

# UNIVERSIDAD DE CHILE

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACEUTICAS



## **“Rol de miR-512-3p en la diferenciación celular y apoptosis del trofoblasto inducido por *Trypanosoma cruzi* en un modelo de infección *ex vivo* de explantes de placenta humana”**

Tesis presentada a la universidad de Chile para optar al grado de  
Magister en Bioquímica área de Especialización en Bioquímica Clínica  
Aplicada y Memoria para optar al Título de Bioquímico por:

**Jesús Alejandro Ignacio Guerrero Muñoz**

**Directoras de Tesis:**

DIRECTORA: Dra. Ulrike Kemmerling Weiss

CO-DIRECTORA: Dra. Daniela Seelenfreund Hirsch

Laboratorio de Mecanismos de Infección Parasitaria

**Santiago-CHILE**

**2022**

**UNIVERSIDAD DE CHILE**  
**FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS**

**INFORME DE APROBACIÓN DE TESIS DE MAGÍSTER**

Se informa a la Dirección de la Escuela de Graduados de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas que la Tesis de Magíster y Memoria de Título presentada por el candidato

**JESÚS ALEJANDRO IGNACIO GUERRERO MUÑOZ**

Ha sido aprobada por la Comisión de Evaluadora de Tesis como requisito para optar al grado de Magíster en Bioquímica, Área de Especialización: Bioquímica Clínica Aplicada y Título de Bioquímica, en el examen público rendido el día \_\_\_\_\_

**Directora de Tesis:**

**Dra. Ulrike Kemmerling** \_\_\_\_\_

**Co-directora de Tesis:**

**Dra. Daniela Seelenfreund** \_\_\_\_\_

**Comisión Evaluadora de Tesis:**

**Dra. Jenny Fiedler** \_\_\_\_\_

**Dr. Alfonso Paredes** \_\_\_\_\_

**Dr. Aldo Solari** \_\_\_\_\_

*“University is easy. It’s like riding a bike... if the bike was on fire... and the ground was on fire... and everything was on fire because you’re in Hell”.*

**Gus Dekkers**

## ÍNDICE GENERAL

ABREVIATURAS .....	vii
ÍNDICE DE FIGURAS.....	xi
ÍNDICE DE TABLAS .....	xii
FINANCIAMIENTO .....	xiii
ACTIVIDADES DERIVADAS DE LA TESIS.....	xiv
Publicaciones originadas con esta tesis .....	xiv
Publicaciones durante el periodo de tesis .....	xiv
Presentaciones a Congresos, Jornadas o reuniones científicas .....	xv
RESUMEN.....	xvi
ABSTRACT.....	xviii
1. INTRODUCCIÓN .....	1
1.1. Enfermedad de Chagas .....	1
Epidemiología.....	1
<i>Trypanosoma cruzi</i> .....	2
Manifestaciones clínicas de la enfermedad de Chagas .....	5
Tratamiento .....	6
1.2. Enfermedad de Chagas Congénita.....	6
El parásito .....	7
Respuesta inmune materna y del feto/recién nacido.....	8
Placenta .....	8
Trofoblasto y recambio epitelial como mecanismo de defensa contra <i>T. cruzi</i> .....	9
Proliferación celular.....	12
Diferenciación celular .....	12
Muerte celular tipo apoptosis.....	13
1.3. Regulación de la expresión génica mediante miRNAs .....	14
1.4. miRNAs en placenta .....	17
MiR-512-3p.....	19
2. PLANTEAMIENTO DE LA HIPÓTESIS Y OBJETIVOS .....	21
2.1. Objetivo General.....	21
2.2. Objetivos específicos:.....	22

2.2.1.	Determinar los niveles de expresión y localización de miR-512-3p en HPE en respuesta a la infección con <i>T. cruzi</i> .....	22
2.2.2.	Estudiar el efecto de miR-512-3p inducido por <i>T. cruzi</i> en HPE sobre la diferenciación celular y apoptosis en el trofoblasto. ....	22
2.2.3.	Determinar el posible rol de miR-512-3p en la probabilidad de infección de <i>T. cruzi</i> en HPE. ....	22
3.	MATERIALES Y MÉTODOS .....	23
3.1.	Reactivos y sistemas comerciales .....	23
3.1.1	Reactivos.....	23
3.1.2	Sistemas comerciales.....	24
3.2.	Cultivo de células VERO.....	25
3.3.	Obtención de tripomastigotes de <i>T. cruzi</i> .....	25
3.4.	Obtención y cultivo de HPE .....	26
3.4.1.	Obtención de placentas.....	26
3.4.2.	Obtención y procesamiento de HPE.....	26
3.4.3.	Infección <i>ex vivo</i> de HPE.....	27
3.5.	Sobreexpresión e inhibición de miR-512-3p en HPE .....	27
3.6.	Cuantificación de miRNAs y mRNAs .....	28
3.6.1.	Extracción de miRNA y mRNA .....	28
3.7.	Cuantificación de la enzima lactato deshidrogenasa (LDH).....	30
3.8.	Métodos histológicos .....	31
3.9.	Localización miR-512-3p en HPE .....	31
3.10.	Ensayo TUNEL.....	32
3.11.	Actividad enzimática de caspasas.....	33
3.12.	Determinación de la diferenciación celular por detección de $\beta$ -hCG ..	34
3.13.	Amplificación de DNA por qPCR .....	34
3.14.	Análisis estadístico .....	35
3.15.	Bioseguridad.....	36
3.16.	Ética .....	36
4.	RESULTADOS .....	37
4.1.	Resultados del Objetivo N°1 .....	37
4.1.1.	<i>T. cruzi</i> incrementa la expresión de miR-512-3p durante la infección <i>ex vivo</i> de HPE.....	37
4.2.	Resultados del Objetivo N° 2.....	39

4.2.1.	HPE se transfectan efectivamente con antagomiR y mimic de miR-512-3p .....	39
4.2.2.	Los niveles de mRNA de c-FLIP son regulados por miR-512-3p, pero no son modificados por <i>T. cruzi</i> .....	42
4.2.3.	miR-512-3p regula los niveles de transcrito de hGCM-1, pero no previene el aumento inducido por <i>T. cruzi</i> .....	43
4.2.4.	miR-512-3p regula el incremento de hCG inducido por <i>T. cruzi</i> .....	44
4.2.5.	miR-512-3p impide el aumento en la actividad enzimática de las caspasas 3 y 8 inducidas por <i>T. cruzi</i> .....	47
4.2.6.	miR-512-3p regula la fragmentación de DNA, pero no impide la fragmentación de DNA inducida por <i>T. cruzi</i> .....	49
4.3.	Resultados del Objetivo N° 3.....	51
4.3.1.	miR-512-3p media la susceptibilidad a la infección con <i>T. cruzi</i> .....	51
5.	DISCUSION .....	53
5.1.	Contexto y generalidades .....	53
5.2.	MiR-512-3p es modulado por la infección con <i>T. cruzi</i> .....	54
5.3.	MiR-512-3p regula los niveles de transcrito de c-FLIP .....	56
5.4.	MiR-512-3p participa en la diferenciación del trofoblasto inducida por <i>T. cruzi</i> , al menos a nivel de transcritos de hGCM1 y hCG .....	56
5.5.	MiR-512-3p media la muerte celular tipo apoptosis inducida por <i>T. cruzi</i> , que se ve reflejado en la actividad de las caspasas 3 y 8 .....	58
5.6.	La susceptibilidad a la infección por <i>T. cruzi</i> es mediada, en parte por el miR-512-3p.....	59
6.	RESUMEN DE RESULTADOS Y CONCLUSIONES.....	61
7.	BIBLIOGRAFÍA .....	62
8.	ANEXOS .....	80
	Anexo 1. Consentimiento informado.....	80
	Anexo 2. Certificado requerimientos básicos de bioseguridad .....	83
	Anexo 3. Aprobación comité de ética .....	84

## ABREVIATURAS

A512	: AntagomiR-512-3p
AgNORs	: Regiones organizadoras nucleolares argirófilas (del inglés <i>Argiophilic Nucleolar Organizer Regions</i> )
AGO	: Argonauta
AS	: Del inglés <i>AntagomiR Scrambled</i>
BCA	: Ácido Bicinconínico (del inglés <i>BiCinchoninic Acid</i> )
β-hCG	: Subunidad β gonadotropina coriónica humana (del inglés <i>β-human Chorionic Gonadotropin</i> )
BLFC:	: Lamina basal del capilar fetal (del inglés <i>Basal Laminae of Fetal Capillaries</i> )
BLT	: Lamina basal del trofoblasto (del inglés <i>Basal Laminae of Trophoblast</i> )
BM	: Membrana basal (del inglés <i>Basal Membrane</i> )
C14MC	: Grupo de miRNAs en el cromosoma 14 (del inglés <i>Chromosome 14 MicroRNA Cluster</i> )
C19MC	: Grupo de miRNAs en el cromosoma 19 (del inglés <i>Chromosome 19 MicroRNA Cluster</i> )
CD	: Enfermedad de Chagas (del inglés <i>Chagas Disease</i> )
cDNA	: Ácido desoxirribonucleico complementario (del inglés <i>complementary Deoxyribonucleic Acid</i> )
c-FLIP	: Inhibidor celular proteico de FLICE (del inglés <i>celular FLICE Inhibitory Protein</i> )
CISH	: Hibridación <i>in situ</i> cromogénica (del inglés <i>Chromogenic In Situ Hybridization</i> )
CO <sub>2</sub>	: Dióxido de carbono

