



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

ROL DEL miR-19b-2-5p EN LA INFECCIÓN DE PLACENTA HUMANA INDUCIDA
POR *Trypanosoma cruzi* EN MODELOS *IN VITRO* Y *EX VIVO*

FRANCISCA VALENTINA REYES HOFFMANN

Memoria para optar al Título

Profesional de Médica
Veterinaria

Departamento de Ciencias
Biológicas Animales

PROFESOR GUÍA: ULRIKE KEMMERLING WEIS
Financiamiento FONDECYT 1190341 y ERANet17/HLH-0142 COCHACO

SANTIAGO, CHILE

2022



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

ROL DEL miR-19b-2-5p EN LA INFECCIÓN DE PLACENTA HUMANA INDUCIDA
POR *Trypanosoma cruzi* EN MODELOS *IN VITRO* Y *EX VIVO*

FRANCISCA VALENTINA REYES HOFFMANN

Memoria para optar al Título

Profesional de Médica
Veterinaria

Departamento de Ciencias
Biológicas Animales

NOTA FINAL:

	Nota	Firma
Profesor guía: Ulrike Kemmerling
Profesor corrector: Aldo Solari
Profesor corrector: Victor Hugo Parraguez

SANTIAGO, CHILE
2022

AGRADECIMIENTOS

“Cuando una autora se encuentra en la encrucijada entre interpretar, escribir y leer en fállico, entre su placer de conocer como mujer y el conocimiento sin madre, la inspiración de su corazón soplada por su hera concreta y personal puede impedir, si la escucha, que se equivoque de placer, de camino y de orgasmo”

María Milagros Rivera

Agradezco a mi madre, América, mi hera personal, por haberme dado la vida y la palabra y con ella, la capacidad de interpretar el mundo. También por haberme invitado siempre a buscar mi propio placer, lo que me ha ayudado a culminar esta etapa de mi vida con una sonrisa a pesar de todo lo vivido en el proceso. De ella aprendí a amar, que es lo que me ha motivado a terminar esta carrera.

INDICE

AGRADECIMIENTOS	2
INDICE	3
ÍNDICE DE TABLAS	5
RESUMEN	7
ABSTRACT.....	8
INTRODUCCIÓN	9
REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	10
<i>Trypanosoma cruzi</i>	10
Ciclo biológico de <i>Trypanosoma cruzi</i>	10
Enfermedad de Chagas	12
Enfermedad de Chagas congénita.....	12
La placenta.....	12
Trofoblasto y recambio epitelial	14
Regulación de la expresión de genes por miRNAs.....	15
miRNAs en placenta	16
HIPÓTESIS	18
OBJETIVO GENERAL.....	18
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	18
MATERIALES Y MÉTODOS	19
1) Cultivo de células VERO®:.....	19
2) Cultivo y obtención de tripomastigotes de <i>T. cruzi</i> :	19
3) Cultivo de células BeWo:	19
4) Obtención y cultivo de explantes de placenta humana (HPEs)	20
5) Inhibición y sobreexpresión de miR-19b-2-5p	20
Adicionalmente células BeWo y HPE	21
6) Infección de células BeWo y HPE:.....	21
7) Extracción de miRNAs:	21
8) Determinación de la expresión de miRNA por RT-qPCR:.....	21
9) Determinación de la infección parasitaria	22
10) Análisis Estadístico.....	23
11) Bioseguridad	23
12) Ética	23
RESULTADOS	24
Células BeWo se transfectan con antagomiR-CY3	24
Células BeWo	24
Las células BeWo se transfectan con el complejo RNAifectin / miR-19b-2-5p	24
La sobreexpresión o inhibición de miR19b-2-5p en células BeWo no influye significativamente en los niveles de carga parasitaria	25

HPes pueden ser transfectados efectivamente con mimic y antagomiR miR-19b-2-5p26 miR-19b-2-5p.....	28
DISCUSIÓN	29
CONCLUSIÓN.....	32
BIBLIOGRAFÍA	33
ANEXOS	39
Anexo 1	39
Anexo 2.....	42
Anexo 3.....	43

ÍNDICE DE TABLAS

TABLA 1	22
TABLA 2	23

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1	11
FIGURA 2	13
FIGURA 3	14
FIGURA 4	16
FIGURA 5	24
FIGURA 6	25
FIGURA 7	26
FIGURA 8	27
FIGURA 9	27
FIGURA 10	28

RESUMEN

La Tripanosomiasis americana, conocida como enfermedad de Chagas, es una patología zoonótica endémica de Latinoamérica cuyo agente etiológico es *Trypanosoma cruzi*, parásito protozoario de la clase *kinetoplastea*. La transmisión congénita de *T. cruzi* es epidemiológicamente relevante, aunque se reportan bajas tasas. Previamente hemos 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 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 micro RNAs (miRNAs) específico que incluye al miR-19b-2-5p (miR-19b). Este miRNA regula negativamente la expresión del gen hCYP19A, que codifica a la aromatasa P450, y al gen codificante del factor de transcripción hGCM1.

Así, durante la diferenciación del trofoblasto la expresión de miR-19b es inhibida. En la presente memoria de título hemos demostrado que: i) *T. cruzi* disminuye la expresión de miR-19b durante la infección *ex vivo* de explantes de placenta humana (HPE); ii) los HPE pueden ser efectivamente transfectados con mimics y antagomiR de miR-19b; iii) miR-19b modula la susceptibilidad a la infección con *T. cruzi* en HPE; y que iv) en una línea celular de trofoblasto los resultados no fueron concluyentes.

Se concluye que la susceptibilidad a la infección en la placenta humana está mediada, al menos parcialmente, por miR-19b.

Palabras Claves: *Trypanosoma cruzi*, placenta humana, transmisión congénita, miR-19b-2-5p.

ABSTRACT

American Trypanosomiasis, commonly known as Chagas disease, is a zoonotic disease endemic to Latin America whose etiologic agent is *Trypanosoma cruzi*, a protozoan parasite of the class kinetoplast. Congenital transmission is a significant Public Health problem despite its low transmission rates. Previously, we have demonstrated that the epithelial turnover is part of local placental antiparasitic mechanisms. Furthermore, epithelial turnover implies regulating 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 miR-19b-2-5p (miR-19b).

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-19b expression is inhibited. Here we evaluated the possible role of miR-19b during *ex vivo* infection of human placental explants (HPE). Our results show that: i) *T. cruzi* decrease miR-19b expression during *ex vivo* infection of HPE; ii) HPE can be effectively transfected with miR-19b mimics and antagomirs; iii) iv) miR-19b modulate susceptibility of *T. cruzi* infection in HPE; and that iv) the results obtained in a trophoblastic cell line were not conclusive.

We conclude that the susceptibility to *ex vivo* infection of human placental explants is at least partially mediated by miR-19b.

Key words: *Trypanosoma cruzi*, human placenta, congenital transmissión, miR-19b-2-5p.

INTRODUCCIÓN

Trypanosoma cruzi (*T. cruzi*) es un protozoo, parásito intracelular de la clase *kinetoplastea*, que presenta un ciclo biológico complejo que involucra dos hospederos, un artrópodo y un hospedero mamífero, incluyendo la especie humana. Es el agente etiológico de la enfermedad de Chagas (CD), también llamada Tripanosomiasis americana, que es una patología zoonótica endémica de América Latina y potencialmente mortal tanto en humanos como en otras especies mamíferas.

La transmisión congénita, representa la principal ruta de contagios en países no endémicos y es una de las principales causas de que la CD se ha globalizado constituyéndose en una enfermedad emergente de distribución mundial. A pesar de que las tasas de transmisión congénita son bajas, esta forma de transmisión es responsable de aproximadamente un 22% de los nuevos casos reportados anualmente (Kemmerling *et al.*, 2019; Medina *et al.*, 2020).

La probabilidad de infección congénita depende de factores del parásito, del sistema inmune materno y fetal en desarrollo, así como de la placenta. Esta última juega un rol importante en la modulación de la infección por de *T. cruzi*. La barrera placentaria es la principal barrera anatómica que limita la trasmisión del parásito. El recambio epitelial del trofoblasto, primer tejido fetal en contacto con la sangre materna es uno de los mecanismos placentarios que impiden la trasmisión parasitaria. El recambio epitelial del trofoblasto implica que las células del estrato basal (citotrofoblasto) proliferen y luego se diferencien y fusionen con el estrato superficial (sinciciotrofoblasto), para finalmente ser liberadas hacia la sangre materna como nodos apoptóticos. Todos estos procesos celulares que subyacen al recambio epitelial 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 micro RNAs (miRNAs). El miR-19b es uno de los miRNAs involucrados en el proceso de recambio epitelial del trofoblasto, regulando negativamente la diferenciación celular. Trabajos previos en el laboratorio han demostrado que *T. cruzi* induce la diferenciación celular en el trofoblasto y disminuye la expresión de miR-19b en explantes de placenta humanos (HPE).

