LDH Cytotoxicity Detection Kit (Cat# MK401, Takara Bio Inc) siguiendo las instrucciones del fabricante. Las placas fueron incubadas a temperatura ambiente durante 30 minutos en oscuridad y luego se determinó la absorbancia con el lector de microplacas Varioskan Flash Multimode (Thermo Scientific®) a una longitud de onda de referencia de 490 nm. Los resultados fueron normalizados con respecto a los valores obtenidos en la condición control.

- 10) **Análisis Estadístico:** Cada experimento se realizó en triplicado y al menos en tres oportunidades distintas. Los resultados se expresaron como promedio más desviación o error estándar según corresponde. La significancia de las variables cuantitativas se evaluó mediante el test t de Student. Las variables múltiples se analizaron mediante ANDEVA seguido por Dunnett's post test (se compararon todas las columnas respecto al control). Se utilizó el programa computacional GraphPad Software PRISM 8.0 (GraphPad Software, San Diego, EE. UU.). Se consideró un  $p < 0,05$  como estadísticamente significativo.
- 11) **Ética:** Este estudio cuenta con la aprobación de los respectivos Comités de Ética del Servicio de Salud Metropolitano Norte (2019-0010) (**Anexo 1**).
- 12) **Bioseguridad:** El laboratorio se encuentra ubicado en el Instituto de Ciencias Biomédicas en la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile y 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**).

## Resultados

### HPEs pueden ser transfectados efectivamente con mimics y antagomirs miR-515-5p sin causar daño al tejido.

HPEs fueron transfectados con 100 nM de antagomirs miR-515-5p (A-515), mimics (M-515), y sus respectivos *scrambles* (AS o MS) (**Figura 6**) según lo descrito en la metodología. La transfección con A-515 y M-515, respectivamente, aumentan y disminuyen en un  $92,59 \pm 1,09\%$  ( $p \leq 0,01$ ) y  $76,96 \pm 20,23\%$  ( $p \leq 0,001$ ) los niveles de miR-515-5p en HPE. Como se esperaba, la transfección con los respectivos *scrambles* no afectó significativamente los niveles de miR-515-5p. Adicionalmente, los HPEs fueron transfectados con AntagomiR-Cy3 conjugado para detectar su localización en el tejido. Así, los AntagomiR-Cy3 pueden ser observados en toda la vellosidad coriónica, pero se localizan principalmente en el trofoblasto (**Figura 7**) (flechas blancas).

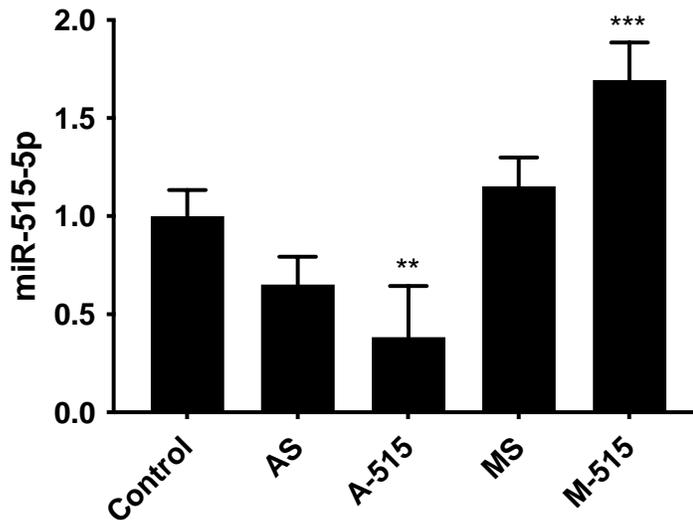


Figura 6. **HPEs se transfectan efectivamente con antagomirs y mimics de miR-515-5p.** HPE fueron incubados con 100 nM de antagomiR o Mimic durante 24 horas. La expresión de miR-515-5p fue determinada mediante Real-Time PCR. Los datos obtenidos corresponden al menos a 3 experimentos independientes que se realizaron por triplicado y representan a la media  $\pm$  SD analizada por medio de ANOVA seguido del post-test de Dunnett. \*\*  $p \leq 0,01$ , \*\*\*  $p \leq 0,001$ . AntagomiR Scrambled (AS), AntagomiR-515-5p, Mimic Scrambled (MS), Mimic-515-5p (M-515).