CT	: Citotrofoblasto
Cy3	: Cianina-3 (del inglés <i>Cyanine-3</i> )
DAPI	: 4,6-diamidino-2-fenilindol (del inglés <i>4,6-diamidino-2-phenylindole</i> )
DIG	: Digoxigenina
DNA	: Ácido desoxirribonucleico (del inglés <i>Deoxyribonucleic Acid</i> )
DTU	: Unidades discretas de tipificación (del inglés <i>Discrete Typing Units</i> )
ELISA	: Enzimoinmunoanálisis de adsorción (del inglés <i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i> )
FC	: Capilar fetal (del inglés <i>Fetal Capillar</i> )
FFPE	: Fijadas en formalina y embebidas en parafina (del inglés <i>Formalin-Fixed Paraffin-Embedded</i> )
FK	: Forskolina
hGAPDH	: Gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa humana (del inglés <i>human Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase</i> )
hGCM-1	: del inglés <i>human Glial Cell Missing-1</i>
HPE	: Explantes de placenta humana (del inglés <i>Human Placenta Explants</i> )
IVS	: Espacio intervilloso (del inglés <i>InterVillous Space</i> )
LDH	: Lactato deshidrogenasa
LNA	: Ácido nucleico bloqueado (del inglés <i>Locked Nucleic Acid</i> )
M512	: Mimic-512-3p
MAPK	: Proteína quinasa activada por mitógeno (del inglés <i>Mitogen-Activated Protein Kinase</i> )



miRISC	: Complejo de silenciamiento inducido por miRNA (del inglés <i>miRNA-Induced Silencing complex</i> )
miRNA	: micro-Ácido ribonucleico (del inglés <i>micro-Ribonucleic Acid</i> )
mRNA	: Ácido ribonucleico mensajero (del inglés <i>Messenger-Ribonucleic Acid</i> )
MS	: Del inglés <i>Mimic scrambled</i>
NaCl	: Cloruro de Sodio
NaHCO <sub>3</sub>	: Bicarbonato
OD	: Densidad óptica (del inglés <i>Optical Density</i> )
PBS	: Tampón fosfato salino (del inglés <i>Phosphate-Buffered Saline</i> )
PCNA	: Antígeno nuclear de proliferación celular (del inglés <i>Proliferating Cell Nuclear Antigen</i> )
PCR	: Reacción en cadena de la polimerasa (del inglés <i>Polymerase Chain Reaction</i> )
Pre-miRNA	: miRNA precursor
Pri-miRNA	: miRNA primario
qPCR	: Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (del inglés <i>quantitative Polymerase Chain Reaction</i> )
RNA	: Ácido ribonucleico (del inglés <i>Ribonucleic Acid</i> )
RNU6-1	: Del inglés <i>RNA, U6 Small Nuclear 1</i>
RPMI	: Del inglés <i>Medio Roswell Park Memorial Institute</i>
RT-qPCR	: Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa con transcripción inversa (del inglés <i>Reverse Transcriptase-quantitative Polymerase Chain Reaction</i> )
SFBI	: Suero Fetal Bovino inactivado

- siRNA : Ácido ribonucleico pequeño de interferencia (del inglés *small interfering Ribonucleic Acid*)
- snRNA : Ácido ribonucleico pequeño nuclear (del inglés *small nuclear Ribonucleic Acid*)
- ST : Sinciciotrofoblasto
- T. cruzi* : *Trypanosoma cruzi*
- TNF- $\alpha$  : Factor de necrosis tumoral alfa (del inglés *Tumoral Necrosis Factor-alpha*)
- Tris : Tris(hidroximetil)aminometano
- TUNEL : Marcado de final de corte de *dUTP* de *Terminal deoxinucleotidil transferasa* (del inglés *TdT dUTP Nick-End Labeling*)
- VS : Estroma vellosa (del inglés *Villous Stroma*)

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Ciclo biológico de <i>T. cruzi</i> (vía vectorial).....	4
Figura 2. Barrera placentaria humana .....	9
Figura 3. Recambio del trofoblasto como mecanismo de defensa ante <i>T. cruzi</i> .	11
Figura 5. Esquema de la hipótesis de trabajo propuesta para la tesis.....	22
Figura 6. <i>T. cruzi</i> incrementa la expresión de miR-512-3p durante la infección <i>ex vivo</i> de HPE .....	37
Figura 7. <i>T. cruzi</i> incrementa la expresión de miR-512-3p en el trofoblasto .....	38
Figura 8. HPE se transfectan efectivamente con antagomiR y mimic de miR-512-3p.....	40
Figura 9. HPE se transfectan efectivamente con antagomiR-Cy3 .....	41
Figura 10. Transfección de HPE no causa daño tisular .....	42
Figura 11. <i>T. cruzi</i> no altera los niveles de transcrito de c-FLIP .....	43
Figura 12. miR-512-3p no previene el aumento de hGCM-1 inducido por <i>T. cruzi</i> .....	44
Figura 13. miR-512-3p impide el aumento de hCG inducido por <i>T. cruzi</i> .....	45
Figura 14. <i>T. cruzi</i> no altera los niveles de hCG secretada durante la infección <i>ex vivo</i> .....	46
Figura 15. miR-512-3p impide el aumento en la actividad enzimática de las caspasas 8 y 3 inducida por <i>T. cruzi</i> durante la infección <i>ex vivo</i> de HPE .....	48
Figura 16. La sobreexpresión e inhibición de miR-512-3p no altera la fragmentación de DNA causada por <i>T. cruzi</i> .....	50
Figura 18. miR-512-3p media la susceptibilidad a la infección con <i>T. cruzi</i> .....	52

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Oligonucleótidos blancos usados como partidores para RT-qPCR para miRNA .....	30
Tabla 2. Oligonucleótidos usados como partidores para RT-qPCR para mRNA 30	
Tabla 3. Oligonucleótidos usados como partidores para qPCR específicos para DNA .....	35

## FINANCIAMIENTO

Este trabajo de investigación fue financiado a través de los siguientes proyectos:

- FONDECYT 1190341 “Mechanism of Congenital Chagas disease: Effective *Trypanosoma cruzi* placental infection depends on specific host-derived microRNAs”, cuya investigadora responsable es la Dra. Ulrike Kemmerling.
- ERANet17/HLH-0142 COCHACO “Identification and validation of biomarkers to improve the control of congenital Chagas disease”, cuya investigadora responsable es la Dra. Ulrike Kemmerling.

## ACTIVIDADES DERIVADAS DE LA TESIS

### Publicaciones originadas con esta tesis

Medina, L.\*; **Guerrero-Muñoz, J. A\***, Liempi, A. I., Castillo, C., Ortega, Y., Sepúlveda, A., Salomó, F., Maya, J. D., & Kemmerling, U. (2022). **Ex Vivo Infection of Human Placental Explants by *Trypanosoma cruzi* Reveals a microRNA Profile Similar to That Seen in Trophoblast Differentiation.** *Pathogens*, 11(3), 361. <https://doi.org/10.3390/pathogens11030361>. \* Primeros autores

Rojas-Pirela, M., Andrade-Alviárez, D., Medina, L., Castillo, C., Liempi, A., **Guerrero-Muñoz, J.**, Ortega, Y., Maya, J. D., Rojas, V., Wilfredo, M., & Kemmerling, U. (2022). **MicroRNAs: master regulators in host–parasitic protist interactions.** *Open Biology*, 12(6), 210395. <http://doi.org/10.1098/rsob.210395>.

### Publicaciones durante el periodo de tesis

Medina, L., Castillo, C., Liempi, A., **Guerrero-Muñoz, J.**, Rojas-Pirela, M., Maya, J. D., Prieto, H., & Kemmerling, U. (2020). ***Trypanosoma cruzi* and *Toxoplasma gondii* Induce a Differential MicroRNA Profile in Human Placental Explants.** *Frontiers in Immunology*, 11(November), 1–14. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.595250>

Rojas-Pirela, M., Medina, L., Rojas, M. V., Liempi, A. I., Castillo, C., Pérez-Pérez, E., **Guerrero-Muñoz, J.**, Araneda, S., & Kemmerling, U. (2021). **Congenital Transmission of Apicomplexan Parasites: A Review.** *Frontiers in Microbiology*, 12(September), 1–21. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.751648>