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

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 donde participa un insecto hematófago como vector biológico y un mamífero como hospedador definitivo (WHO, 2010). Existen múltiples cepas y clones de *T. cruzi* que se clasifican en siete unidades de tipificación discreta (DTU por sus siglas en inglés) TcI – TcVI y TcBat según sus diferencias genéticas, biológicas y bioquímicas. El tipo de cepa y clones se asocian con la virulencia y tropismo tisular (Kemmerling *et al.*, 2019; Zingales, 2018; Juiz *et al.*, 2017; Medina *et al.*, 2022).

Ciclo biológico de *Trypanosoma cruzi*

El ciclo biológico de *T. cruzi* es complejo y comprende distintas formas celulares (**Figura 1**) 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 μm largo y 2 μm 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 μm 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 triatomino (Prata, 2001; De Souza, 2002; Yoshida, 2006)

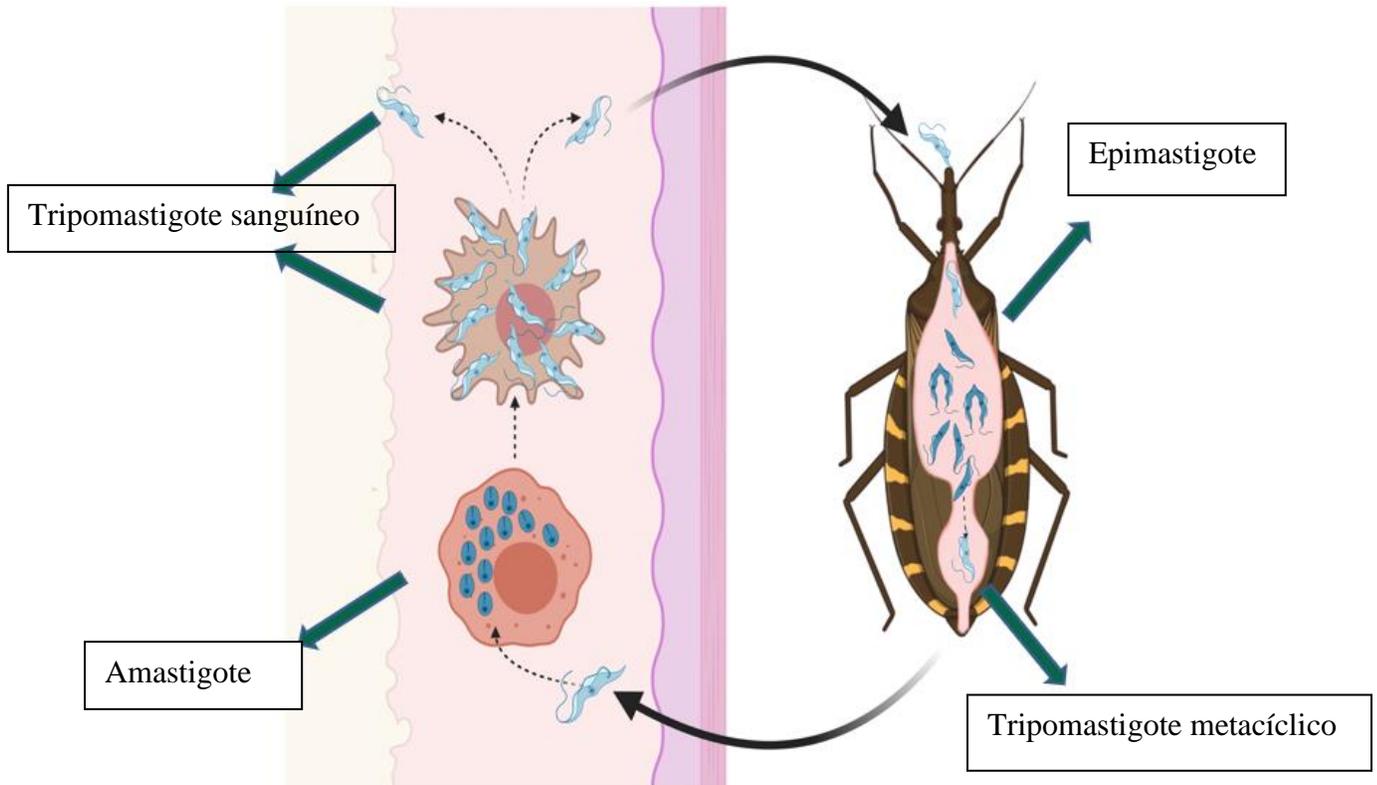


Figura 1 Ciclo de vida *T. cruzi*. Descripción del ciclo biológico de *T. cruzi* en humano, incluyendo la fase vectorial y la fase del hospedero. (Elaboración propia con BioRender.com).

Cuando el insecto triatomino 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, 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* (Rassi y Marin-Neto, 2010)

Enfermedad de Chagas

La enfermedad de Chagas (CD) es una infección zoonótica potencialmente mortal, endémica de Latinoamérica, que afecta alrededor de 8 a 12 millones de personas y al 1.2% de la población chilena. La Organización mundial de la Salud considera a la CD como una enfermedad desatendida, ya que afecta a personas de condiciones socioeconómicas desaventajadas con dificultades de acceso a tratamientos y seguimiento (WHO, 2010).

Enfermedad de Chagas congénita

La transmisión vía vertical ocurre entre el 1 y 12% de las mujeres chagásicas embarazadas, aun así, representa el 22% de los nuevos casos anuales a nivel mundial causando la infección en alrededor de 9000 niños. La CD congénita (CCD) se considera una infección parasitaria aguda, en la cual aproximadamente el 60% de los casos son asintomáticos. Sin embargo, los casos de CCD pueden presentar baja de peso al nacer, partos prematuros y bajo puntaje APGAR en comparación a recién nacidos no contagiados. Por otro lado, los casos sintomáticos pueden llevar rápidamente a la muerte (Liempi *et al.*, 2016; Kemmerling *et al.*, 2019).

La transmisión congénita ocurre principalmente vía placentaria, en la cual el parásito debe atravesar la barrera placentaria para alcanzar al feto (Liempi *et al.*, 2016). Así, la probabilidad de infección congénita depende de la placenta, de factores parasitarios así como del sistema inmune materno y fetal en desarrollo (Kemmerling *et al.*, 2019).

La placenta

La placenta es un órgano temporal que media el vínculo madre-feto, estructurándose tanto de tejidos de origen materno y fetal. La placenta participa en la mantención del embarazo a través de intercambio metabólico, secreción de hormonas y modular la respuesta inmune

(Kemmerling *et al.* 2019). La placenta humana es de tipo hemocorial, lo que implica un íntimo contacto entre los tejidos fetales y la sangre materna. Su unidad funcional es la vellosidad coriónica libre, en la que se encuentra la barrera placentaria (Figura 2). Esta barrera anatómica está formada por el trofoblasto, epitelio en contacto con la sangre materna que circula en el espacio intervilloso placentario, seguido por una lámina basal que lo separa del estroma veloso o tejido conectivo fetal que contiene los capilares fetales (Kemmerling *et al.*, 2019). El mantenimiento de esta barrera anatómica está parcialmente asegurado por el recambio del trofoblasto. Para que cualquier infección de establezca en el feto, los patógenos, incluyendo *T. cruzi*, deben atravesar dichas capas (Liempi *et al.*, 2016).

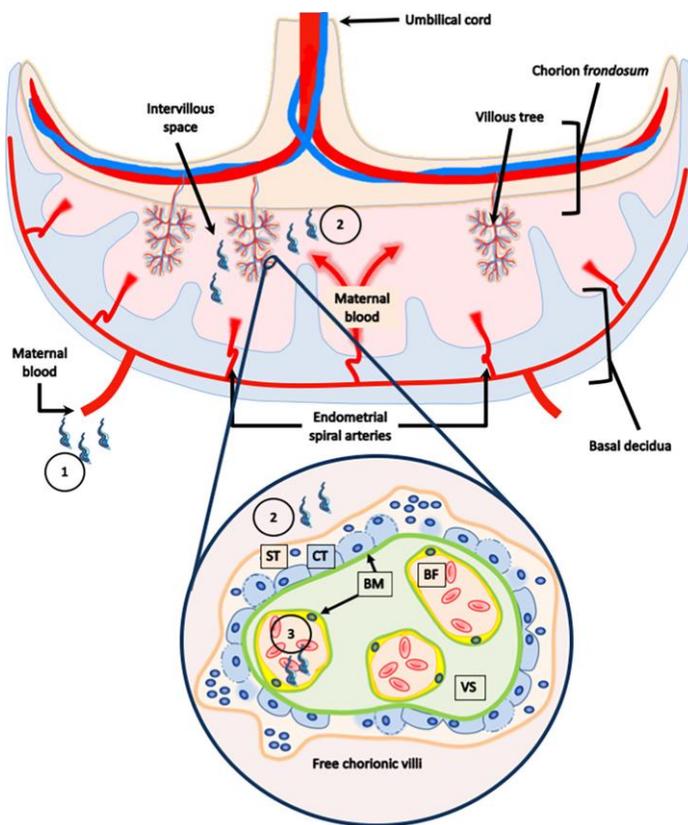


Figura 2 Barrera placentaria humana. Se muestran las vellosidades coriónicas, conformadas por el trofoblasto, compuesto por el sinciotrofoblasto (ST) y por el citotrofoblasto (CT), y capilares fetales (BF). El trofoblasto y los BF están separados del estroma veloso (VS) por sus respectivas láminas basales (BM). La sangre materna rodea y contacta directamente con el trofoblasto en el espacio intervilloso. Durante la transmisión congénita, el parásito desde la sangre materna (1) contacta con el trofoblasto en el espacio intervilloso (2) donde debe cruzar la barrera placentaria hasta alcanzar los capilares fetales (3) para así infectar al feto (Fuente: Kemmerling *et al.*, 2019).