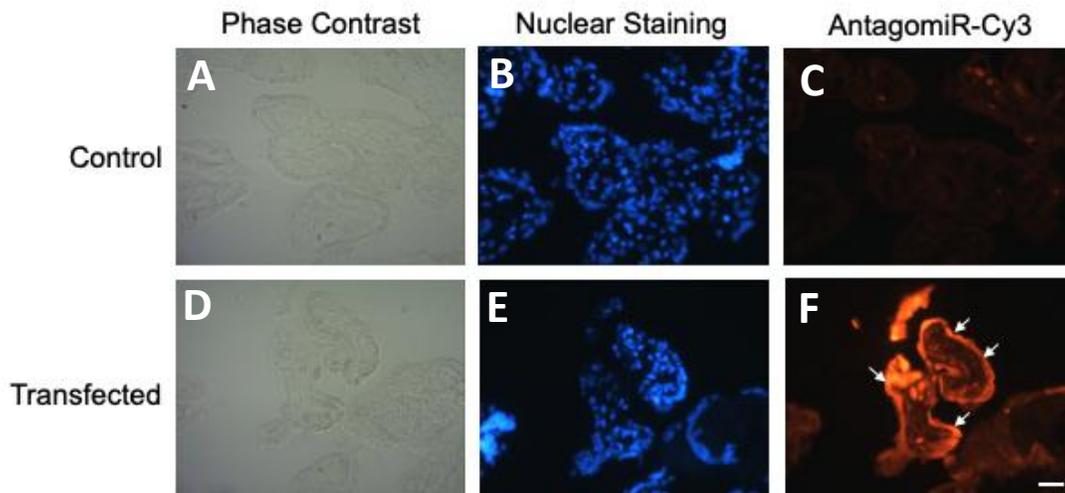


Figura 7. **HPEs se transfectan efectivamente con antagomirs y mimics de miR-515-5p.** HPE fueron transfectados con el control negativo del AntagomiR-Cy3 (100 nM) durante 24 horas (A, B y C), así como con el AntagomiR-Cy3 durante 24 horas (D, E y F). Las muestras se procesaron con técnicas histológicas de rutina y los núcleos se tiñeron con DAPI. Barra de aumento 20  $\mu$ m.

Adicionalmente, se evidenció la ausencia de daño tisular mediante la medición enzimática de LDH en el sobrenadante (**Figura 8A**). Así, la transfección con 50 nM o 100 nM con AntagomiR-Cy3 no causa incremento de la actividad enzimática de la enzima respecto al control sin transfectar. Este análisis bioquímico fue complementado mediante análisis histopatológico de los HPEs transfectados (**Figura 8B – 8C**), en el cual se evidencia que la transfección no altera la arquitectura tisular normal (**Figura 8C**), si se compara a las muestras controles sin transfectar (**Figura 8B**).

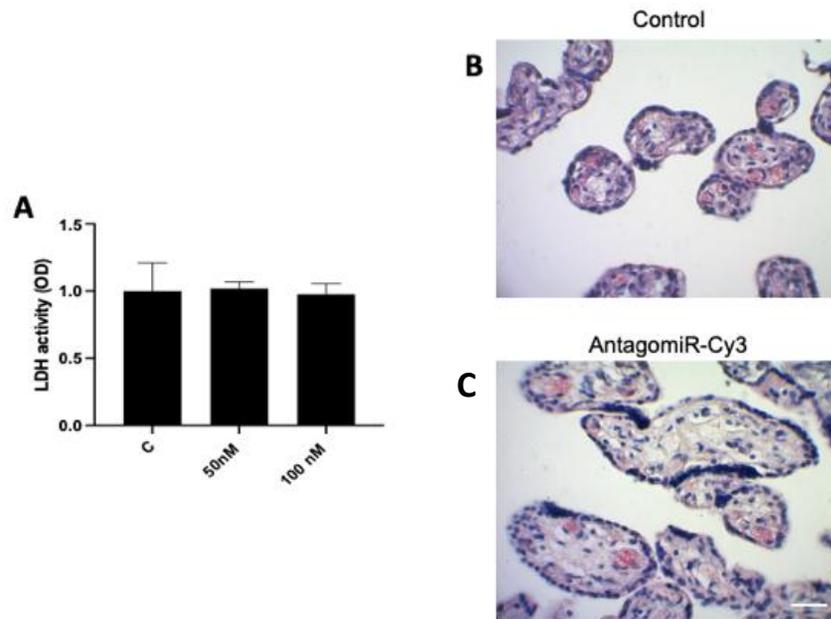


Figura 8. **La transfección con AntagomiR-Cy3 no induce daño tisular en los HPE.** HPE fueron transfectados con AntagomiR-Cy3 (100 nM) durante 24 horas.

El panel A muestra la cuantificación de la actividad enzimática de LDH en el sobrenadante de los cultivos de HPE no transfectados (control) o que fueron transfectados con 50 o 100 nM de AntagomiR-Cy3. Los datos obtenidos corresponden al menos a 3 experimentos independientes que se realizaron por triplicado y representan a la media  $\pm$  SD analizada por medio de ANOVA seguido del post-test de Dunnett.

En el panel B se observan imágenes representativas del análisis histológico en las cuales se evidencia que la transfección no causa daño tisular. Las muestras se procesaron para análisis histopatológico convencional Barra de aumento = 20  $\mu$ m.

### **miR-515-5p modula la carga de DNA de *T. cruzi* en HPE**

Los HPE fueron transfectados con M-515, MS, A-515 y AS y luego fueron infectados con  $10^5$  parásitos/mL por 2 horas. Tanto la inhibición de miR-515-5p mediante antagomirs ( $73,1 \pm 19,97\%$  ( $p \leq 0,01$ )) como el aumento de la expresión de este y mimics ( $80,8 \pm 19,96\%$  ( $p \leq 0,01$ )) aumenta significativamente en la cantidad de DNA parasitario respecto a las muestras controles sin transfectar. No se observa una diferencia significativa en la cantidad de DNA de *T. cruzi* entre la condición experimenta sin transfectar y las transfectadas con MS/AS como control de técnica (**Figura 9**).