## Presentaciones a Congresos, Jornadas o reuniones científicas

1. **Guerrero-Muñoz J.**, Medina, L., Castillo, C., Liempi, A., Ortega Y., Fernández, A., Rudolph, V., Hoffmann, P., & Kemmerling, U. ***Trypanosoma cruzi* induced trophoblast differentiation is mediated by miR-19b.** 9<sup>th</sup> Latin American Symposium on Maternal-Fetal Interaction and Placenta (IX SLIPM 2022). 4 al 6 de mayo de 2022. Digital.
2. Castillo, C., Osses, D., Fernández, A., **Guerrero-Muñoz, J.**, Liempi, A., Medina, L., & Kemmerling, U. ***Toxoplasma gondii* infection induces expression of S100A11 and HMGB1 in a placental cell line and human placental explants.** 9<sup>th</sup> Latin American Symposium on Maternal-Fetal Interaction and Placenta (IX SLIPM 2022). 4 al 6 de mayo de 2022. Digital.
3. Medina, L., **Guerrero-Muñoz, J.**, Castillo, C., Liempi A., Ortega, Y., & Kemmerling, U. ***Toxoplasma gondii* infection of human placental explants is mediated by miR-190b expression.** 9<sup>th</sup> Latin American Symposium on Maternal-Fetal Interaction and Placenta (IX SLIPM 2022). 4 al 6 de mayo de 2022. Digital.
4. **Guerrero-Muñoz, J.**, Medina, L., Liempi, A., Castillo, C., & Kemmerling, U. **Trophoblast differentiation and apoptosis induced by *Trypanosoma cruzi* infection is mediated by miR-512-3p.** International Federation of Placenta Associations (IFPA 2021). 30 de agosto al 2 de septiembre de 2021. Digital.
5. Medina, L., **Guerrero-Muñoz, J.**, Liempi, A., Castillo, C., Salomó, F., Sepúlveda, A., & Kemmerling, U. ***Trypanosoma cruzi*-induced trophoblast epithelial turnover is mediated by microRNA 515-5p.** International Federation of Placenta Associations (IFPA 2021). 30 de agosto al 2 de septiembre de 2021. Digital.
6. Medina, L., **Guerrero-Muñoz, J.**, Castillo, C., Liempi, A., Salomó, F., Sepúlveda, A., Maya, JD. & Kemmerling U. ***Trypanosoma cruzi*-induced trophoblast epithelial turnover is mediated by MicroRNA-515-5p.** 29th Annual Meeting of the German Society for Parasitology. 15 al 17 de marzo de 2021. Digital.

## RESUMEN

*Trypanosoma cruzi* es el agente causal de la enfermedad de Chagas, la que puede ser transmitida en forma congénita. Interesantemente, sólo un porcentaje menor de las madres infectadas transmiten el parásito a sus fetos, sugiriendo la existencia de factores de defensa placentarios locales. Se ha postulado que el recambio epitelial del trofoblasto podría ser uno de ellos. El recambio del trofoblasto implica una regulación precisa de la proliferación, diferenciación y muerte celular, requiriendo cambios en la expresión génica.

La expresión génica está regulada, entre otros, a nivel postranscripcional por miRNAs que reprimen mRNAs. El *cluster* C19MC es la región genómica más grande que codifica a miRNAs, es placenta-específica y codifica a miR-512-3p. Este miRNA regula la diferenciación y muerte celular en el trofoblasto mediante la represión del inhibidor de la caspasa 8 (c-FLIP). La caspasa 8 es una enzima fundamental tanto en la diferenciación como apoptosis del trofoblasto, es activada por *T. cruzi* y se relaciona con la susceptibilidad a la infección.

Considerando estos antecedentes, se propuso como **hipótesis** que “*La diferenciación celular y apoptosis inducida por T. cruzi en el trofoblasto es mediada por miR-512-3p vía represión del inhibidor de caspasa 8 c-FLIP. El aumento de la expresión de miR-512-3p disminuye la probabilidad de infección del parásito en explantes de placenta humana*”.

Los resultados demuestran que *T. cruzi* aumenta la expresión del miR-512-3p durante la infección *ex vivo* de explantes de placenta humana. A su vez este miRNA media la expresión de su mensajero blanco (c-FLIP), pero el parásito no altera los niveles del transcrito de c-FLIP. La diferenciación celular del trofoblasto inducido por *T. cruzi* está mediada parcialmente por miR-512-3p, dado que previene el aumento de la hormona gonadotrofina coriónica humana inducida por el parásito, pero no el del factor transcripcional *human Glial Cell Missing-1*. Por otra parte, miR-512-3p previene el aumento de la actividad de las caspasas 3 y 8 inducidas por *T. cruzi*, pero no la fragmentación del DNA. Además, miR-512-



3p media la susceptibilidad a la infección con *T. cruzi*. Se concluye que el recambio epitelial del trofoblasto inducido por *T. cruzi*, en particular la diferenciación y apoptosis del trofoblasto, está mediada al menos parcialmente, por el miR-512-3p, determinando la susceptibilidad a la infección *ex vivo* en explantes de placenta humana.

## ABSTRACT

### **Role of miR-512-3p in *Trypanosoma cruzi*-induced trophoblast cell differentiation and apoptosis in an *ex vivo* infection model of human placental explants.**

*Trypanosoma cruzi* is the causative agent of Chagas disease, which can be transmitted congenitally. Interestingly, only a small percentage of infected mothers transmit the parasite to their children, suggesting the presence of local placental defense mechanisms. It has been postulated that the epithelial turnover of the trophoblast is one of these. The trophoblast turnover implies a tight regulation of cellular proliferation, differentiation, and cell death, which require changes of gene expression.

Gene expression is regulated post-transcriptionally through miRNAs that repress mRNAs, among other mechanisms. The C19MC cluster is the largest genomic region that codifies miRNAs; these miRNAs are placenta-specific and include miR-512-3p. This miRNA regulates trophoblast turnover through repression of the caspase 8 inhibitor c-FLIP. Caspase 8 is a key enzyme involved in cellular differentiation and apoptotic cell death in the trophoblast and is activated by *T. cruzi*, and is related to the susceptibility of the placental to infection.

Therefore, we propose the following **hypothesis**: “*T. cruzi*-induced cellular differentiation and apoptosis in the trophoblast is mediated by miR-512-3p through repression of the caspase 8 inhibitor c-FLIP. The increased miR-512-3p expression decreases the probability of parasite infection in human placental explants”.

Our results show that *T. cruzi* increases miR-512-3p expression in *ex vivo* infection of human placental explants. MiR-512-3p mediates the expression of c-FLIP, but the parasite does not affect c-FLIP expression. Furthermore, miR-512-3p partially mediates *T. cruzi*-induced trophoblast differentiation, because it prevents the parasite-induced increase of human chorionic gonadotropin, but not the increase of transcriptional factor human glial cell missing-1. On the other hand, miR-512-3p prevents the *T. cruzi*-induced activity of caspases 3 and 8, but not DNA fragmentation. We conclude that the *T. cruzi*-induced trophoblast epithelial

turnover, particularly cellular differentiation and apoptosis, is mediated in part by miR-512-3p, determining the susceptibility to *ex vivo* infection of human placental explants.

# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1. Enfermedad de Chagas

La enfermedad de Chagas (CD por sus siglas en inglés), también conocida como Tripanosomiasis Americana, es causada por el protozoo parásito *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*) y es considerada por la Organización Mundial de la Salud como una enfermedad tropical desatendida (WHO, 2010; Rassi et al., 2012). 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). La CD es transmitida principalmente por insectos vectores de la familia de los triatominos; sin embargo, existen otros mecanismos de transmisión no vectoriales que incluyen la transfusión sanguínea, trasplante de órganos, transmisión oral, y la transmisión congénita (Rassi et al., 2012).

### **Epidemiología**

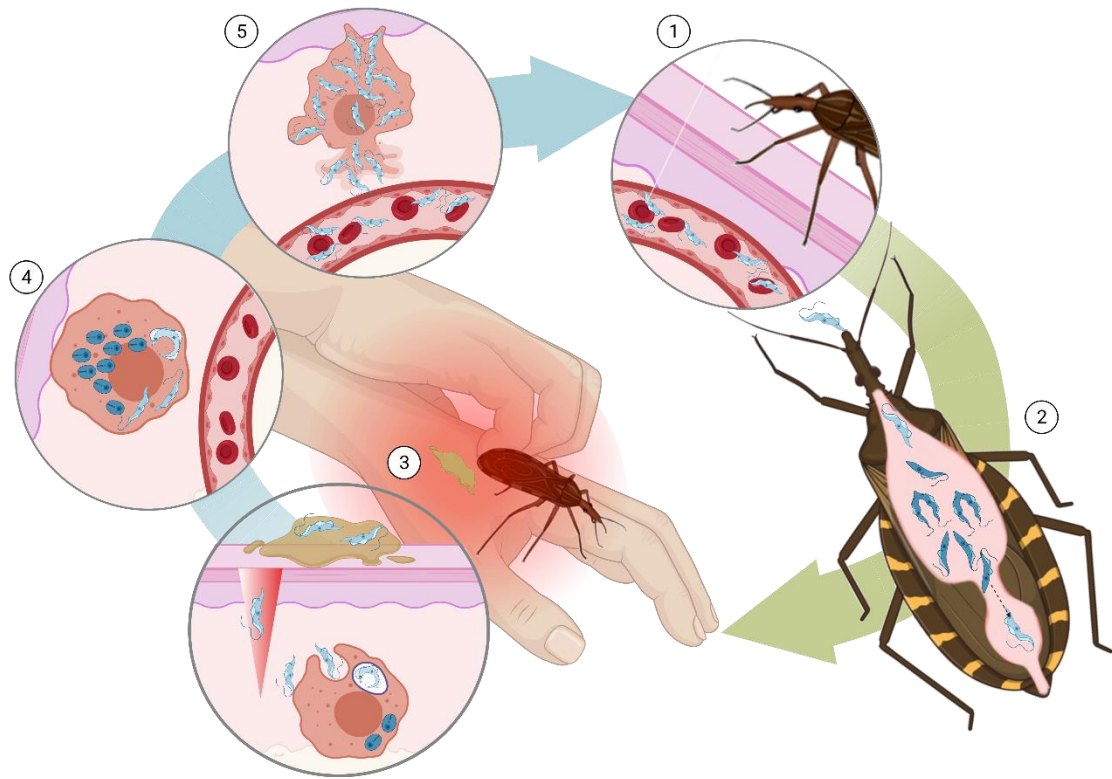
La CD es endémica en 21 países de Latinoamérica; se estima que aproximadamente 6 a 7 millones de personas están infectadas con *T. cruzi* y es responsable de 10.000 a 15.000 muertes anuales (WHO, 2015; De Oliveira et al., 2018; Kemmerling et al., 2019). En Chile, al año 2011, la tasa de incidencia de CD era de 11,1 por cada 100.000 habitantes. Según datos reportados por la Encuesta Nacional de Salud 2009-2010 en la población chilena menor a 15 años, la