Trofoblasto y recambio epitelial

El trofoblasto es de origen fetal y se compone de dos capas: el citotrofoblasto (CT) que es altamente proliferativo y el sincitiotrofoblasto (ST) que pierde su capacidad proliferativa. Las células mononucleares del CT forman el ST a través de la diferenciación y fusión sincicial de éstas, formando una capa multinucleada que recubre las vellosidades coriónicas que se encuentra en contacto directo con la sangre materna. (Huppertz & Gauster, 2011; Mayhew, 2014; Liempi *et al.*, 2016)

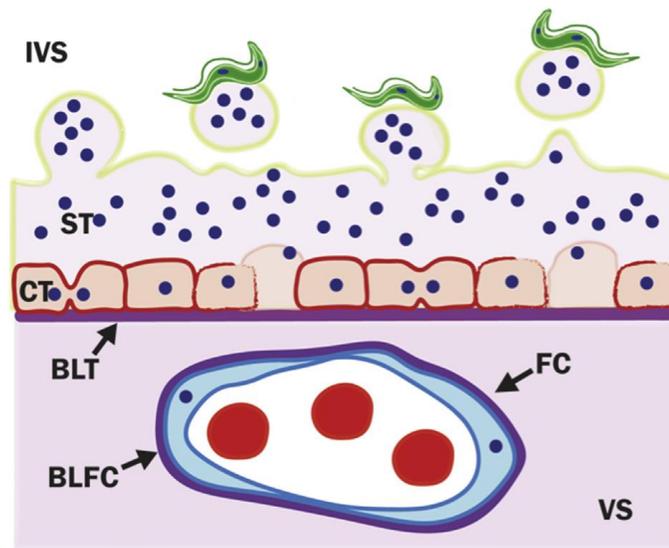


Figura 3 Recambio del trofoblasto como mecanismo de defensa ante *T. cruzi*. Ante la presencia de *T. cruzi*, se observa un aumento en la proliferación y fusión de células del CT, así como en la liberación de nodos apoptóticos desde el ST. Los nodos apoptóticos son liberados junto con los tripomastigotes (en verde) adheridos. CT: Citotrofoblasto, ST: Sincitiotrofoblasto, VS: Estroma veloso, FC: Capilares fetales, BLT: Lámina basal del trofoblasto, BLFC: lámina basal de los endotelios fetales, IVS: Espacio intervelloso (Liempi *et al.*, 2016).

El trofoblasto constituye una barrera física contra diversos patógenos. Adicionalmente el recambio epitelial del trofoblasto es considerado parte del sistema inmune innato debido a que los patógenos adheridos en la superficie del epitelio son removidos junto a los nodos apoptóticos (**Figura 3**) (Janeway & Traver, 2004; Liempi *et al.*, 2014). El recambio epitelial se lleva a cabo gracias a una serie de procesos celulares bien coordinados que incluyen la proliferación celular, diferenciación celular y apoptosis o muerte programada (Mayhew, 2014; Liempi *et al.*, 2016). Todos estos procesos son inducidos por *T. cruzi* una vez que entra en contacto con el trofoblasto (Liempi *et al.*, 2014, 2016; Kemmerling *et al.*, 2019).

La coordinación de estos procesos implica profundos cambios en la expresión génica, la que es regulada a nivel transcripcional y post-transcripcional. Los RNA pequeños no codificantes, entre ellos los miRNAs regulan postranscripcionalmente la expresión génica (Brennecke *et al.* 2005). Importantemente, *T. cruzi* induce un perfil de miRNAs específicos en explantes de placenta humana (Medina *et al.* 2020).

Regulación de la expresión de genes por miRNAs

Los miRNA son moléculas de RNA de una sola hebra, no codificantes, de una longitud de entre 18 y 22 nucleótidos. En humanos se han descrito más de 2.500 miRNAs, que regulan la expresión de cerca de 30% de genes fundamentales involucrados en procesos biológicos claves. Los miRNAs reprimen a los RNAs mensajeros (mRNA) de manera secuencial 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

El desarrollo y mantenimiento de los distintos procesos celulares de la placenta mencionados con anterioridad son regulados tanto por distintos miRNA tejido-específicos como por otros que se expresan en el organismo completo. (Donker *et al.*, 2012).

Entre los miRNAs no placenta-específicos esta el miR-19b, un miRNA codificado en el *cluster* microRNA-17~92. MiR-19b regula la expresión génica de dos genes fundamentales para la diferenciación del trofoblasto: a) gen hCYP19A que codifica a la aromatasa P450 y b) gen codificante del factor de transcripción hGCM1 (*human Glial Cell Missing factor 1*) (Kumar *et al.*, 2013). Trabajos previos indican que *T. cruzi* disminuye la expresión de miR-19b (**Figura 4**), lo que concuerda con el hecho que el parásito promueve la diferenciación de trofoblasto evidenciado mediante el aumento de la expresión de hGCM1, hCG y sincintina (Liempi *et al.*, 2014).

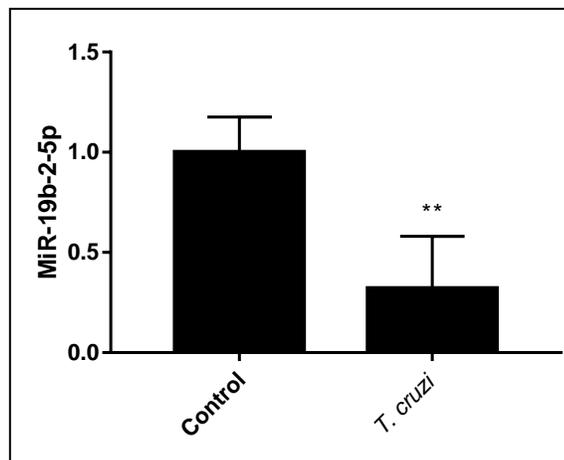


Figura 4 *T. cruzi* disminuye la expresión de miR-19b en explantes de placenta humana: HPE fueron desafiados con tripomastigotes, en una relación de 10^5 parásitos por ml. El nivel de expresión relativa de miR-19b se midió a través de RT-qPCR con el método $\Delta\Delta C_t$ usando como gen housekeeping la expresión del snRNA U6 (RNU6-1). Todos los valores se expresan como la media \pm SD, los datos se normalizaron en función de los valores del control y se analizaron mediante ANOVA de una vía y post-test de Dunnet. ** $p \leq 0.01$.

En esta Memoria de Título se estudió el posible rol de miR-19b en la susceptibilidad de células y tejidos placentarios a la infección con *T. cruzi*. Se propone que en explantes de placenta humana (HPE) y en células BeWo (línea celular de trofoblasto) los niveles de miR-19b determinen la susceptibilidad a la infección. Así, la sobreexpresión y la represión de miR-19b aumentaría y disminuiría respectivamente los niveles parasitarios presentes en los modelos de estudio. Esto permitirá tener un mayor conocimiento sobre la fisiopatología de

transmisión congénita de *T. cruzi* e identificará posibles herramientas diagnósticas y terapéuticas de la CCD.

HIPÓTESIS

Los niveles de miRNA-19b-2-5p en la línea celular BeWo y en HPE, modulan la infección con *T. cruzi*.

OBJETIVO GENERAL

Estudiar en células BeWo y HPE el rol de miR-19b en la susceptibilidad de infección por *T. cruzi*

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Determinar el posible rol de miR-19b en la probabilidad de infección de *T. cruzi* en células BeWo.
2. Determinar el posible rol de miR-19b en la probabilidad de infección de *T. cruzi* en HPE.