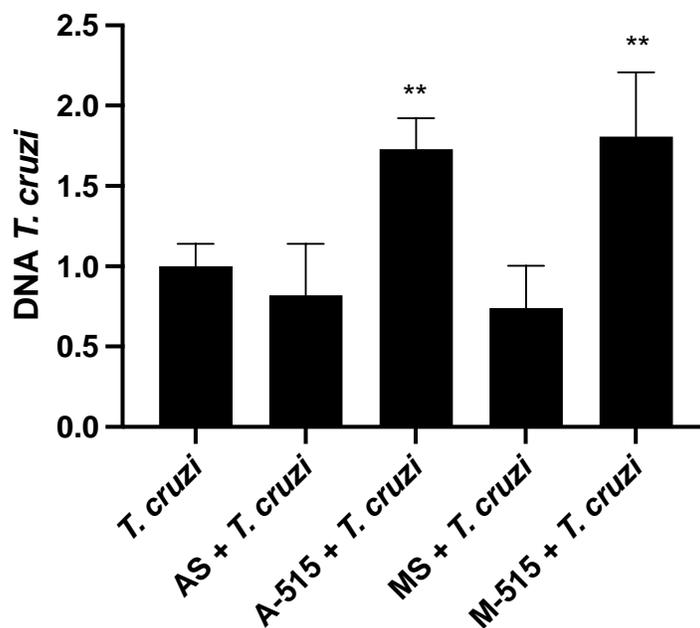


Figura 9. **La alteración de niveles de miRNA 515-5p aumenta la carga de DNA de *T. cruzi* en HPE.** Los HPE fueron transfectados con 200nM de antagomiR o mimic específico por 24 horas. Posteriormente, fueron infectados con tripomastigotes de *T. cruzi* ( $10^5$  parasites/mL) durante 2 horas. La presencia del DNA parasitario fue determinada mediante qPCR. Los datos obtenidos corresponden al menos a 3 experimentos independientes que se realizaron por triplicado y representan a la media  $\pm$  SD analizada por medio de ANOVA seguido del post-test de Dunnett. \*  $p \leq 0,05$ , \*\*  $p \leq 0,01$ , \*\*\*  $p \leq 0,001$

## Discusión

La interacción hospedero patógeno es una situación dinámica, donde el agente patógeno, mediante sus factores de virulencia, es capaz de sobrepasar las barreras anatómicas y evitar el sistema inmune del hospedero, para así invadir a los tejidos diana. Dentro de los agentes patógenos, los parásitos se caracterizan por presentar una gran variedad de factores de virulencia, que permiten llevar a cabo su infección y ciclo de vida dentro de sus hospederos. Por otra parte, los hospederos generan respuestas ante la presencia del agente patógeno o de una injuria provocada por estos, para combatir la infección y repelerlos del organismo. Por ende, esta interacción compleja, junto a todos los procesos biológicos involucrados, determinan el fracaso o el éxito en la infección de los tejidos (Kemmerling *et al.*, 2019). En el caso de *T. cruzi*, durante la transmisión congénita, este debe atravesar la barrera placentaria para infectar al feto. El trofoblasto es el primer tejido placentario que interactúa con el parásito, localizándose aquí una gran cantidad de procesos celulares que determinarán si la infección logra ser exitosa.

El recambio del trofoblasto involucra una coordinación precisa de diferentes procesos celulares que incluyen la proliferación del CT, diferenciación (lo que significa fusión sincicial por incorporación de células del CT a un ST no replicativo y diferenciación de células del CT previo a la fusión con el ST) y muerte celular. La muerte celular en el trofoblasto se evidencia por la formación de nódulos apoptóticos en el ST que son liberados a la sangre materna (Huppertz y Gauster, 2011, Liempi *et al.*, 2016). (**Figuras 3 y 10**).