infección por el parásito afecta al 0,7% de la población, con prevalencia de 1,5% en zonas rurales y 0,6% en zonas urbanas, teniendo una tasa de mortalidad cercana a 0,5 por cada 100.000 habitantes para el año 2013 (Ministerio de Salud, 2016). La carga económica mundial de CD se estima en alrededor de 7.200 millones de dólares al año, con un 15% de costos pertenecientes a países no endémicos. Debido a la migración de personas desde Latinoamérica, la CD se ha extendido hacia áreas no endémicas y se ha reportado en países como Canadá, Estados Unidos, Japón, Australia, Nueva Zelanda, Italia y España (Requena-Méndez et al., 2015; De Oliveira et al., 2018). Según estimaciones de la Organización Mundial de la Salud, 1.125.000 mujeres en edad fértil están infectadas con *T. cruzi* en Latinoamérica, con una incidencia de infección congénita de alrededor de 9.000 casos por año y cientos de casos en Estados Unidos y Europa (WHO, 2015). Adicionalmente, según la Organización Panamericana de la Salud, alrededor de un 25% de nuevos casos de CD es a causa de la transmisión congénita (Carlier & Truyens, 2015; Stillwaggon et al., 2018; Kemmerling et al., 2019).

### **Trypanosoma cruzi**

*T. cruzi* es un protozoo flagelado perteneciente al orden *Kinetoplastidae* y a la familia *Trypanosomatidae*, que presenta una gran diversidad genética, biológica y bioquímica. Las diferentes cepas del parásito se clasifican en siete unidades de tipificación discretas (DTUs, por sus siglas en inglés): TcI-TcVI y

Tcbat (Zingales, 2018), las que se correlacionan con la virulencia y tropismo tisular (Kemmerling et al., 2019). En el ciclo de vida de *T. cruzi* se reconocen cuatro formas celulares: el tripomastigote sanguíneo y amastigote se observan en mamíferos infectados, mientras que los epimastigotes y los tripomastigotes metacíclicos se encuentran en el insecto vector. En este ciclo biológico de *T. cruzi* (**Figura 1**) los tripomastigotes sanguíneos (forma extracelular no replicativa) presentes en el mamífero infectado son ingeridos por el insecto vector hematófago durante su alimentación. Los tripomastigotes se diferencian a epimastigotes en el tracto digestivo anterior del insecto y como tales se replican extracelularmente. Luego, en el tracto digestivo posterior los epimastigotes se diferencian a tripomastigotes metacíclicos, que son altamente infectivos y eliminados en las deyecciones del insecto vector. El ingreso del parásito al hospedero ocurre facilitado por las lesiones provocadas por rasguños en la zona de la picadura. Las primeras células que son invadidas por el parásito son células presentadoras de antígeno como los macrófagos. Intracelularmente, el tripomastigote se diferencia en amastigote y después de varias replications se diferencia a tripomastigote, que al lizar la célula invade células vecinas o es liberado a la circulación sanguínea mediante la cual llega a los órganos blancos como músculo esquelético y cardíaco, sistema nervioso y placenta. El ciclo se cierra cuando un insecto vector nuevamente ingiere sangre con los tripomastigotes sanguíneos y de esta manera se perpetúa la presencia del parásito (Souza, 2002; Barr, 2009; Rassi et al., 2010).



**Figura 1. Ciclo biológico de *T. cruzi* (vía vectorial).** (1) Picadura del vector e ingesta de sangre infectada con tripomastigotes sanguíneos desde un hospedero vertebrado (mamífero). (2) Tripomastigotes ingeridos se diferencian en el intestino del insecto a epimastigotes e inician el proceso de división celular; posteriormente estos se diferencian a tripomastigotes metacíclicos. (3) Las deyecciones del insecto vector contienen tripomastigotes metacíclicos que son depositados sobre la piel o mucosa e invaden las células del hospedero. (4) Los tripomastigotes se diferencian a amastigotes y se multiplican en el citoplasma para luego diferenciarse a tripomastigotes que (5) lisan la célula, llegan al torrente sanguíneo y se diseminan por todo el organismo. (Elaborado con BioRender.com por Ana Liempi).

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

La CD presenta dos fases clínicas, una aguda y otra crónica. La fase aguda es generalmente asintomática, aunque en caso de presentar síntomas éstos se manifiestan comúnmente como un cuadro febril autolimitante. Sin embargo, en la fase aguda se puede presentar una severa miocarditis, meningoencefalitis o ambas, que lleva a la muerte en el 5 a 10% de los casos. La fase crónica a su vez se divide en una fase crónica indeterminada y otra sintomática. La fase crónica indeterminada consiste en un período de infección latente, con una baja parasitemia, ausencia de síntomas clínicos y serología positiva, que puede durar un tiempo indefinido o progresar hacia la fase crónica sintomática, incluso 10-15 años post-infección (Prata, 2001). Aproximadamente un 30% de los pacientes progresan a la fase crónica sintomática, la cual se caracteriza por presentar cardiomiopatías asociadas a arritmias y disfunción cardíaca: También se pueden producir desórdenes de motilidad que afectan el esófago y el colon, manifestándose como megaesófago y megacolon, respectivamente (Rassi et al., 2010; Tustin & Bowman, 2016). En esta etapa los parásitos son difícilmente detectables en circulación (Rassi et al., 2010; Muñoz-Saravia et al., 2012).



## **Tratamiento**

El tratamiento actual de CD se basa en dos fármacos nitroheterocíclicos, nifurtimox y benznidazol. Ambos presentan efectos secundarios significativos que llevan a interrumpir el tratamiento. Además, el tratamiento con estos fármacos fracasa incluso durante una infección aguda, que es cuando la terapia con antiparasitarios es más efectiva, considerándose lejos de ser ideales. Adicionalmente son teratogénicos y por ende, no pueden ser utilizados durante el embarazo (Rojo et al., 2014; Sales et al., 2017).

### **1.2. Enfermedad de Chagas Congénita**

La transmisión madre-feto ocurre en un promedio del 5% de las madres infectadas, con una incidencia de 15.000 casos por año (Carlier et al., 2015). En regiones de Chile donde la enfermedad es endémica (norte y centro de Chile), la tasa de transmisión congénita varía entre 4,7 y 8,4% (Jercic et al., 2010; Apt et al., 2013).

La CD congénita se considera una infección aguda. Alrededor del 60% de los recién nacidos infectados congénitamente no presentan manifestaciones clínicas específicas, aunque presentan frecuentemente bajo peso al nacer y baja puntuación de Apgar. Además, hay una mayor probabilidad de partos prematuros y mortinatos en comparación a los recién nacidos no infectados. El resto de los recién nacidos infectados congénitamente pueden presentar manifestaciones

clínicas graves que pueden llevar rápidamente a la muerte (Carlier & Truyens, 2015; Kemmerling et al., 2019).

La infección congénita puede ocurrir en la fase aguda o crónica de la infección materna, repetirse en cada embarazo y observarse de una generación a otra. Por ende, constituye un gran problema de salud pública, el cual puede extenderse fácilmente no solo en el tiempo (durante el periodo fértil de la vida de una mujer), sino también en el espacio (globalización) a través de migraciones de mujeres fértiles infectadas (Carlier & Truyens, 2015).

Durante la transmisión congénita, el parásito atraviesa a la barrera placentaria para alcanzar al feto. Sólo un porcentaje de las madres infectadas transmiten el parásito a sus fetos. Este hecho indica que tanto la placenta como el sistema inmune de la madre y del feto en desarrollo pueden impedir la transmisión del *T. cruzi*. Por lo tanto, la transmisión congénita del parásito es producto de una interacción compleja entre el parásito, la respuesta inmune materna y del feto/recién nacido, y factores placentarios, siendo este último el menos estudiado (Liempi et al., 2016).