MATERIALES Y MÉTODOS

- 1) **Cultivo de células VERO®:** Las células VERO corresponden a una línea celular de fibroblastos obtenidos de riñón de mono verde africano (*Chlorocebus spp*) (ATCC® CCL-81TM). Las células fueron cultivados en medio Roswell Park Memorial Institute 1640 (RPMI 1640, Gibco®) suplementado con bicarbonato de sodio (NaHCO₃) 2mg/ml, estreptomycin 50µg/ml, penicilina 50 UI/ml y enriquecido con suero fetal bovino (SFB) inactivado (por tratamiento térmico a 56°C por 30 minutos para la inactivación de las proteínas del Complemento) al 10% para crecimiento o al 5% para mantenimiento a 37°C en un ambiente húmedo con 5% de CO₂, reemplazando el medio cada 24 o 48 horas (Salas *et al.*, 2008). Estas células fueron utilizadas para cultivar y obtener tripomastigotes de *T. cruzi*.
- 2) **Cultivo y obtención de tripomastigotes de *T. cruzi*:**
Se obtuvieron tripomastigotes de *T. cruzi* de la cepa Ypsilon (Y) a partir de cultivos de células VERO® previamente infectadas con el parásito. Las células VERO® fueron cultivadas como descrito más arriba e infectadas con 1 a 2 ml de medio con tripomastigotes provenientes de un cultivo anterior. Así los parásitos invaden las células 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 en una cámara de Neubauer (Liempi *et al.*, 2014; Castillo *et al.*, 2017a).
- 3) **Cultivo de células BeWo:** Línea celular de trofoblasto, obtenida a partir de un coriocarcinoma humano (ATCC® CCL-98TM), elegida porque se puede inducir su diferenciación celular y expresa la gran mayoría de los marcadores de diferenciación del trofoblasto. Las células fueron cultivadas en medio de cultivo Dulbecco's Modified EagleMedium F-12 (DMEM/F-12, Gibco®), suplementado con 1,2mg/ml de NaHCO₃, 50UI/ml de estreptomycin, 50 UI/ml de penicilina y enriquecido con SFB inactivado al 10% y fueron incubadas a 37°C en un ambiente húmedo con 5% de CO₂.
Las células fueron cosechadas mediante tripsinización, se agregaron 2ml de tripsina por caja de cultivo y se incubación por 5 minutos a 37°C, para luego proceder a una

centrifugación a 2500 x g con SFB inactivado por 5 minutos. El precipitado de células fue re-suspendido en medio de cultivo fresco. El número de células necesario para cada experimento fue cuantificado mediante el método de conteo directo en un hemocitómetro para lo cual fueron mezcladas con azul de tripano en relación 1:1 y contadas de forma manual (Liempi *et al.*, 2014). Luego fueron sembradas en placas multipocillo.

4) **Obtención y cultivo de explantes de placenta humana (HPEs)**

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 cm³. 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). Posteriormente fueron transfectados con mimic, antagomiR y sus respectivos “*scrambles*” y luego desafiados con tripomastigotes (descrito más abajo).

- 5) **Inhibición y sobreexpresión de miR-19b-2-5p:** Las células BeWo fueron transfectadas con (50 y 100 nM) de antagomiR hsa-miR-19b-2-5p miRNA Antagomir, (abm® Cat. N° MNH01492) (A-19b) y agomiR (Ag-19b) hsa-miR-19b-2-5p miRNA Agomir (abm® , Cat. N° MAH01492) y sus correspondientes antagomiR *scramble* (AS) miRNA Antagomir Negative Control (abm®, Cat. N° MNH00000) y agomiR *scramble* ((AgS)miRNA Agomir Negative Control, (abm® Cat. N° MAH00000)) como control negativo de la técnica. Brevemente, las células fueron cosechadas como descrito más arriba, y se sembraron 500.000 células por pocillo en placas de 6 multipocillos en medio DMEM-F12 suplementado como se describió anteriormente. Se permitió a las células adherirse a los pocillos durante al menos 3 horas, posteriormente se cambió el medio y se agregaron los agomiR (50 y 100 nM) y su respectivos *scrambles*. En caso de la

transfección con agomirs, éstos fueron co-incubados adicionalmente con 1.5 µl de RNAiFectin™ Transfection Reagent, marca abm® (CAT.NO G073) por cada 2ml de medio. HPE fueron incubados con el mismo antagomiR y respectivo *scramble*, pero se utilizó mimics (M-19b) hsa-miR-19b-2-5p miRNA Mimic (Cat. N° MCH01492) en lugar de agomir, con su respectivo *scramble* (MS) miRNA Mimic Negative Control (Cat. N° MCH00000) a una concentración de 200 nM durante 24 horas. Finalmente, para la extracción de miRNAs, 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.

Adicionalmente células BeWo y HPE fueron transfectados con 100 nM de un control negativo de Antagomir marcado en el extremo 5' con Cy3 (abm®) e incubados durante 24 horas a 37°C, para evaluar la capacidad del antagomiR en penetrar a células y 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).

- 6) **Infección de células BeWo y HPE:** Posteriormente a la transfección, las células BeWo y los HPE fueron incubados en ausencia y presencia de tripomastigotes de *T. cruzi* (células BeWo: relación células:parásito 10:1; HPE: 10⁵ parásitos/ml) durante 24 horas en medio RPMI suplementado con SFB (Liempi *et al.*, 2015).
- 7) **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).
- 8) **Determinación de la expresión de miRNA por RT-qPCR:** La expresión de miR-19b-2-5p fue determinada por RT-qPCR de dos colas. La amplificación de cDNA de 19b-2-5p se realizó con 10µl 2X MystiCq microRNA SYBR Green qPCR, 0.5 µl 10µM de MystiCq Universal PCR Primer, 0.5µl del Primer MystiCq microRNA qPCR Assay

(**Tabla 1**), 4µl agua libre de nucleasas, y 1 ng/µl cDNA (producto de la transcripción inversa), en 20µl qRT-PCR reaction. 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 $\Delta\Delta C_t$ usando como *housekeeping* la expresión del snRNA U6 (RNU6-1) para miRNAs. (Androvic *et al.*, 2017; Pfaffl, 2001).

Tabla 1 Oligonucleonucleótidos usados como primers para RT-qPCR específicos para miRNA

Partidores qPCR	Secuencia
miR-19b-2-5p	AGUUUUGCAGGUUUGCAUUUCA
	GUGCUCGCUUCGGCAGCACAUAUACUAAAAUUGGAA
RNU6-1	CGAUACAGAGAAGAUUAGCAUGGCCCCUGCGCAAGG
	AUGACACGCAAUUCGUGAAGCGUUCCAUAUUUU

- 9) **Determinación de la infección parasitaria:** DNA genómico fue extraído de HPE con el Wizard Genomic DNA Purification Kit (Promega®) siguiendo las instrucciones del fabricante y cuantificado con el sistema µDropPlate en Varioskan Flash Multimode Reader (Thermo Scientific®). Para la amplificación de DNA humano y parasitario, se usaron los primers indicados en la **Tabla 2**. Cada reacción contenía 10µL de SensiFAST™ SYBR® Hi-ROX Kit (Bioline®), 1µL de cada partidor a 10nM y 3µL de agua ultra pura libre de DNAsas, para un volumen total de 20µL y 1 ng/µL de DNA genómico. El programa térmico consistió en pre-incubación/activación a 95°C por 3 minutos seguido de 40 ciclos de PCR: desnaturalización a 95°C por 5 segundos y alineamiento a 60°C por 30 segundos y finalmente se agregó una fase de disociación que oscila entre los 60 a 95°C. Las reacciones se realizaron en triplicado y los valores de Ct se promediaron, determinándose la expresión relativa por medio del método de doble control comparativo ($\Delta\Delta C_t$) (Castillo *et al.*, 2017a; Pfaffl, 2001).

Tabla 2 Oligonucleonucleótidos usados como primers para qPCR específicos para *T. cruzi* y GAPDH

Partidores qPCR	Secuencia
<i>T. cruzi</i>	GCTCTTGCCCACAMGGGTGC CAAGCAGCGGATAGTTCAGG
GAPDH	TGATGCGTGTACAAGCGTTTT ACATGGTATTCACCACCCCACTAT

- 10) **Análisis Estadístico:** Cada ensayo fue realizado en triplicado y en al menos en tres oportunidades distintas. Los resultados se expresan como promedio más desviación o error estándar según corresponda. La significancia de las variables cuantitativas se evaluó mediante la prueba de T Student. Las variables múltiples se analizaron mediante ANDEVA seguido por Dunnett's post test (compara 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. Siempre que sea posible, se proporcionaron valores p exactos.
- 11) **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**).
- 12) **Ética:** Este estudio cuenta con la aprobación de los respectivos Comités de Ética del Servicio de Salud Metropolitano Norte (2019-0010) (**Anexo 3**).

RESULTADOS

Células BeWo se transfectan con antagomiR-CY3

Células BeWo fueron transfectadas con AntagomiR-Cy3 conjugado para detectar su localización celular. Así, los AntagomiR-Cy3 pueden ser observados en el citoplasma (Figura 5, flechas blancas).