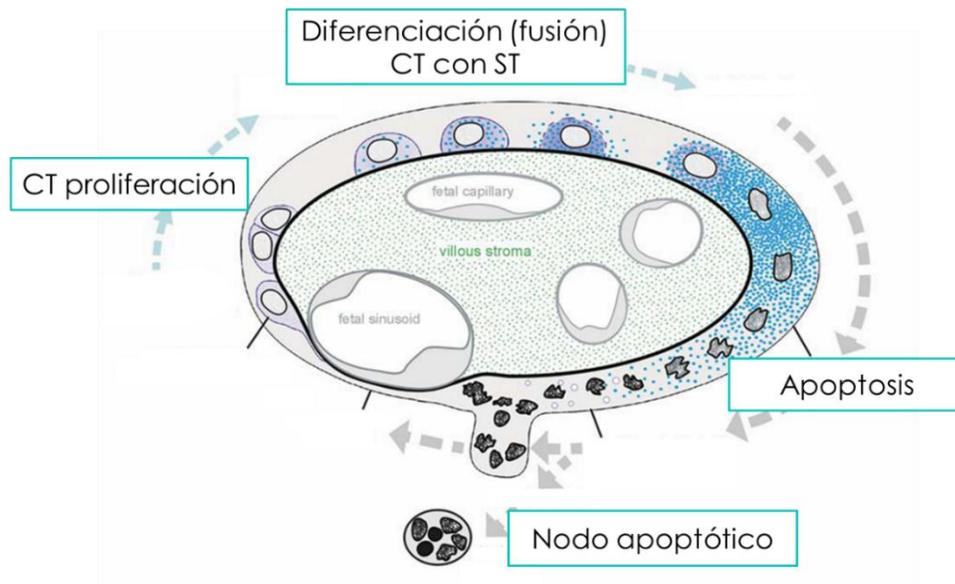


Figura 10. **Recambio epitelial del trofoblasto.** El trofoblasto es un epitelio bi-estratificado formado por una capa basal, el citotrofoblasto (CT) y una capa superficial, el sinciotrofoblasto (ST). Las células del CT son las únicas con capacidad proliferativa; durante la diferenciación celular, las células del CT se incorporan en forma continua al ST mediante fusión celular, la que es contrarrestada por la formación de nodos apoptóticos que son eliminados hacia la sangre materna (Pathology of the Human Placenta, 5ta Ed; Benirschke *et al.*, 2006).

Se ha propuesto que el constante recambio epitelial del trofoblasto es un mecanismo antiparasitario local, que adicionalmente es inducido por la presencia de *T. cruzi*. (Liempi, *et al.*, 2016; Kemmerling *et al.*, 2019). El parásito debe adherirse a la superficie del epitelio de revestimiento para invadir tejidos adyacentes, pero el constante recambio y eliminación de células mediante nodos apoptóticos termina removiendo a los patógenos adheridos al tejido (Chang *et al.*, 2013; Liempi *et al.*, 2016). Estos procesos celulares involucrados en la alteración tisular y el recambio epitelial son regulados, entre otros, por RNAs no codificantes, entre ellos los miRNA (Hayder *et al.*, 2018; Medina *et al.*, 2020). Es importante destacar que *T. cruzi* induce un perfil específico de miRNA en explantes, muy diferente de otros parásitos protozoarios como *Toxoplasma gondii* (*T. gondii*) lo cual podría explicar la baja incidencia en transmisión congénita para *T. cruzi* y la alta tasa de transmisión para *T. gondii* (Medina *et al.*, 2020).

Entre los miRNAs modulados por *T. cruzi* se encuentra miR-515-5p (Medina *et al.*, 2020), el cual se relaciona con la regulación de la diferenciación del trofoblasto (Chen *et al.*, 2010;

Zhang *et al.*, 2016). Por ello, se propuso que la alteración de los niveles de miR-515-5p en HPE estaría relacionado con la susceptibilidad a la infección con *T. cruzi* al verse afectada la barrera placentaria. Para ello se evaluó la capacidad del antagomir y mimics del miR-515-5p de penetrar y transfectar efectivamente el trofoblasto. Se diseñó un antagomiR control negativo acoplado con una molécula fluorescente (Cy3) y luego transfectamos los HPE. Al examen microscópico de los HPE transfectados, se demostró la presencia del antagomiR-Cy3 en el tejido placentario, principalmente en el trofoblasto, y en menor grado en el estroma vellositario (**Figura 7**). Adicionalmente, evaluamos los niveles de miR-515-5p y tanto el antagomir como el correspondiente mimic disminuyen y aumentan, respectivamente, su expresión (**Figura 6**). Además, nos aseguramos de que la transfección no daña al tejido placentario, esto mediante análisis histopatológico y midiendo los niveles de LDH presente en el medio (**Figura 8A**). Avalando que la técnica utilizada para transfectar no interviene en la susceptibilidad a la infección de los HPE con el parásito. La concentración de antagomir y mimic están dentro de los rangos utilizados en otros estudios. Así, en cultivos de órganos de embriones se recomienda usar concentraciones de antagomirs y mimics desde 50 nM hasta 2  $\mu$ M (Kredo-Russo y Hornstein, 2011).

La alteración de niveles de miRNA 515-5p; aumenta la carga de DNA de *T. cruzi* en HPE apreciándose en la Figura 9, donde se comparan las condiciones transfectadas con Antagomir / Mimic a la condición control sin transfectar, cumpliéndose así el postulado sobre este miRNA relacionado con la susceptibilidad a la infección en HPE, lo que concuerda con lo mencionado anteriormente, respecto al mecanismo antiparasitario local de la placenta por el recambio epitelial del trofoblasto (Liempi *et al.*, 2014, 2016). De esta forma, la regulación del factor de transcripción hGCM-1 mediante este miRNA afectaría la barrera placentaria (Zhang *et al.*, 2016). Lo anterior se justifica con el efecto del mimic, debido a que una sobreexpresión de miRNA-515-5p produce una inhibición de la hGCM-1 (Medina *et al.*, 2021), generando una disminución en la diferenciación celular del trofoblasto, lo que concuerda con un aumento en la carga de DNA de *T. cruzi*.