### **El parásito**

La transmisión congénita de *T. cruzi* se relaciona significativamente a la parasitemia de la madre. Así, en el caso de infección aguda, donde hay una alta parasitemia, la tasa de transmisión es alta (30 a 50%) en comparación a pacientes

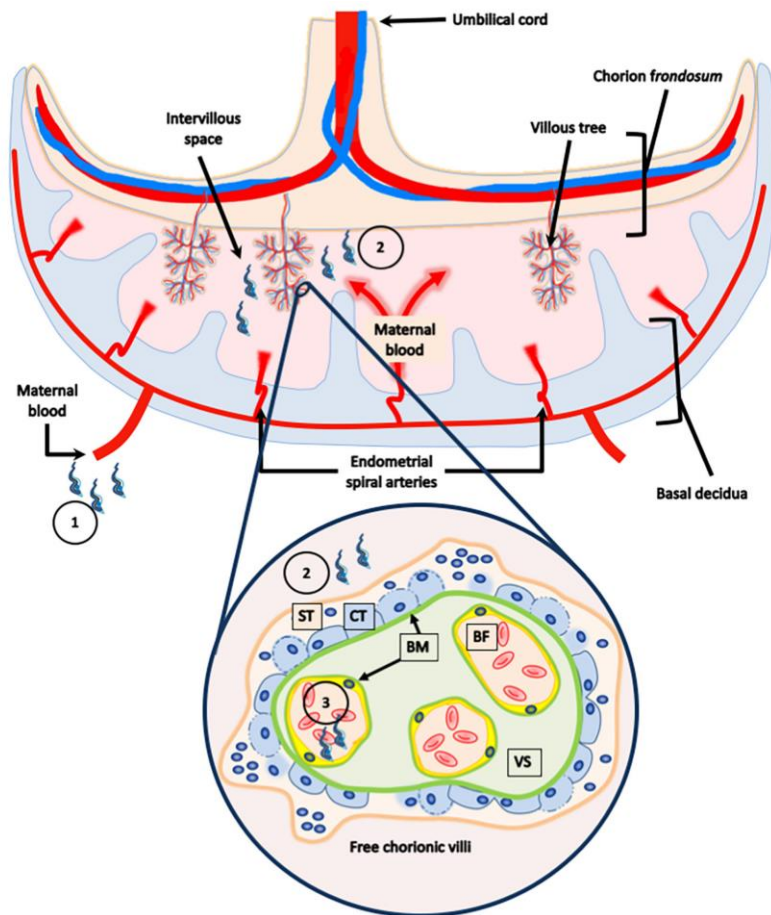
con infección crónica, donde la parasitemia y tasas de transmisión son bajas (1-21% aproximadamente) (Liempi et al., 2016). Se ha postulado, que el tipo de cepa también podría estar relacionado con la probabilidad de transmisión congénita. Así, las cepas correspondientes a DTUs II, V y VI predominan en niños infectados congénitamente (Bisio et al., 2011; Ortiz et al., 2012; Medina et al., 2018).

### **Respuesta inmune materna y del feto/recién nacido**

Durante el embarazo existe una condición inmunológica particular, ya que por una parte, se requiere tolerar el feto quien presenta antígenos paternos y por otra parte se generan respuestas inmunes innatas y adaptativas más eficientes contra patógenos. Estas respuestas inmunes particulares y específicas son a su vez moduladas por el sistema inmune fetal en desarrollo (Aghaeepour et al., 2017; Mor et al., 2017; Carlier et al., 2020). Es importante señalar que la placenta juega un rol relevante en la regulación de la respuesta inmune materna y fetal, e induce la defensa inmune innata local (Liempi et al., 2016; Arora et al., 2017; Mor et al., 2017).

### **Placenta**

Esta barrera placentaria debe ser atravesada por los distintos patógenos, incluido *T. cruzi*, para infectar al feto durante la transmisión congénita (**Figura 2**). El mantenimiento de la barrera placentaria está asegurado parcialmente por el recambio del trofoblasto (Kemmerling et al., 2010; Liempi et al., 2016).



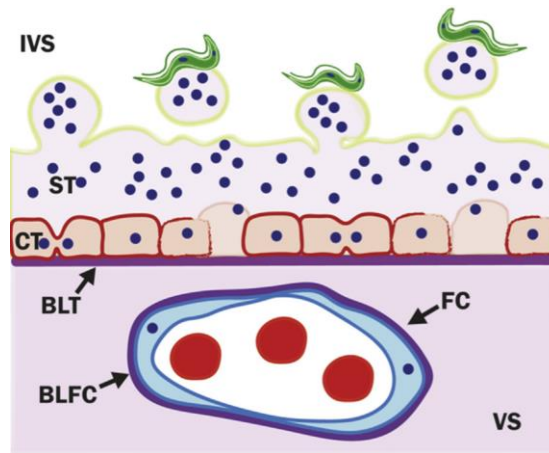
**Figura 2. Barrera placentaria humana.** Las unidades funcionales de la placenta son las vellosidades coriónicas que están formadas por el trofoblasto y capilares fetales (BF), separados del estroma vellosito (VS) por sus respectivas laminas basales (BM). La sangre materna rodea al trofoblasto y entra en contacto con él en el espacio intervilloso placentario. El trofoblasto está compuesto por el sinciotrofoblasto (ST), y el citotrofoblasto (CT). En la transmisión congénita, el parásito desde la sangre materna (1), entra en contacto con el trofoblasto en el espacio intervilloso (2), donde debe atravesar la barrera placentaria para llegar a los capilares fetales (3) e infectar al feto. (Figura tomada de Kemmerling et al., 2019).

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

El trofoblasto es el principal componente de la placenta y constituye el primer tejido de la barrera placentaria en contacto con la sangre materna. El

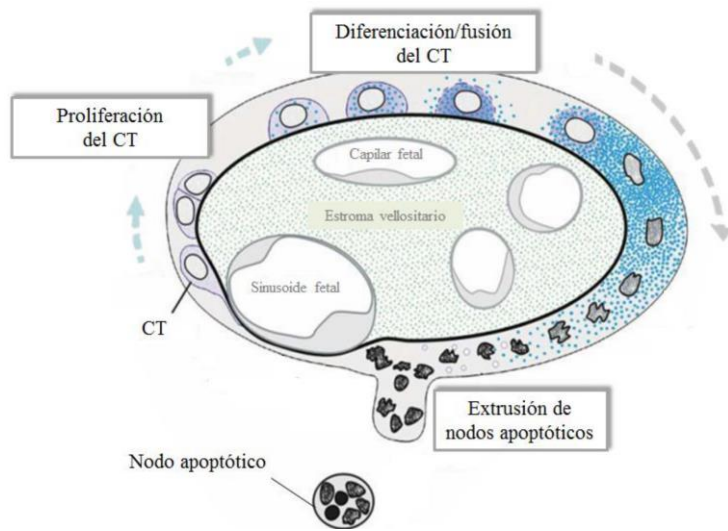
trofoblasto se origina en el blastocisto y se diferencia en dos subtipos: i) Trofoblasto extraveloso, que son células que invaden el endometrio materno y ii) Trofoblasto veloso formado por células que permanecen al interior de la placenta y que son parte de la barrera placentaria (Gauster & Huppertz, 2010; Kemmerling et al., 2010; Liempi et al., 2016).

El trofoblasto veloso es un epitelio bi-estratificado que se compone de dos capas celulares: el sinciotrofoblasto (ST) y el citotrofoblasto (CT). El CT posee altas propiedades proliferativas, mientras que el ST diferenciado pierde esta capacidad mitótica y no es capaz de proliferar. 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. Esta capa celular es un típico sincicio con membrana plasmática sólo en la parte basal y apical. Es generado y mantenido por medio de fusión sincicial por incorporación de células del CT (Huppertz & Gauster, 2011; Mayhew, 2014; Liempi et al., 2016). Se ha postulado que el trofoblasto, como epitelio de revestimiento, forma una barrera física para los patógenos (Liempi et al., 2014, 2016). Por otra parte, el recambio epitelial ha sido considerado parte del sistema inmune innato (**Figura 3**) debido al hecho de que los patógenos previa invasión celular, deben adherirse a la superficie celular. Como estas células son constantemente removidas, los patógenos asociadas a ellas también lo son (Janeway & Traver, 2004; Liempi et al., 2014).



**Figura 3. Recambio del trofoblasto como mecanismo de defensa ante *T. cruzi*.** Durante la transmisión congénita, los tripomastigotes (en verde) que circulan por el espacio intervelloso (IVS) deben atravesar la barrera placentaria. La barrera placentaria está formada por las dos capas del trofoblasto (citotrofoblasto (CT) y sinciotrofoblasto (ST)), el estroma vellosos (VS), los capilares fetales (FC) y las láminas basales que separan al VS del trofoblasto (BLT), así como a los endotelios fetales del VS (BLFC). En la transmisión congénita los parásitos, previa invasión celular, deben adherirse a las células. Dado que están en constante recambio, las células son removidas, y así también los parásitos asociados a éstas (Figura tomada de Liempi et al., 2016).

El recambio del trofoblasto implica una orquestación precisa de diferentes procesos celulares (**Figura 4**), entre los cuales se encuentra la **proliferación celular** del CT, la **diferenciación celular**, donde las células del CT se fusionan con el ST y por último la **muerte celular tipo apoptosis** (Huppertz & Gauster, 2011; Mayhew, 2014; Liempi et al., 2016). Es importante destacar que *T. cruzi* induce todos estos procesos celulares en el trofoblasto (Duaso et al., 2011; Liempi et al., 2014, 2016; Kemmerling et al., 2019).



**Figura 4. Procesos involucrados en el recambio del trofoblasto.** citotrofoblasto (CT). (Figura modificada de Benirschke et al., 2016).