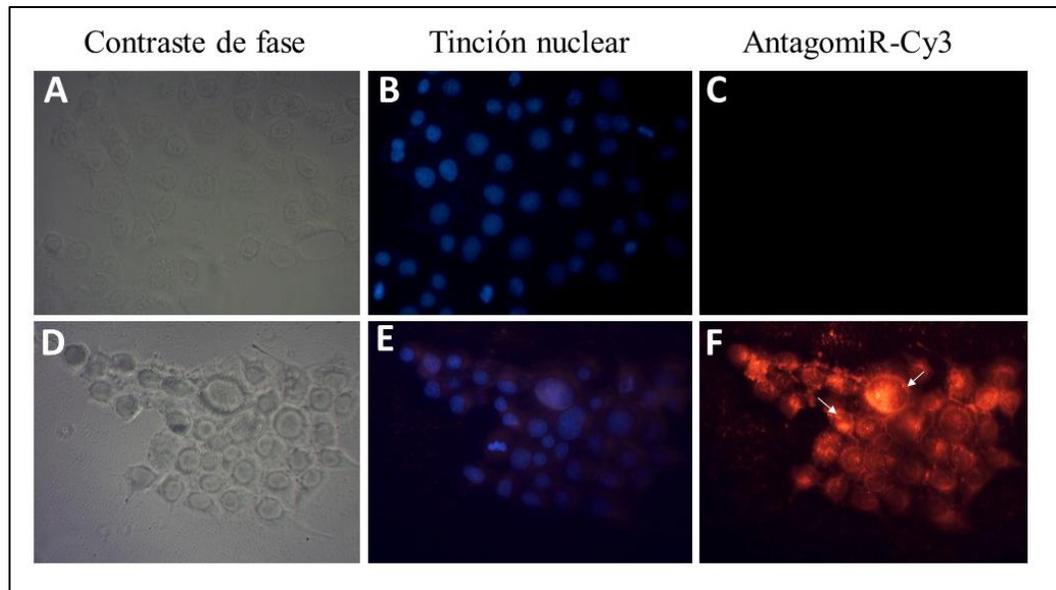


Figura 5 Células BeWo se transfectan efectivamente con antagomiR-CY3: Células BeWo sin transfectar se utilizaron como control negativo del AntagomiR-Cy3 (A, B, C), mientras que células BeWo fueron transfectadas con el AntagomiR-Cy3 (100nM) durante 24 horas (D, E, F) Las muestras se procesaron con técnicas histológicas de rutina y los núcleos se tiñeron con DAPI. Barra de aumento 20 μ m.

Las células BeWo se transfectan con el complejo RNAifectin / miR-19b-2-5p.

Las células BeWo fueron transfectadas con dos concentraciones (50nM y 100nM) de complejo RNAifectin / agomiR y su respectivo *scramble* durante 24 horas. Los niveles de miR-19b-2-5p aumentaron 740 veces \pm 370,5% ($p = 0,001$) respecto al control cuando se utilizó 100 nM de agomiR. La transfección con los *scrambles* no causa cambios significativos en la expresión del miRNA (**Figura 6**). Sin embargo, la transfección no fue consistente durante tiempos más largos, lo que dificulta el análisis del efecto de miR-19b-2-5p en las células BeWo (datos no mostrados).

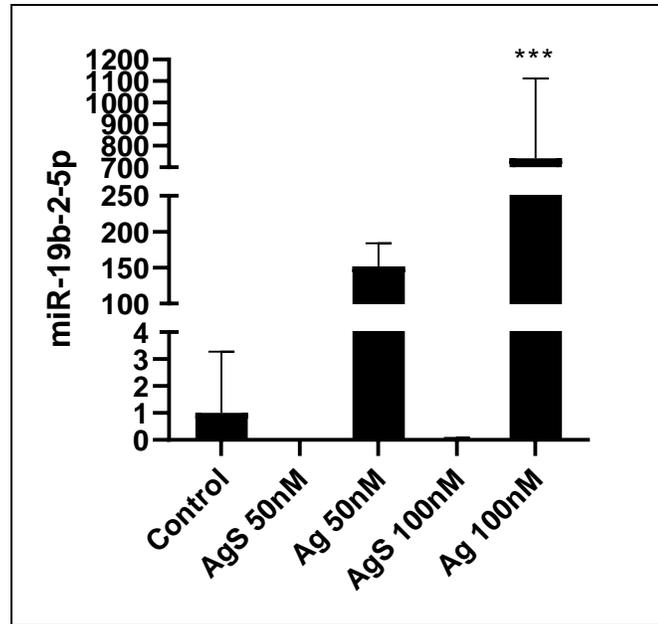


Figura 6: Células BeWo se transfectan con el complejo agomir/ifectina: Células BeWo fueron transfectadas con 50nM y 100nM e infectina (1,5µl/2ml de medio)). La presencia del miRNA fue determinado mediante RT-qPCR. Todos los valores se expresan como la media ± SD, los datos se normalizaron en función de los valores del control y se analizaron mediante ANOVA de una vía y post-test de Dunnet *** $p \leq 0.001$ AgS: AgomiR *scramble*, Ag: AgomiR.

La sobreexpresión o inhibición de miR19b-2-5p en células BeWo no influye significativamente en los niveles de carga parasitaria

Células BeWo fueron transfectadas con agomiR, antagomiR y sus respectivos *scrambles* de miR-19b-2-5p durante 24 horas y luego fueron infectados con tripomastigotes (relación célula:parásito 10:1) durante 2 horas. Se observa una tendencia al aumento de la carga de DNA parasitario, pero dadas las grandes desviaciones, las diferencias no fueron significativas. Estas dispersiones, se deben probablemente a las transfecciones poco estables (**Figura 7**).

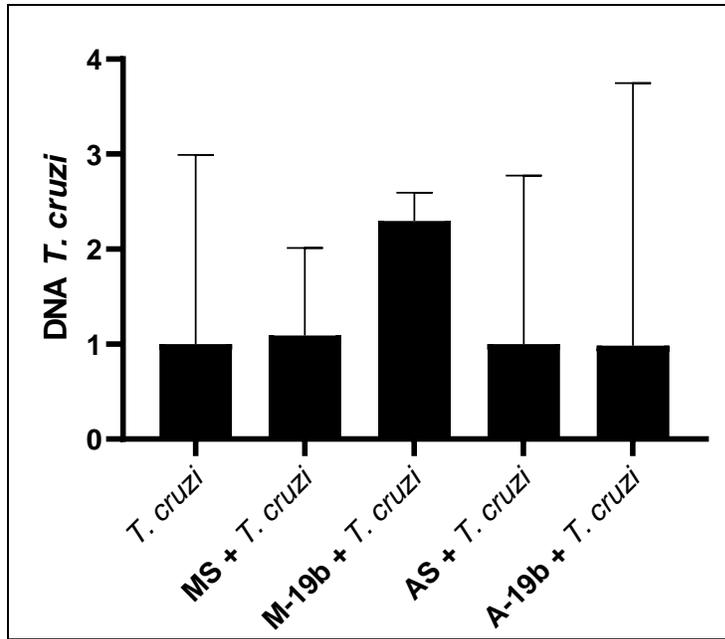


Figura 7 La sobreexpresión o inhibición de miR19b-2-5p en células BeWo no influye significativamente en los niveles de carga parasitaria. Los niveles de carga parasitaria fueron determinados mediante RT-qPCR. Todos los valores se expresan como la media \pm SD, los datos se normalizaron en función de los valores del control y se analizaron mediante ANOVA de una vía y post-test de Dunnet.

HPEs pueden ser transfectados efectivamente con mimic y antagomiR miR-19b-2-5p

HPEs fueron transfectados con 100 nM de antagomiR miR-19b-2-5p (A-19b), mimic (M-19b), y sus respectivos *scrambles* (AS o MS) (**Figura 8**) según descrito en la metodología. La transfección con A-19b y M-19b, respectivamente, disminuyen y aumentan en un $62,7 \pm 9\%$ y $16,6 \pm 95,5\%$ ($p \leq 0,01$) los niveles de miR-19b-2-5p en HPE. Como se esperaba, la transfección con los respectivos *scrambles* no afectó significativamente los niveles de miR-19b-2-5p. 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 9**) (flechas blancas).

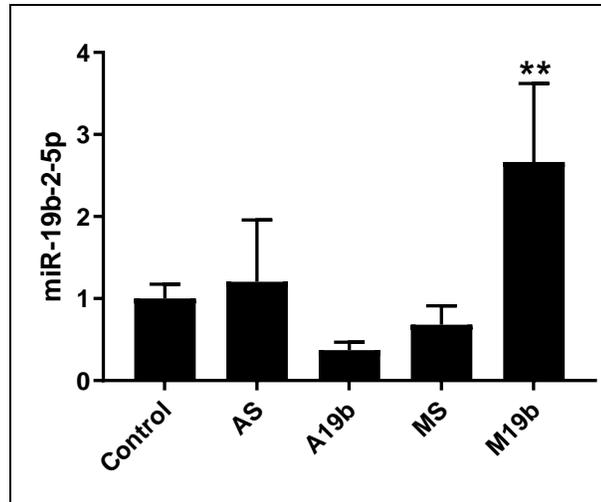


Figura 8 HPE se transfectan efectivamente con miR-19b-2-5p. HPE fueron incubados con 100 nM de antagomiR o Mimic durante 24 horas. La expresión de miR-19b-1-5p fue determinada mediante RT-qPCR. Los datos obtenidos corresponden al menos a 3 experimentos independientes que se realizaron por triplicado y representan a la media \pm SD analizada por medio de ANOVA seguido del post-test de Dunnett. ** $p \leq 0.01$. AntagomiR Scrambled (AS), AntagomiR-19b-2-5p (A19b), Mimic Scrambled (MS), Mimic-19b-2-5p (M19b).