Interesantemente, al evaluar el efecto del antagomir en la carga de DNA parasitario, se observó un efecto diferente a lo esperado. Así, se postulaba que al disminuir aún más los niveles de miR-515-5p, se podría disminuir la infección en los HPE. Sin embargo, y tal como se observa en la Figura 9; este generó un aumento en la cantidad de DNA de *T. cruzi*,

al igual que la condición experimental con el mimic. Lo anterior se podría explicar mediante el hecho de que un miRNA puede regular la expresión de múltiples mRNAs, y un mRNA puede a su vez ser regulado por múltiples miRNA (Velu and Grimes, 2012). Por ejemplo, están los miRNAs 512-3p y 19b-3p (Medina *et al.*, 2020), que están involucrados en la diferenciación celular del trofoblasto al igual que el miRNA 515-5p. Finalmente, esto concuerda con la naturaleza compleja de la regulación de la expresión génica.

### **Conclusión**

La susceptibilidad a la infección en la placenta humana está mediada, al menos parcialmente, por miR-515-5p.

## BIBLIOGRAFÍA

- ANDROVIC, P.; VALIHRACH, L.; ELLING, J.; SJOBACK, R.; KUBISTA, M.** 2017. “Two-tailed RT-qPCR: a novel method for highly accurate miRNA quantification.” *Nucleic acids research* 45, e144. <https://doi.org/10.1093/nar/gkx588>.
- APT, W.; ZULANTAY, I.; ARNELLO, M.; ODDÓ, D.; GONZÁLEZ, S.; RODRIGUEZ, J.; KEMMERLING, U.; TRUYENS, C.; CARLIER, J.** 2013. Congenital infection by *Trypanosoma cruzi* in an endemic area of Chile: A multidisciplinary study. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 107(2):98 – 104. <https://doi.org/10.1093/trstmh/trs013>.
- BANCROFT, J.; GAMBLE, M.** 2008. “Theory and Practice of Histological Techniques” (Elsevier Health Sciences).
- BENIRSCHKE, K.; BURTON, G.; BAERGEN, R.** 2006. “Pathology of the Human Placenta, 5ta Ed. <http://dx.doi.org/10.1007/978-3-642-23941-0>
- CARLIER, Y.; SCHIJMAN, A.; KEMMERLING, U.** 2020. “Placenta, *Trypanosoma cruzi*, and Congenital Chagas Disease.” *Curr Trop Med Rep* 7, 172–182 (2020). <https://doi.org/10.1007/s40475-020-00210-5>
- CASTILLO, C.; MUÑOZ, L.; CARRILLO, I.; LIEMPI, A.; GALLARDO, C.; GALANTI, N.; MAYA, J.; KEMMERLING, U.** 2017. “Ex Vivo Infection of Human Placental Chorionic Villi Explants with *Trypanosoma Cruzi* and *Toxoplasma Gondii* Induces Different Toll-like Receptor Expression and Cytokine/Chemokine Profiles”. *American Journal of Reproductive Immunology (New York, N.Y.: 1989)* 78 (1). <https://doi.org/10.1111/aji.12660>.
- CHANG, S.; LEE, S.; YANG, L.; KIM, D.; YOON, J.; KO, H.; OGAWA, M.; SASAKAWA, C.; KWEON, M.** 2013. “Autophagy controls an intrinsic host defense to bacteria by promoting epithelial cell survival: a murine model.” *PloS one* 8. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0081095>.
- CHEN, F.; ZHU, H.-H.; ZHOU, L.-F.; WU, S.-S.; WANG, J.; CHEN, Z.** 2010. “Inhibition of c-FLIP expression by miR-512-3p contributes to taxol-induced apoptosis in hepatocellular carcinoma cells.” *Oncology reports* 23, 1457–62. [https://doi.org/10.3892/or\\_00000784](https://doi.org/10.3892/or_00000784).
- COFRÉ, F.; DELPIANO L.; LABRAÑA Y.; REYES A.; SANDOVAL A.; IZQUIERDO G.** 2016. “TORCH syndrome: Rational approach of pre and post natal diagnosis and treatment. Recommendations of the Advisory Committee on

Neonatal Infections Sociedad Chilena de Infectología.” *Revista Chilena De Infectologia: Organo Oficial De La Sociedad Chilena De Infectologia* 33 (2): 191-216. <https://doi.org/10.4067/S0716-10182016000200010>.

**DALY, M.; O'DRISCOLL, L.** 2017. “Chapter 5 MicroRNA Profiling of Exosomes” 1509: 37–46. <https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6524-3>.

**DE SOUZA, W.** 2002. Basic Cell Biology of *Trypanosoma cruzi*. *Curr Pharm Des.* 8:269 – 285.

**DONKER, R. B.; MOUILLET, J. F.; CHU, T.; HUBEL, C.A.; STOLZ, D.B.; MORELLI, A.E.; SADOVSKY, Y.** 2012. “The Expression Profile of C19MC MicroRNAs in Primary Human Trophoblast Cells and Exosomes.” *Molecular Human Reproduction* 18 (8): 417–24. <https://doi.org/10.1093/molehr/gas013>.

**DUASO, J.; ROJO, G.; CABRERA, G.; GALANTI, N.; BOSCO, C.; MAYA, J.D.; MORELLO, A.; KEMMERLING, U.** 2010. “Trypanosoma cruzi induces tissue disorganization and destruction of chorionic villi in an ex vivo infection model of human placenta” *Placenta* 31 (8): 705-11. <https://doi.org/10.1016/j.placenta.2010.05.007>.