Proliferación celular: sólo las células del CT son capaces de proliferar (Mayhew, 2014). En células BeWo (línea celular de trofoblasto) *T. cruzi* induce síntesis de DNA, incremento en el porcentaje de células en fase S y G2/M del ciclo celular, y la expresión de distintos marcadores de proliferación como AgNORs, PCNA y Ki67 (Droguett et al., 2017). En el caso de HPE, el parásito también incrementa la síntesis de DNA, así como el marcador de proliferación PCNA (Droguett et al., 2017).

Diferenciación celular: tanto el crecimiento, como la expansión y mantenimiento del sinciotrofoblasto durante el embarazo dependen principalmente de la incorporación continua de células del CT al ST, lo que implica que las células del CT se diferencian y fusionan con el ST (Huppertz & Gauster,

2011; Mayhew, 2014). En el laboratorio se ha demostrado que concentraciones bajas del parásito inducen la diferenciación del trofoblasto, lo que se ve reflejado en la inducción de la expresión de proteínas de la gonadotropina coriónica humana beta ( $\beta$ -hCG) y la sincitina (Liempi et al., 2014), que son considerados los principales marcadores bioquímicos de diferenciación del trofoblasto (Benirschke et al., 2006). Se ha relacionado la inducción de diferenciación del trofoblasto con la activación de la vía de transducción de señales MAPK (Forbes & Westwood, 2010), vía que es también modulada por el parásito (Castillo et al., 2013).

Muerte celular tipo apoptosis: la continua generación de nodos apoptóticos es parte del recambio normal del trofoblasto ya que compensa la incorporación continua de células CT al ST (Mayhew, 2014). La muerte celular tipo apoptosis y la diferenciación celular están estrechamente relacionadas en el trofoblasto. Así, la diferenciación y fusión celular de CT está regulada (entre otras) por caspasas que están involucradas en la muerte celular apoptótica (Carrillo et al., 2016; Liempi et al., 2016). En particular, la caspasa 8, una caspasa iniciadora de la vía extrínseca de la apoptosis, regula la diferenciación y fusión del trofoblasto. Se activa en las células CT altamente diferenciadas justo antes de la fusión y escolta el contenido de las células en fusión, incluido el núcleo, al ST. No se ha descrito caspasa 8 activada en las células CT en proliferación (Huppertz & Gauster, 2011; Pidoux et al., 2012). En HPE, *T. cruzi* induce muerte celular tipo apoptosis, la cual fue evidenciada mediante microscopía electrónica de transmisión, fragmentación



de DNA y detección de caspasa 8 activada (Duaso et al., 2011). Más aún, en células BeWo la inhibición de la caspasa 8 aumenta la infección de *T. cruzi*, medido por la cantidad de DNA del parásito y número de parásitos por células (Carrillo et al., 2016).

Todos estos procesos celulares implican un profundo cambio en la expresión génica del trofoblasto. Se ha demostrado previamente mediante análisis por *microarrays*, que el parásito induce profundos cambios en la expresión génica durante la infección *ex vivo* de HPE (Castillo et al., 2018).

La expresión génica está regulada por múltiples factores tanto a nivel transcripcional como postranscripcional (Ghedira, 2018). A nivel postranscripcional, los RNA pequeños no codificantes (incluyendo los microRNAs) son parte de estos mecanismos reguladores (Brennecke et al., 2005). Por otra parte, se ha descrito que la infección por *T. cruzi* altera la expresión de miRNAs en el hospedero (Zheng et al., 2013; Linhares-Lacerda et al., 2015; Navarro et al., 2015; Ferreira et al., 2017).

### **1.3. Regulación de la expresión génica mediante miRNAs**

Los RNAs pequeños no-codificantes y en particular los miRNAs tienen un rol relevante en la regulación de la expresión génica. Es importante destacar que los defectos genéticos y epigenéticos de los miRNAs y su maquinaria de procesamiento son fundamentales en la etiopatogenia de diversas enfermedades

(Esteller, 2011; Hayder et al., 2018). Los miRNAs regulan la expresión de más del 30% de genes fundamentales involucrados en procesos biológicos claves incluyendo el desarrollo embrionario, proliferación y diferenciación celular, muerte celular tipo apoptosis, metabolismo y respuesta inmune (Kim & Kim, 2007; Hayder et al., 2018). Los miRNAs reprimen a los mRNA de manera secuencia-específica mediante dos mecanismos: a) degradación del mRNA y b) inhibición de la traducción del mRNA (Vasudevan, 2012).

Los miRNAs son moléculas de RNA de una sola hebra con una longitud entre 18 y 22 nucleótidos. En humanos se han descrito más de 2500 miRNAs (Min & Chan, 2015). 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 (De Rie et al., 2017). Estos últimos son transcritos independientemente de los genes del hospedero, a través de sus propios promotores (Kim & Kim, 2007). 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). La biogénesis de los miRNAs ocurre principalmente a través de la vía canónica: en el núcleo se transcribe el miRNA primario (pri-miRNA), posteriormente es procesado por la ribonucleasa III Droscha a pre-miRNA, el cual es un precursor de doble hebra de 70 nucleótidos. El pre-miRNA es exportado hacia el citoplasma por la exportina 5 y es procesado por la endonucleasa Dicer. Este procesamiento involucra la remoción del *loop*

terminal, resultando en un miRNA *duplex* maduro. Ambas hebras (tanto 3' como 5') del miRNA *duplex* pueden ser cargadas en las proteínas de la familia Argonauta (AGO), dependiendo en parte de la estabilidad termodinámica de las hebras. Una vez cargada la proteína AGO con la hebra, se forma el complejo mínimo de silenciamiento inducido por miRNA (miRISC), el cual posteriormente reprimirá los mRNAs (Ha & Kim, 2014; O'Brien et al., 2018).

Los miRNAs prometen ser herramientas diagnósticas, pronósticas y terapéuticas para diferentes patologías, incluyendo neoplasias malignas (Bertoli et al., 2015; Zhang et al., 2015; Sun et al., 2018) e infecciones (Esteller, 2011; Auvinen, 2017; Daly & Driscoll, 2017), ya que poseen las siguientes características:

- (i) Los cambios en la expresión de miRNAs pueden ser detectados en fluidos biológicos debido a la estabilidad que le confiere el estar unido a micropartículas o proteínas de unión, que impiden su digestión por la RNasa del plasma (Zhang et al., 2015).
- (ii) La expresión de los miRNAs es tejido específica, expresándose sólo en un tipo de tejido y no en otro, como el caso del *cluster* C19MC en placenta (Lu et al., 2005; Sadovsky et al., 2015).

- (iii) Los miRNAs son estables en tejidos fijados en formalina y embebidos en parafina, lo cual permite su estudio mediante el uso de técnicas histológicas (Li et al., 2007).
- (iv) La expresión de los miRNAs puede ser modulada tanto en su biogénesis como en su mecanismo de acción (Anthiya et al., 2018).
- (v) Se han administrado miRNAs *in vivo* y no se han detectado efectos adversos significativos (Obad et al., 2011; Sadovsky et al., 2015). Más aún, en la actualidad existen diversos ensayos clínicos para el uso de miRNAs (Ottosen et al., 2015; Van Der Ree et al., 2016).

Cabe mencionar 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 una infección con *T. cruzi* sin interferencia de miRNAs propios del parásito.

#### **1.4. miRNAs en placenta**

Los miRNAs en placenta regulan tanto el desarrollo de la misma como sus procesos fisiológicos, incluyendo proliferación y diferenciación celular, apoptosis, migración, invasión, angiogénesis y la expresión de genes antioxidantes (Maccani et al., 2011; Lycoudi et al., 2015). Existen miRNAs placenta-específicos, algunos de ellos se expresan diferencialmente en las distintas etapas de desarrollo (Liang et al., 2007; Morales-Prieto et al., 2012).

En humano se ha descrito que la mayoría de los miRNAs asociados al embarazo se encuentran agrupados en tres “*clusters*”, el C19MC y el miR-371-3 en el cromosoma 19 y el C14MC en el cromosoma 14 (Morales-Prieto et al., 2013). El *cluster* C19MC representa uno de los *clusters* más grandes del genoma humano, comprende cerca del 8% de todos los genes de miRNAs humanos conocidos, y es expresado exclusivamente en la placenta y en células indiferenciadas. Este *cluster* tiene un tamaño aproximado de 100 kb y abarca 46 genes de miRNAs que producen 58 miRNAs maduros. Se localiza en el cromosoma 19q13.41 y se expresa únicamente en el alelo paterno, mientras que el alelo materno está silenciado epigenéticamente. C19MC se considera específico de primates y humanos y su expresión se limita al sistema reproductivo y particularmente a la placenta (Ambros, 2004; Lin et al., 2010; Donker et al., 2012). El trofoblasto es considerado como la fuente principal de miRNAs pertenecientes al C19MC (Luo et al., 2009). La expresión alterada de miRNAs de C19MC se ha asociado a patologías del embarazo como la preeclampsia, neoplasias malignas e infecciones (Hromadnikova et al., 2015; Sadovsky et al., 2015; Hayder et al., 2018).