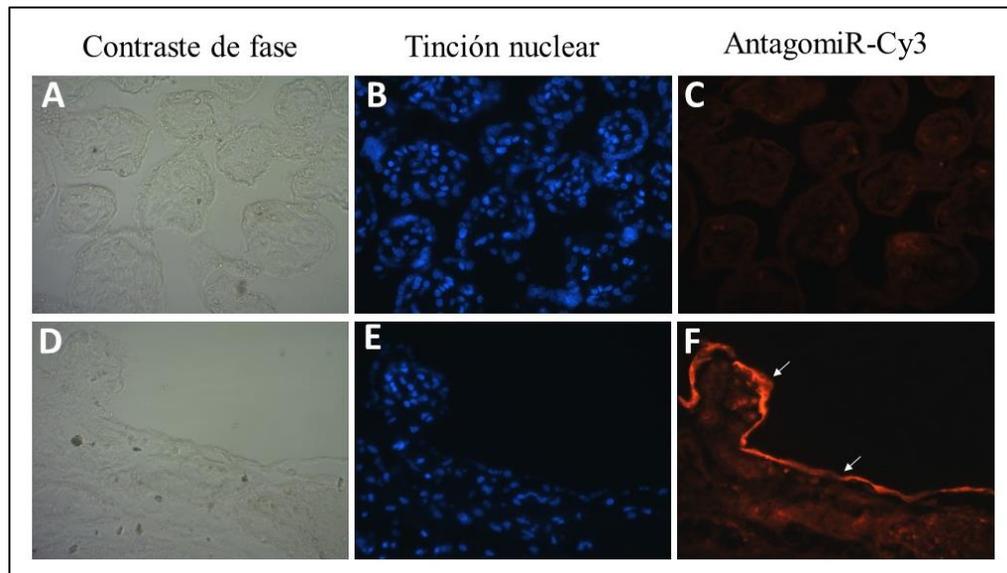


Figura 9 HPEs se transfectan efectivamente con AntagomiR-Cy3: HPE sin transfectar se utilizaron como control negativo del AntagomiR-Cy3 (A, B, C), mientras que HPE fueron transfectados con con el AntagomiR-Cy3 (100nM) durante 24 horas (D, E, F). Las muestras se procesaron con técnicas histológicas de rutina y los núcleos se tiñeron con DAPI. Barra de aumento 20 μ m.

miR-19b-2-5p modula la carga de DNA de *T. cruzi* en HPE

HPEs fueron transfectados con 100 nM de antagonomiR miR-19b-2-5p (A-19b), mimic (M-19b), y sus respectivos *scrambles* (AS o MS) como descrito más arriba (**figura 10**). Sólo la transfección con M-19b aumenta significativamente ($288,7 \pm 15,3\%$ ($p \leq 0.0001$)) los niveles de miR-19b-2-5p en HPE. Como se esperaba, la transfección con los respectivos *scrambles* no afectó significativamente los niveles de miR-19b-2-5p. Interesantemente, la inhibición de miR-19b-2-5p tampoco alteró la expresión del miRNA

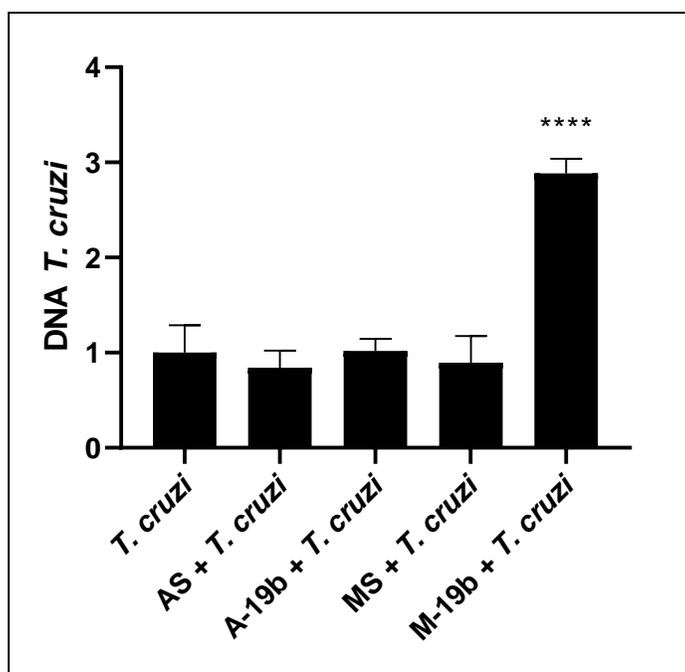


Figura 10 El aumento de la expresión de miR-19b-2-5p aumenta la carga de DNA parasitario en HPE: HPE fueron transfectados con 200nM de antagonomiR o mimic miR19b y sus respectivos *scrambles* por 24 horas, posteriormente fueron infectados con tripomastigotes de *T. cruzi* (10^5 parasitos/ml) durante 2 horas. La presencia del DNA parasitario fue determinada mediante qPCR. Todos los valores se expresan como la media \pm SD, los datos se normalizaron en función de los valores del control y se analizaron mediante ANOVA de una vía y post-test de Dunnet. **** $p \leq 0.0001$. AntagonomiR Scrambled (AS), AntagonomiR-19b-2-5p (A19b), Mimic Scrambled (MS), Mimic-19b-2-5p (M19b).

DISCUSIÓN

Las interacciones hospedero-patógeno son complejas y determinan la probabilidad de infección, los mecanismos de invasión en células y tejidos así como las respuestas y los efectos en el hospedero. En caso de *T. cruzi*, el parásito cuenta con diversos mecanismos de virulencia que facilitan la invasión, mientras que los organismos infectados reaccionan activando distintas medidas de defensa (Kemmerling *et al.*, 2019). La placenta es un órgano determinante para la probabilidad de transmisión congénita, ya que en ella se localiza la única barrera que existe entre la sangre materna y la sangre fetal. Previamente se ha demostrado que *T. cruzi* causa diferentes alteraciones morfológicas en la placenta debido a sus enzimas proteolíticas como la cisteína-proteasa cruzipaina y la activación de proteasas endógenas, particularmente metaloproteinasas de la matriz (Duaso *et al.*, 2010, Castillo *et al.*, 2012). Sin embargo, la presencia del parásito estimula las defensas placentarias, aumenta la expresión de receptores tipo *Toll* (TLR.), particularmente de TLR-2, -4 y -9 y el consiguiente incremento de la secreción de citoquinas proinflamatorias e inmunomoduladoras (Castillo *et al.*, 2017a). La modulación de la secreción de citoquinas está mediada por las vías de transducción de señales NFκB, cuyas vías canónicas y no canónicas también son activadas por *T. cruzi* (Liempi *et al.*, 2019). Interesantemente, la infección *ex vivo* de *T. cruzi* en HPE está mediado por el TLR-2 y la inhibición de este receptor altera el recambio epitelial en el trofoblasto (Castillo *et al.*, 2017a; Castillo *et al.*, 2017b).

El recambio epitelial es considerado un mecanismo de protección contra agentes patógenos (Cliffe *et al.*, 2005; Kim *et al.*, 2010). Esto aplica también para el recambio epitelial del trofoblasto, ya que al momento de la infección los patógenos deben adherirse previamente a la capa superficial del epitelio, y al existir un constante recambio celular, las células se remueven constantemente y con ello también los patógenos adheridos (Chang *et al.*, 2013; Liempi *et al.*, 2016). El recambio epitelial es fisiológico, pero puede verse acelerado o disminuido por diferentes factores, entre ellos, infecciones que puede llevar a un aumento del recambio epitelial (Kim *et al.*, 2010, Liempi *et al.*, 2016). Así, *T. cruzi* induce un aumento en el recambio epitelial del trofoblasto (Liempi, *et al.*, 2016; Kemmerling *et al.*, 2019), induciendo proliferación celular (Droguett *et al.*, 2017), diferenciación celular (Liempi, 2014) y muerte celular tipo apoptosis (Duaso *et al.*, 2011). Por otra parte, la mantención del

trofoblasto es esencial durante todo el embarazo, ya que se requiere para el transporte de oxígeno y nutrientes, y la secreción de hormonas específicas necesarias para el desarrollo fetal, entre otros (Malassinè y Cronier, 2002).