**FRANZÉN, O.; RNAER, E.; FERELLA, M.; NILSSON, D.; RESPUELA, P.; CRNAINCI, P.; HAYASHIZAKI, Y.; ÅSLUND, L.; ANDERSSON, B.; DAUB, C.O.** 2011. “The Short Non-Coding Transcriptome of the Protozoan Parasite *Trypanosoma cruzi*.” *PLoS Neglected Tropical Diseases* 5 (8). <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0001283>.

**FREITAS, K.; ANTUNES F.; BAVIA, L.; SILVIA, F.; HOLSBACH, M.; MESSIAS-REASON, L.; SANDRI, T.** 2019. “Chagas Disease: From Discovery to a Worldwide Health Problem”. *Frontiers in Public Health*, Vol 7. <https://doi.org/10.3389/fpubh.2019.00166>.

**GARCÍA H, ALEJANDRO, BAHAMONDE M, MARÍA INÉS, VERDUGO B, SUSANA, CORREA S, JAQUELINNE, PASTENE O, CLAUDIO, SOLARI, ALDO, TASSARA O, RENZO, & LORCA, MYRIAM.** 2001. “Infección transplacentaria por *Trypanosoma cruzi*: Situación en Chile”. *Revista médica de Chile*, 129(3), 330-332. <https://dx.doi.org/10.4067/S0034-98872001000300016>.

**GHEDIRA, K.** 2018. “Introductory Chapter: A Brief Overview of Transcriptional and Post-transcriptional Regulation”. *Transcriptional and Post-Transcriptional Regulation*, 3–12. <https://doi.org/10.5772/intechopen.79753>.

- HAYDER, H.; O'BRIEN, J.; NADEEM, U.; PENG, C.** 2018. "MicroRNAs: Crucial Regulators of Placental Development." *Reproduction* 155 (6). <https://doi.org/10.1530/REP-17-0603>.
- HOWARD, E.J.; XION, X.; CARLIER, Y.; SOSA-ESTANI, S.; BUEKENS, P.** 2013 "Frequency of the congenital transmission of *Trypanosoma cruzi*: a systematic review and meta-analysis." *BJOG : an international journal of obstetrics and gynaecology*, 121(1), 22–33. <https://doi.org/10.1111/1471-0528.12396>.
- HUPPERTZ, B.; GAUSTER, M.** 2011. Trophoblast fusion. *Advances in experimental medicine and biology* 713, 81–95. [https://doi.org/10.1007/978-94-007-0763-4\\_6](https://doi.org/10.1007/978-94-007-0763-4_6).
- KEMMERLING, U.; BOSCO, C.; GALANTI, N.** 2010. Infection and Invasion Mechanisms of *Trypanosoma cruzi* in the Congenital Transmission of Chagas' Disease: A Proposal. *Biol Res.* 43(3):307–316.
- KEMMERLING, U.; OSUNA, A.; SCHIJMAN, A.G.; TRUYENS, C.** 2019. "Congenital Transmission of *Trypanosoma cruzi*: A Review about the Interactions between the Parasite, the Placenta, the Maternal and the Fetal/Neonatal Immune Responses." *Frontiers in Microbiology* 10 (AUG): 1–15. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01854>.
- KREDO-RUSSO S, HORNSTEIN E.** 2011. "MicroRNA knock down by cholesterol-conjugated antisense oligos in mouse organ culture." *Methods Mol Biol.* 732:89-97. doi: 10.1007/978-1-61779-083-6\_7. PMID: 21431707.
- LIEMPI, A.; CASTILLO,C.; DUASO, J.; DROGUETT, D.; SANDOVAL, A.; BARAHONA, K.; HERNÁNDEZ, A.; GALANTI, N.; MAYA, J.D.; KEMMERLING, U.** 2014. "*Trypanosoma cruzi* Induces Trophoblast Differentiation: A Potential Local Antiparasitic Mechanism of the Human Placenta?" *Placenta* 35 (12): 1035–42. <https://doi.org/10.1016/j.placenta.2014.09.017>.
- LIEMPI A, CASTILLO C, CERDA M, DROGUETT D, DUASO J, BARAHONA K, HERNÁNDEZ A, DÍAZ-LUJÁN C, FRETES R, HÄRTEL S, KEMMERLING U.** 2015. "*Trypanosoma cruzi* infectivity assessment in "in vitro" culture systems by automated cell counting". *Acta tropica*, 143(Mar), 47-50. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2014.12.006>.
- LIEMPI, A.; CASTILLO, C.; CARRILLO, I.; MUÑOZ, L.; DROGUETT, D.; GALANTI, N.; MAYA, J.D.; KEMMERLING, U.** 2016. "A Local Innate Immune Response against *Trypanosoma cruzi* in the Human Placenta: The Epithelial Turnover of the Trophoblast." *Microbial Pathogenesis* 99: 123–29. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2016.08.022>.