## **MiR-512-3p**

Entre los miRNAs codificados por el *cluster* C19MC se encuentra el miR-512-3p que reprime el inhibidor de la caspasa 8 “*cellular FLICE-like inhibitory protein*” (c-FLIP). Por ende, aumenta la actividad de la caspasa 8, la que está asociada a los procesos de diferenciación y muerte celular durante el recambio epitelial del trofoblasto (Chen et al., 2010). Como se ha descrito más arriba, *T. cruzi* induce activación y actividad enzimática de esta enzima tanto en HPE como en células BeWo y se considera parte de los mecanismos antiparasitarios locales (Carrillo et al., 2016; Liempi et al., 2016; Kemmerling et al., 2019). Adicionalmente, trabajos previos del laboratorio demuestran que *T. cruzi* induce la expresión de este miRNA.

En esta tesis se plantea estudiar el posible rol de miR-512-3p durante la interacción placenta-*T. cruzi*. Se propone que, en respuesta a la infección con el parásito, en el tejido placentario se induce a miR-512-3p como mecanismo de defensa. Específicamente, miR-512-3p estaría involucrado en la diferenciación y muerte celular tipo apoptosis (mediados por caspasa 8) inducido por *T. cruzi*, que a su vez se asocian al recambio epitelial del trofoblasto.

El estudio de los miRNAs placentarios y modulados por el parásito permitirá tener un mayor conocimiento sobre la fisiopatología de la transmisión congénita

de *T. cruzi* e identificar posibles herramientas diagnósticas y terapéuticas de la CD congénita.

## 2. PLANTEAMIENTO DE LA HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Considerando: i) que la diferenciación celular y apoptosis inducida por *T. cruzi* en el trofoblasto son parte de los mecanismos de defensa anti-parasitarios de la placenta, ii) que estos procesos biológicos son mediados por miR-512-3p, y iii) que *T. cruzi* aumenta la expresión de miR-512-3p, se propone la siguiente hipótesis:

***“La diferenciación celular y apoptosis inducida por *T. cruzi* en el trofoblasto es mediada por miR-512-3p vía represión del inhibidor de caspasa 8 c-FLIP. El aumento de la expresión de miR-512-3p disminuye la probabilidad de infección del parásito en explantes de placenta humana”.***

### 2.1. Objetivo General

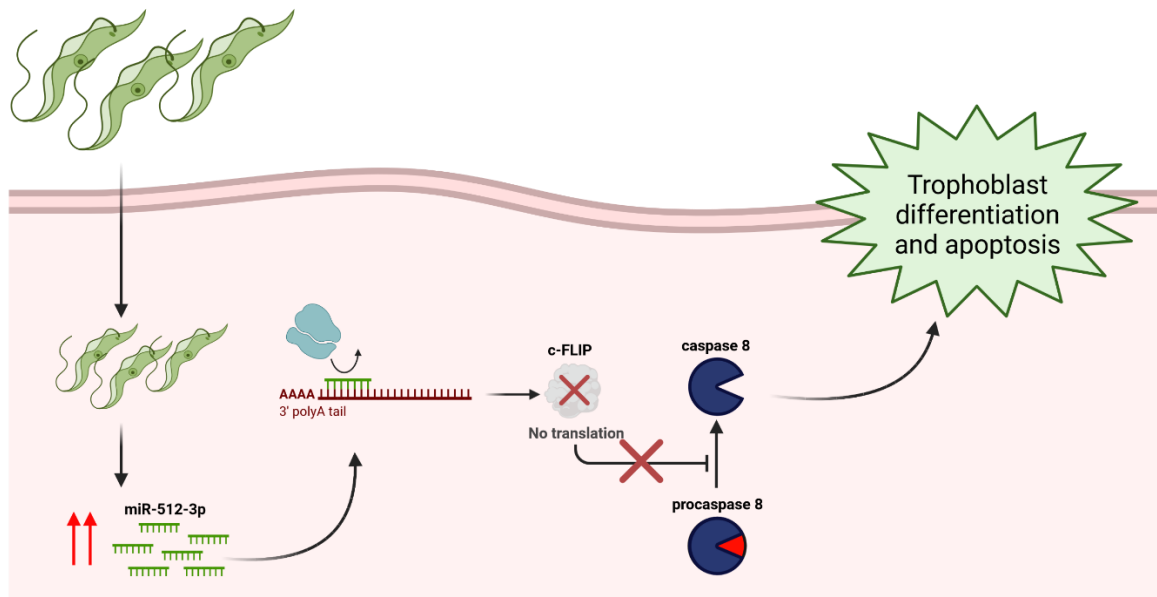
Estudiar el rol de miR-512-3p en la diferenciación celular y apoptosis del trofoblasto inducido por *T. cruzi*, así como en la probabilidad de infección en explantes de placenta humana.



## 2.2. Objetivos específicos:

1. Determinar los niveles de expresión y localización de miR-512-3p en HPE en respuesta a la infección con *T. cruzi*.
2. Estudiar el efecto de miR-512-3p inducido por *T. cruzi* en HPE sobre la diferenciación celular y apoptosis en el trofoblasto.
3. Determinar el posible rol de miR-512-3p en la probabilidad de infección de *T. cruzi* en HPE.

En la **Figura 5** se muestra un esquema de la hipótesis de trabajo propuesta.



**Figura 5. Esquema de la hipótesis de trabajo propuesta para la tesis.** La infección con *T. cruzi* aumenta los niveles del miR-512-3p en el trofoblasto, el cual reprime al mRNA de c-FLIP impidiendo su traducción, por consiguiente, lleva a un aumento en la actividad de la caspasa 8 produciendo un aumento en la diferenciación y apoptosis del trofoblasto.

### 3. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1. Reactivos y sistemas comerciales

##### 3.1.1 Reactivos

<b>Reactivo</b>	<b>Marca</b>	<b>Número de catálogo</b>
2-propanol	Chemix	67-63-0
4,6-diamino2-2fenilindol (DAPI)	Invitrogen™	10184322
Ácido etilendiaminotetraacético (EDTA)	Winkler	ED-0760
Agua libre de nucleasas	Sigma-Aldrich	7732-18-5
Albúmina de suero bovino (BSA)	Winkler	BM-0150
AntagomiR scrambled	Abm®	MNH00000
AntagomiR-512-3p	Abm®	MNH02850
AntagomiR-Cy3	Abm®	-
Anticuerpo de oveja anti-DIG-AP	Merck	11093274910
Bicarbonato de Sodio	Winkler	SO-1410
Celular Nuclear Fast Red	Vector Laboratories®	H-3403-500
Citrato de sodio tribásico dihidratado	Merck	6132-04-3
Cloruro de Potasio	Winkler	PO-1260
Cloruro de Sodio	Winkler	SO-1455
Dietilpirocarbonato (DEPC)	Winkler	BM-0650
Eosina A (amarillenta)	Merck	1.02439.2500
Etanol absoluto	Winkler	64-17-5
Ficoll® 400	Sigma-Aldrich	26873-85-8
Formaldehido 4%	Sigma-Aldrich	1.00496
Forskolina	Merck	66575-29-9
Hematoxilina en solución modificada según Gill II	Merck	1.05175.2500
hsa-miR-512-3p MiRCURY LNA miRNA Detection Probe	Qiagen®	YD00612202
Levamisol	Sigma-Aldrich	31742-250MG
Medio de montaje acuoso para fluorescencia Vectashield®	Vector Laboratories®	H-1000-10
Mimic scrambled	Abm®	MCH00000
Mimic-512-3p	Abm®	MCH02850

NBT-BCIP®	Sigma-Aldrich	11697471001
Parafina Surgipath Paraplast Plus	Leica	39601006
Polivinilpirrolidona (PVP)	Merck	9003-39-8
r-hTNF- $\alpha$	Roche	11371843001
RNA Later®	ThermoFisher	AM7021
RNAzol® RT	Sigma-Aldrich	R4533-100ML
Scramble-miR MiRCURY LNA miRNA Detection Probe	Qiagen®	YD00699004
Suero de oveja	Sigma-Aldrich	S2263-100ML
Suero fetal bovino inactivado	Sigma-Aldrich	F9665-500ML
Tampón fosfato salino 10x	Roche	11666789001
Tris	Winkler	BM-2000
Triton® X-100	Sigma-Aldrich	9002-93-1
Tween-20	Winkler	BM-2031
U6, hsa/mmu/rno MiRCURY LNA miRNA Detection Probe	Qiagen®	YD00699002
Urea	Winkler	UR-1655
Xilol	Winkler	XI-1670
yeast tRNA	Invitrogen™	AM7119

### 3.1.2 Sistemas comerciales

<b>Sistema comercial</b>	<b>Marca</b>	<b>Número de catálogo</b>
Quant-iT™ microRNA Assay kit	Molecular probes	Q32882
Qubit™ RNA HS Assay kit	Invitrogen™	Q32852
MystiCq microRNA cDNA Synthesis Mix	Sigma-Aldrich	MIRRT-100RXN
SuperScript IV First-Strand Synthesis System	Invitrogen™	18091050
SensiFAST™ SYBR® Hi-ROX kit	Bioline®	BIO-92005
LDH Cytotoxicity Detection Kit	Takara Bio Inc	MK401
DeadEnd™ Fluorometric TUNEL System®	Promega®	G3250
BCA Protein Assay kit®	Thermo Scientific™	23225
Caspase-Glo® 8 Assay System	Promega®	G8200
Caspase-Glo® 3/7 Assay System	Promega®	G8090
ELISA $\beta$ -hCG kit	Bioclone®	EIA-1911
Wizard Genomic DNA Purification kit	Promega®	A1120

En el laboratorio se ha estandarizado la infección *ex vivo* de explantes de placentas humanas (HPE) de término, un modelo ampliamente usado y establecido para estudiar mecanismos de infección placentarias y respuestas locales del tejido (Luján et al., 2004; Duaso et al., 2010; Kemmerling et al., 2010; Rojo et al., 2014; Liempi et al., 2016; Castillo et al., 2017a; Lowe et al., 2018;).