Los diferentes procesos celulares, incluyendo la proliferación celular, diferenciación y apoptosis, involucrados en el recambio celular del trofoblasto implican una regulación muy compleja de la expresión génica. Los miRNAs constituyen una forma de regulación post-transcripcional de la expresión génica (Hayder *et al.*, 2018; Medina *et al.*, 2020). *T. cruzi* induce un perfil placenta-específico tanto de mRNA (Castillo *et al.*, 2018) como de miRNA (Medina *et al.*, 2020). El perfil de miRNAs inducido por *T. cruzi* es diferente a la inducida por *Toxoplasma gondii* (*T. gondii*) otro parásito protozoario que presenta tasas de transmisión congénita mucho más altas (Medina *et al.*, 2020). Esta diferencia en los perfiles de miRNAs podría explicar las diferencias de transmisión congénita observada entre ambos parásitos (Medina *et al.*, 2020).

Entre los miRNAs modulados por *T. cruzi* está miR-19b-2-5p, que es reprimido en durante la infección *ex vivo* de HPE. Este miRNA regula el recambio del trofoblasto al inhibir la expresión de su blanco directo hGCM1. El factor de transcripción hGCM1 promueve la expresión de sincitina y β -hCG, quienes regulan la diferenciación epitelial del trofoblasto y constituyen los principales marcadores de diferenciación de este tejido (Kumar *et al.*, 2013, Liempi 2014). Importantly, en presencia de *T. cruzi* se induce la expresión de ambas moléculas, probablemente como parte del recambio epitelial y consecuente mecanismo de defensa antiparasitario. El parásito también regula la expresión de otros miRNAs, involucrados en la diferenciación del trofoblasto. Así, aumenta la expresión de miR-512-3p y disminuye la de miR-515-5p. Ambos miRNAs son, a diferencia de miR-19b-2-5p, placenta-específicos (Medina - Guerrero *et al.*, 2022). En particular, miR-515-5p tiene mecanismos de acción muy similares a los del miRNA estudiado en la presente memoria. Por lo que la inhibición, que ocurre en presencia del parásito, de miR-515-5p y de miR-19b-2-5p promueve la diferenciación del trofoblasto y por ende la susceptibilidad a la infección. Aquí hemos estudiado el posible rol de miR-19b-2-5p en susceptibilidad a la infección en un modelo celular de trofoblasto, células BeWo y HPE. A pesar de lograr una transfección efectiva con agomiR y antagomiR en células BeWo, no se logró una transfección reproducible, efecto que se evidencia en las grandes desviaciones de la carga de DNA

parasitario medido en estas células. Se ha descrito que diversas líneas celulares cuentan con una serie de endonucleasas que degradan rápidamente los *mimics* y antagomirs sintéticos (Biochemical and Biophysical Research Communications 511 (2019) 422-426). Por el contrario, la transfección en HPE fue exitosa y reproducible. Además, se logró determinar mediante un antagomiR *off-target* acoplado con una molécula fluorescente (Cy3) que éstos se localizan preferentemente en el trofoblasto, que es el tejido que experimenta el recambio epitelial (Liempi, 2014). Adicionalmente, hemos comprobado que la transfección en HPE no causa daño tisular (Medina - Guerrero-Muñoz *et al.*, 2022).

Considerando que la disminución de la expresión de miRNA 19b-2-5p promueve la diferenciación celular del trofoblasto destinada a la mantención de la barrera anatómica (Liempi *et al.*, 2014, Liempi *et al.*, 2016), la presencia del *mimic* debiera aumentar la carga de DNA parasitaria *T. cruzi*, hecho que fue comprobado en la presente memoria. Contrariamente a lo esperado, una mayor inhibición de miR-19b-2-5p mediante antagomiR, no tuvo efecto sobre la carga de DNA. Probablemente este resultado se deba a que un miRNA puede regular la expresión de múltiples mRNAs, a la vez que un mRNA puede ser regulado por múltiples miRNA (Velu and Grimes, 2012). Por ejemplo, miR-512-3p, miR-515-5p (Medina *et al.*, 2020, Medina - Guerrero-Muñoz *et al.*, 2022) y miR-106a (Kumar 2013) están involucrados en la diferenciación celular del trofoblasto mediante la inhibición de hGCM-1 (Liempi, 2014). Finalmente, esto concuerda con la naturaleza compleja de la regulación de la expresión génica en general y las respuestas del hospedero ante la presencia de *T. cruzi* en particular.

CONCLUSIÓN

La susceptibilidad a la infección por *T. cruzi* en la placenta humana está mediada, al menos parcialmente, por miR-19b-2-5p.

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(15), e144-e144.
- **BRENNECKE, J.; STARK, A.; RUSSELL, R.; COHEN, S.M.** 2005. “Principles of MicroRNA-Target Recognition.” *PLoS Biology* 3 (3): 0404–18.
- **CASTILLO, C.; MUÑOZ, L.; DUASO, J.; GALANTI, N.; JAÑA, F.; FERRERIA, J.; CABRERA, G.; MAYA, J.D.; KEMMERLING, U.** 2012. “Role of matrix metalloproteinases 2 and 9 in ex vivo *Trypanosoma cruzi* infection of human placental chorionic villi.” 33(12):991-7
- **CASTILLO, C.; MUÑOZ, L.; CARRILLO, I.; LIEMPI, A.; GALLARDO, C.; GALANTI, N.; MAYA, J.; KEMMERLING, U.** 2017a. “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).
- **CASTILLO, C.; MUÑOZ, L.; CARRILLO, I.; LIEMPI, A.; MEDINA, L.; GALANTI, N.; KEMMERLING, U.** 2017b. Toll-like receptor-2 mediates local innate immune response against *Trypanosoma cruzi* in ex vivo infected human placental chorionic villi explants. *Placenta*, 60, 40-46.
- **CASTILLO, C.; CARRILLO, I.; LIBISCH, G.; JUIZ, N.; SCHIJMAN, A.; ROBELLO, C.; KEMMERLING, U.** 2018. Host-parasite interaction: changes in human placental gene expression induced by *Trypanosoma cruzi*. *Parasites & vectors*, 11(1), 1-13.
- **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.

- **CLIFFE, L.; HUMPHREYS, N.; LANE, T.; POTTEN, C.; BOOTH, C.; GRENCIS, R.** 2005. “Accelerated intestinal epithelial cell turnover: a new mechanism of parasite expulsion”. *Science*. Jun 3;308(5727):1463-5.
- **DALY, M.; O`DRISCOLL, L.** 2017. “Chapter 5 MicroRNA Profiling of Exosomes” 1509: 37–46.
- **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. *Mol Hum Reprod*. 18(8):417–24.
- **DROGUETT, D.; CARRILLO, I.; CASTILLO, C.; GÓMEZ, F.; NEGRETE, M.; LIEMPI, A.; KEMMERLING, U.** 2017. *Trypanosoma cruzi* induces cellular proliferation in the trophoblastic cell line BeWo. *Experimental Parasitology*, 173, 9-17.
- **DUASO, J.; ROJO, G.; JANA, F.; GALANTI, N.; CABRERA, G.; BOSCO, C.; KEMMERLING, U.** 2011. *Trypanosoma cruzi* induces apoptosis in ex vivo infected human chorionic villi. *Placenta*, 32(5), 356-361.
- **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 Negl Trop Dis*. 5(8):1-11.
- **HAYDER, H., O`BRIEN, J.; NADEEM, U.; PENG, C.** 2018. MicroRNAs: crucial regulators of placental development. *Reproduction*. 155(6):R259-R271.