- MAYHEW, T. M.** 2014. “Turnover of Human Villous Trophoblast in Normal Pregnancy: What Do We Know and What Do We Need to Know?” *Placenta* 35 (4): 229–40. <https://doi.org/10.1016/j.placenta.2014.01.011>.
- MEDINA L.; CASTILLO C.; LIEMPI A.; GUERRERO-MUÑOZ J.; ROJAS-PIRELA M.; MAYA JD.; PRIETO H.; KEMMERLING U.** 2020. “*Trypanosoma cruzi* and *Toxoplasma gondii* Induce a Differential MicroRNA Profile in Human Placental Explants”. *Front. Immunol.* 11:595250. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.595250>.
- MEDINA L.; GUERRERO-MUÑOZ J.; LIEMPI A.; CASTILLO C.; ORTEGA Y.; SEPÚLVEDA A.; SALOMÓ F.; MAYA JD.; KEMMERLING U.** 2021. “MicroRNAs 512-3p and 515-5p mediates *Trypanosoma cruzi ex vivo* infection of human placental explants by modulating trophoblast differentiation”. *Pathogens*.
- MORALES-PRIETO.; D. M.; OSPINA-PRIETO, E.; CHAIWANGYEN, W.; SCHOENLEBEN, M.; MARKERT, U.R.** 2013. “Pregnancy-Associated MiRNA-Clusters.” *Journal of Reproductive Immunology* 97 (1): 51–61. <https://doi.org/10.1016/j.jri.2012.11.001>.
- MUÑOZ-SARAVIA, S. .; HABERLAND, A.; WALLUKAT, G.; SCHIMKE, I.** 2012. “Chronic Chagas’ heart disease: a disease on its way to becoming a worldwide health problem: epidemiology, etiopathology, treatment, pathogenesis and laboratory medicine.” *Heart failure reviews*, 17(1), 45-64.
- O’BRIEN, J.; HAYDER, H.; ZAYED, Y.; PENG, C.** 2018. “Overview of MicroRNA Biogenesis, Mechanisms of Actions, and Circulation.” *Frontiers in Endocrinology* 9 (AUG): 1–12. <https://doi.org/10.3389/fendo.2018.00402>.
- PARKER, E.; SETHI, A.** 2011. “Chagas disease: coming to a place near you.” *Derm clin.* 29(1): 53-62.
- PÉREZ-MOLINA, J.A.; MOLINA, I;** 2018. “Chagas Disease.” *The Lancet* 391 (10115): 82–94. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(17\)31612-4](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(17)31612-4).
- PFAFFL, M.** 2001. “A New Mathematical Model for Relative Quantification in Real-Time RT-PCR”. *Nucleic Acids Research* 29 (9): e45. <https://doi.org/10.1093/nar/29.9.e45>
- PRATA, A.** 2001. “Clinical and Epidemiological Aspects of Chagas Disease.” *The Lancet. Infectious Diseases* 1 (2): 92-100. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(01\)00065-2](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(01)00065-2).

- PUNUKOLLU, G.; GOWDA, R.; KHAN, I. ; NAVARRO, V.; VASAVADA, B.** 2007. "Clinical aspects of the Chagas' heart disease. *International journal of cardiology*." 115. 279-83. [10.1016/j.ijcard.2006.03.004](https://doi.org/10.1016/j.ijcard.2006.03.004).
- RASSI, A.; RASSI, A.; & MARIN-NETO, J. A.** 2010. "Chagas disease. *The Lancet*", 375(9723), 1388–1402. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(10\)60061-X](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(10)60061-X).
- RASSI, A.; RASSI, A.; & MARCONDES DE REZENDE, J.** 2012. "American alTrypanosomiasis (Chagas Disease)". *Infectious Disease Clinics of North America*, 26(2), 275–291. <https://doi.org/10.1016/j.idc.2012.03.002>.
- REBUSTINI, I.T.,** 2017. A Functional MicroRNA Screening Method for Organ Morphogenesis. *Current Protocols in Cell Biology* 74, 19.19.1-19.19.17. <https://doi.org/10.1002/CPCB.15>.
- SADOVSKY, Y.; MOUILLET, J.F.; OUYANG, Y.; BAYER, A.; COYNE, C.B.** 2015. "The Function of Trophomirs and Other Micromnas in the Human Placenta." *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine* 5 (8): 1–16. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a023036>.
- SALES, P.; A., MOLINA, I.; MURTA, S. M. F.; SÁNCHEZ-MONTALVÁ, A.; SALVADOR, F.; CORRÊA-OLIVEIRA, R., & CARNEIRO, C. M.** 2017. "Experimental and clinical treatment of Chagas disease": A review. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 97(5), 1289–1303. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.16-0761>.
- SHIPPEY, S.H.; ZAHN, C.M.; CISAR, M.M.; WU, T.J. AND SATIN, A.J.** 2005. "Use of the placental perfusion model to evaluate transplacental passage of *Trypanosoma cruzi*". *Am J Obstet Gynecol*. 192 (2):586–591. <https://doi.org/10.1016/j.ajog.2004.07.079>.
- TYLER, K.M. AND ENGMAN, D.M.** 2001. The Life Cycle of *Trypanosoma cruzi* Revisited. *Int J Parasitol*. 31(5-6): 472–481.
- VELU, C.; GRIMES, H.** 2012. Utilizing antagomiR (antisense microRNA) to knock down microRNA in murine bone marrow cells. *Methods Mol Biol*. 2012;928:185-195. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4025929/pdf/nihms577606.pdf>
- WHO.** 2010. First WHO report on neglected tropical diseases: working to overcome the global impact of neglected tropical diseases. *In First WHO Report on Neglected Tropical Diseases: Working to Overcome the Global Impact of Neglected Tropical Diseases*, 172. [http://whqlibdoc.who.int/publications/2010/9789241564090\\_eng.pdf?ua=1](http://whqlibdoc.who.int/publications/2010/9789241564090_eng.pdf?ua=1).
- WHO.** 2015. "Investing to overcome the global impact of neglected tropical diseases: third WHO report on neglected