- **HUPPERTZ, B.; GAUSTER, M.** 2011. Trophoblast fusion. *Advances in experimental medicine and biology* 713, 81–95.
- **JANEWAY, C. AND TRAVER, P.** 2004. *Immunobiology: The Immune System in Health and Disease*. Garland Science. 6ª edición. N Y. USA. pp. 264-275.
- **JUIZ, N. A.; SOLANA, M. E.; ACEVEDO, G. R.; BENATAR, A. F.; RAMIREZ, J. C.; DA COSTA, P. A.; SCHIJMAN, A. G.** 2017. Different genotypes of *Trypanosoma cruzi* produce distinctive placental environment genetic response in chronic experimental infection. *PLoS neglected tropical diseases*, 11(3), e0005436.
- **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 Placental, the Maternal and the Fetal/Neonatal Immune Responses. *Front Microbiol*. 10(1854):1-15.
- **KIM, M.; ASHIDA, H.; OGAWA, M.; YOSHIKAWA, Y.; MIMURO, H.; SASAKAWA, C.** 2010. “Bacterial interactions with the host epithelium”. *Cell Host Microbe*. 8(1):20–35.
- **KREDO-RUSSO S, HORNSTEIN E.** 2011. “MicroRNA knock down by cholesterolconjugated antisense oligos in mouse organ culture.” *Methods Mol Biol*. 732:89-97. doi: 10.1007/978-1-61779-083-6_7. PMID: 21431707.
- **KUMAR P, LUO Y, TUDELA C, ALEXANDER JM, MENDELSON CR.** The c-Myc-regulated microRNA-17~92 (miR-17~92) and miR-106a~363 clusters target hCYP19A1 and hGCM1 to inhibit human trophoblast differentiation. *Mol Cell Biol* 2013, 33(9):17821796

- **LIEMPI, A.** 2014. Estudio del posible efecto antiparasitario de la placenta humana: *trypanosoma cruzi* y diferenciación celular en una línea celular de trofoblasto (BeWo). Memoria de título médica veterinaria. Santiago, Chile. U. Chile, Fac. Medicina Veterinaria.
- **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.
- **LIEMPI, A.; CASTILLO, C.; CERDA, M.; DROGUETT, D.; DUASO, J.; BARAHONA, K.; HERNANDEZ, A.; DIAZ-LUJAN, C.; FRETES, R.; HARTEL, S.; KEMMERLING, U.** 2015. *Trypanosoma cruzi* infectivity assessment in “in vitro” culture systems by automated cell counting. *Acta Tropica*. 143: 47-50.
- **LIEMPI, A.; CASTILLO, C.; CARRILLA, I.; MUÑOZ, L.; DROGUETT, D.; GALANTI, N.; MAYA, J. D.; KEMMERLING, U.** 2016. A local immune response against *Trypanosoma cruzi* in the human placental: The epithelial turnover of the trophoblast. *Microbial Pathogenesis*. 99:123-29.
- **LIEMPI, A.; CASTILLO, C.; MEDINA, L.; ROJAS, M.; MAYA, J.; PARRAGUEZ, V.; KEMMERLING, U.** 2019. Ex vivo infection of human placental explants with *Trypanosoma cruzi* and *Toxoplasma gondii*: Differential activation of NF kappa B signaling pathways. *Acta Tropica*. 199:105-108
- **MALASSINÉ, A.; CRONIER, L.** 2002. Hormones and Human Trophoblast Differentiation: A Review. *Endocrine*. 19(1):3–11
- **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.

- **MEDINA, L.; CASTILLO, C.; LIEMPI, A.; GUERRERO-MUÑOZ, J.; ROJASPIRELA, M.; MAYA, J. D.; PRUETO, H.; KEMMERLING, U.** 2020. *Trypanosoma cruzi* and *Toxoplasma gondii* Induce a Differential MicroRNA Profile in Human Placental Explants. *Front Immunol.* 11:1-14. **MEDINA, L.; GUERRERO-MUÑOZ, J.; LIEMPI, A.; CASTILLO, C.; ORTEGA, Y.; SEPÚLVEDA, A.; SALOMÓ, F.; MAYA, J.; KEMMERLING, U.** 2022. Ex Vivo Infection of Human Placental Explants by *Trypanosoma cruzi* Reveals a microRNA Profile Similar to That Seen in Trophoblast Differentiation. *Pathogens*, 11(3), 361.

- **O'BRIEN, J.; HADYER, H.; ZAYED, Y.; PENG, C.** 2018. Overview of MicroRNA Biogenesis, Mechanisms of Actions, and Circulation. *Front Endocrinol.* 9:1-12.

- **PÉREZ-MOLINA, J.A.; MOLINA, I.** 2018. Chagas disease. *Lancet.* 391 (10115):82-94.

- **PFAFFL, M.** 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic acids research*, 29(9), e45-e45.

- **PRATA, A.** 2001. "Clinical and Epidemiological Aspects of Chagas Disease." *The Lancet. Infectious Diseases* 1 (2): 92-100.

- **RASSI, A.; RASSI, A.; MARIN-NETO, J.A.** 2010. Chagas disease. *Lancet.* 375(9723):1388-1402.

- **SADOVSKY, Y.; MOUILLET, J.F.; OUYANG, Y.; BAYER, A.; COYNE, C.B.** 2015. The Function of Trophomirs and Other Micrnas in the Human Placenta. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 5(8):1-16

- **SAVAGE, D.C.; SIEGEL, J.E.; SNELLEN, J.E; WHITT, D.D.** 1981. Transit Time of Epithelial Cells in the Small Intestines of Germree Mice and Ex-Germree Mice Associated with Indigenous Microorganisms. *Appl Environ Microbiol.* 42(4):996-1001.

- **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.
- **WHO.** 2010. First WHO report on neglected tropical diseases: working to overcome the global impact of neglected tropical diseases. [en línea]. <[untitled \(who.int\)](#)> [consulta: 19-01-2022].
- **YOSHIDA, N.** 2006. Molecular Basis of Mammalian Cell Invasion by *Trypanosoma cruzi*. *An Acad Bras Cienc.* 78(1):87–111.
- **ZHANG, Y.-C.; 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
- **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
- **ZUMA, A.; DOS SANTOS, E.; DE SOUZA, W.;** 2020. “Basic Cell Biology of *Trypanosoma cruzi*” *Curr Pharm Des.* 26(14)

ANEXOS

Anexo 1



CONSENTIMIENTO INFORMADO



MECANISMOS DE ENFERMEDAD DE CHAGAS CONGÉNITA: La infección placentaria efectiva por *Trypanosoma cruzi* depende de microRNAs específicos del hospedero.

Nombre del Investigador principal: **Dra. Ulrike Kemmerling**
Institución: **Instituto de Ciencias Biomédicas, Facultad de Medicina, Universidad de Chile**
Teléfonos: **9786261, 9789692, 9786071**

La estamos invitando a participar en el proyecto de investigación "Mechanism of Congenital Chagas disease: Effective *Trypanosoma cruzi* placental infection 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).

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 mujeres, Departamento de Obstetricia y Ginecología, Hospital San José, Servicio de Salud Metropolitano Norte

Procedimientos: Si Ud. acepta participar donará la placenta que se obtendrá al final de su embarazo durante el parto. La placenta 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. No se guardarán muestras para estudios posteriores y las placentas serán desechadas según el protocolo para eliminación de material biológico de la "Unidad de Prevención de Riesgos" de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile. El laboratorio cuenta con la certificación de bioseguridad requerida.

Se usarán solamente placentas de madres y recién nacidos sanos.

Riesgos: La donación de la placenta **no constituye riesgo alguno para Usted o su bebé**, 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 efectuarán con la placenta se realizarán posterior e independientemente 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. Sin embargo, no hay beneficios para la madre ni para el niño por la participación en el estudio.

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

Confidencialidad: Toda la información derivada de su participación en este estudio será tratada con estricta privacidad, 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. Adicionalmente, Usted puede rehusar participar y que puede cambiar de opinión después que ha aceptado donar la placenta, sin que eso afecte la calidad de la atención que reciban la madre y el niño.

Complicaciones: La donación de la placenta no interfiere con la atención habitual de un parto normal o de un parto por cesárea.

Derechos del participante: Usted recibirá una copia íntegra y escrita de este documento firmado.

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

Investigador:

- Dra Ulrike Kemmerling, 29786261
- Dr. Juan Diego Maya 29786071
- Dr. Christian Castillo, 29789692
- Dr. Claudio Olea-Azar. 29782844

Autoridad de la Institución: Director del Instituto de Ciencias Biomédicas, Facultad de Medicina, Dr. Juan Diego Maya Arango. 29786071

Comité de Ética:

- Servicio de Salud Metropolitano Norte, 5758506
- Facultad de Medicina, Universidad de Chile, 9786189

Otros Derechos del participante

En caso de duda sobre sus derechos debe comunicarse con el "Comité de Ética de la Investigación" del Servicio de Salud Metropolitano Norte, 225758506, cuya oficina se encuentra ubicada en la Calle San José 1053, Comuna de Independencia.

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 "Mechanism of Congenital Chagas disease: Effective *Trypanosoma cruzi* placental infection depends on specific host-derived microRNAs" (MECANISMOS DE ENFERMEDAD DE CHAGAS CONGÉNITA: La infección placentaria efectiva por *Trypanosoma cruzi* depende de microRNA específicos del hospedero)

_____ Nombre del Participante	_____ Firma	_____ Fecha
_____ Nombre del informante	_____ Firma	_____ Fecha
_____ Nombre del investigador	_____ Firma	_____ Fecha
_____ Nombre del Director del Hospital	_____ Firma	_____ Fecha

Este formulario de "Consentimiento informado" se firmará en triplicado para que las donantes, el investigador responsable y Comité de Ética tengan las copias correspondientes.

Anexo 2



Unidad de Prevención de Riesgos & Bioseguridad

Santiago, 04 de Marzo 2019.-

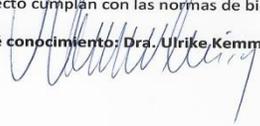
Señores
Fondecyt Regular 2019
PRESENTE

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

Anexo 3



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