diseases” <https://apps.who.int/iris/handle/10665/152781>

**YOSHIDA, N.** 2006. Molecular Basis of Mammalian Cell Invasion by *Trypanosoma cruzi*. *An Acad Bras Cienc.* 78(1):87–111.

**ZHANG.; CHENG, Y.; XU, Z.; ZHANG, T.F.; WANG, Y.L.;** 2015. “Circulating MicroRNAs as Diagnostic and Prognostic Tools for Hepatocellular Carcinoma.” *World Journal of Gastroenterology* 21 (34): 9853–62. <https://doi.org/10.3748/wjg.v21.i34.9853>.

**ZINGALES, B.** 2018. “*Trypanosoma cruzi* genetic diversity: Something new for something known about Chagas disease manifestations, serodiagnosis and drug sensitivity.” *Acta Trop.*; 184:38-52. <https://doi:10.1016/j.actatropica.2017.09.017>

**ZUMA, A.; DOS SANTOS, E.; DE SOUZA, W.;** 2020. “Basic Cell Biology of *Trypanosoma cruzi*” *Curr Pharm Des.* 26(14) <http://dx.doi.org/10.2174/1381612826999201203213527>

## Anexos

### Anexo 1



Dirección  
Comité de Ética de la Investigación del  
Servicio de Salud Metropolitano Norte

CARTA AE N°010/2019  
Dr. JJS/lcc

Santiago, abril 15 de 2019

Dra. Ulrike Kemmerling  
Investigadora Principal  
Instituto de Ciencias Biomédicas  
Facultad de Medicina  
Universidad de Chile  
Presente

Ref.: Proyecto de Investigación FONDECYT Regular 1190341: "Mechanism of Congenital Chagas disease: Effective placental Trypanosoma cruzi Ainfection depends on specific host-derived microRNAs" (Mecanismos de enfermedad de chagas congénita: La infección placentaria efectiva por Trypanosoma cruzi depende de microRNAs específicos del hospedero).

Estimada Dra. Kemmerling:

Acuso recibo acuso de su carta de fecha 26 de marzo de 2019 por la cual solicita autorización para realizar el estudio de la referencia.

No encontrándose objeciones, se procede a dar Aprobación Ejecutiva al proyecto de la referencia.

Esta aprobación quedará registrada en el Acta de la próxima sesión ordinaria de este Comité.

Sírvase recibir adjunto documento de Consentimiento Informado timbrado, fechado y firmado por el suscrito.

La saluda atentamente,

**CEI-SSM.NORTE**  
Organismo Asesor de la Dirección  
Servicio de Salud  
Metropolitano Norte

DR. JUAN JORGE SILVA SOLÍS  
PRESIDENTE - CEI-SSMN

Calle San José, 1053,  
Independencia, Santiago, Chile  
loreana.carrasco@redsalud.gov.cl  
Fono (56-2) 2575 8506  
www.ssmn.cl

## Anexo 2



Unidad de Prevención de Riesgos & Bioseguridad

Santiago, 04 de Marzo 2019.-

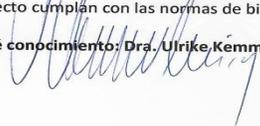
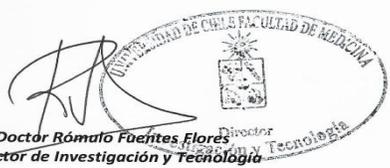
Señores  
**Fondecyt Regular 2019**  
**PRESENTE**

Estimados señores:

La Unidad de Prevención de Riesgos & Bioseguridad, Facultad de Medicina, Universidad de Chile certifica que ha recibido del investigador responsable Dra. Ulrike Kemmerling para su estudio el proyecto titulado "*Mechanism of Congenital Chagas disease: Effective placental Trypanosoma cruzi infection depends on specific host-derived microRNAs*" Laboratorio de Mecanismos de Infección parasitaria, Programa de Anatomía y Biología del Desarrollo, Instituto de Ciencias Biomédicas (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 1ra edición, 1994" y "Manual de Normas de Bioseguridad, 2da edición 2008, Centro de Control y Prevención de Enfermedades, CDC, 4ª 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 Dra. Ulrike Kemmerling, 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: Dra. Ulrike Kemmerling

  
  
**Doctor Rómulo Fuentes Flores**  
Director de Investigación y Tecnología

C.c.

- Decano, Dr. Manuel Kukuljan
- Investigador responsable, Dra. Ulrike Kemmerling
- Archivo

Unidad de Prevención de Riesgos & Bioseguridad, Facultad de Medicina, Universidad de Chile  
Independencia # 1027 / Fono: 229786564 @ upr@med.uchile.cl