### **3.2. Cultivo de células VERO**

Las células VERO® (ATCC® CCL-81), provenientes de fibroblasto de riñón de mono verde africano, se cultivaron en frascos de cultivo celular de 75 cm<sup>2</sup> con medio de cultivo Rosswell Park Memorial Institute 1640 (RPMI 1640, Gibco®) suplementado con bicarbonato de sodio (NaHCO<sub>3</sub>) 2 mg/mL, estreptomicina 50 µg/mL, penicilina 50 UI/mL y enriquecido con suero fetal bovino inactivado (SFBi) al 5% a 37°C en un ambiente húmedo con 5% de CO<sub>2</sub>, reemplazando el medio cada 24 o 48 horas (Salas et al., 2008).

### **3.3. Obtención de tripomastigotes de *T. cruzi***

Se obtuvieron tripomastigotes de la cepa Y (Ypsilon) a partir de cultivos de células VERO® previamente infectadas. Las células se cultivaron como se describió en la sección 3.2; una vez en semi-confluencia se infectaron con 5 mL de medio con tripomastigotes provenientes de un cultivo anterior. Los parásitos invadieron las células y se replicaron intracelularmente como amastigotes, posterior a 72 horas los amastigotes se diferencian a tripomastigotes, lisan las

células y se liberan al sobrenadante. Los tripomastigotes se aislaron mediante una doble centrifugación a baja velocidad (500 x g durante 5 minutos) para separar las células en suspensión y los detritos celulares y a alta velocidad (3500 x g durante 10 minutos) a fin de obtener las formas infectivas de *T. cruzi* en el sedimento. Finalmente, se resuspendieron los tripomastigotes en medio RPMI 1640 y se contaron en una cámara de Neubauer (Duaso et al., 2010; Liempi et al., 2014).

### **3.4. Obtención y cultivo de HPE**

#### 3.4.1. Obtención de placentas

Se obtuvieron las placentas durante el alumbramiento de partos de término (mayor a 37 semanas de gestación), de embarazos monogestacionales y fetos con desarrollo normal, en cesáreas electivas realizadas en el Servicio de Obstetricia y Ginecología del Hospital San José, Servicio de Salud Metropolitano Norte, Santiago. Los criterios de exclusión fueron cualquier patología materna, fetal o placentaria. Las madres donadoras firmaron un consentimiento informado, elaborado según las regulaciones del comité de ética humana (**Anexo 1**).

#### 3.4.2. Obtención y procesamiento de HPE

Los explantes se obtuvieron de tejido placentario de la parte central de los cotiledones, por el lado materno. Por medio de disección se obtuvieron explantes de un tamaño aproximado de 0,5 cm<sup>3</sup>

aproximadamente, los cuales se lavaron al menos 3 veces con PBS, con el fin de remover la sangre presente en el tejido y luego se incubaron en medio RPMI 1640 suplementado con antibióticos y 5% SFBi (Liempi et al., 2014).

#### 3.4.3. Infección *ex vivo* de HPE

Los HPE se co-cultivaron en presencia de tripomastigotes de *T. cruzi* en una concentración de  $10^5$  parásitos/mL durante 2 o 48 horas en 1 mL de medio RPMI 1640 suplementado con 5% de SFBi. Para los ensayos de RT-qPCR los HPE se mantuvieron en solución RNA Later® a 4°C durante toda la noche y luego congelados a -20°C hasta su procesamiento (Duaso et al., 2010; Liempi et al., 2014). Los HPE destinados a la extracción de DNA se mantuvieron en etanol al 95% a -20°C hasta su procesamiento.

#### **3.5. Sobreexpresión e inhibición de miR-512-3p en HPE**

Los HPE se obtuvieron como se describió previamente y luego se transfectaron 50 o 100  $\eta$ M de un AntagomiR *off target* marcado en el extremo 5' con Cy3 (abm®) e incubados durante 24 horas a 37°C, para evaluar la capacidad del antagomiR en penetrar el HPE (Kredo-russo & Hornstein, 2011; Rebutini, 2017). Se analizó su localización mediante microscopía de fluorescencia, en un microscopio de epifluorescencia (Motic BA310; Hong Kong, China). Adicionalmente, los HPE se transfectaron con 200  $\eta$ M de mimic o antagomiR de miR-512-3p (Cat. No. MCH02850 abm® y Cat. No. MNH02850 abm®) y se

incubaron durante 24 horas a 37°C. Además, se utilizaron los controles negativos *scrambled* para el mimic (Cat. No. MCH00000 abm®) y para el antagomiR (Cat. No. MNH00000 abm®). Posterior a la transfección, los HPE se co-cultivaron con tripomastigotes de *T. cruzi* (10<sup>5</sup> parásitos/mL) durante 2 o 48 horas, en medio RPMI 1640 con o sin rojo fenol (para ensayos de viabilidad y ELISA) con 5% SFBi, antibióticos y CO<sub>2</sub> al 5% a 37 °C. Los HPE se mantuvieron en solución RNA Later® a 4°C durante toda la noche para extracción de miRNA y mRNA y luego se congelaron a -20°C hasta su procesamiento, mientras que los HPE destinados a la extracción de DNA se mantuvieron en etanol al 95% a -20°C hasta su procesamiento.

### **3.6. Cuantificación de miRNAs y mRNAs**

#### 3.6.1. Extracción de miRNA y mRNA

Los HPE se homogeneizaron en 1 mL de RNAzol® RT (Sigma-Aldrich) y se procesaron siguiendo el protocolo para aislamiento de fracciones separadas de miRNAs y mRNAs, según las indicaciones del fabricante. El producto de la extracción de miRNAs y mRNAs se almacenó a -80°C hasta su posterior análisis. Se midió la concentración de los miRNAs y mRNAs por fluorimetría con los sistemas Quant-iT™ microRNA Assay Kit (Molecular probes) y el Qubit™ RNA HS Assay Kit (Invitrogen™), respectivamente. Para la síntesis de cDNA a partir de miRNAs se usó el

sistema MystiCq microRNA cDNA Synthesis Mix (Sigma-Aldrich), mientras que para el mRNA se utilizó el sistema SuperScript IV First-Strand Synthesis System (Invitrogen™), siguiendo las instrucciones del fabricante.

### 3.6.2. Determinación de la expresión de miRNA y mRNA por RT-qPCR

Se determinó la expresión de miR-512-3p por RT-qPCR de dos colas. La amplificación de cDNA de miR-512-3p se realizó en un volumen de reacción de 25  $\mu$ L conteniendo 12,5  $\mu$ L de la mezcla 2X MystiCq microRNA SYBR Green qPCR Ready Mix, 0,5  $\mu$ L del partidor MystiCq Universal PCR Primer 10  $\mu$ M, 0,5  $\mu$ L del partidor Primer MystiCq microRNA qPCR Assay 10  $\mu$ M (**Tabla 1**), 10,5  $\mu$ L de agua libre de nucleasas, y 1 ng/ $\mu$ L de cDNA. La cuantificación del mRNA de c-FLIP, hGCM-1 y hCG se llevó a cabo en un volumen de reacción de 20  $\mu$ L conteniendo 5 ng/ $\mu$ L de mRNAs cDNA (producto de la transcripción inversa), 10  $\mu$ L del sistema comercial SensiFAST™ SYBR® Hi-ROX Kit (Bioline®), 1  $\mu$ L de cada partidor a 10 nM (**Tabla 2**) y 3  $\mu$ L de agua ultrapura libre de DNAsas. El programa de temperaturas utilizado en la qPCR consistió en una pre-incubación a 95°C durante 2 minutos, seguido de 40 ciclos de desnaturalización a 95°C durante 5 segundos y apareamiento a 60°C durante 30 segundos. Para finalizar se agregó una fase de disociación que correspondió a 95°C durante 15 segundos, 60°C durante 1 minuto, 95°C durante 15 segundos y por último



60°C durante 15 segundos. Se calculó la expresión relativa por el método de doble control comparativo  $\Delta\Delta C_t$  usando como gen *housekeeping* la expresión del snRNA U6 (RNU6-1) o hGAPDH para miRNAs y mRNAs, respectivamente (Pfaffl, 2001; Androvic et al., 2017).

**Tabla 1.** Oligonucleótidos blancos usados como partidores para RT-qPCR de miRNA

Partidores qPCR	Secuencia
miR-512-3p	5'-AAGUGCUGUCAUAGCUGAGGUC-3'
RNU6-1	5'-GUGCUCGCUUCGGCAGCACAUAUACUAAAAUUGGAA CGAUACAGAGAAGAUUAGCAUGGCCCCUGCGCAAGG AUGACACGCAAUUCGUGAAGCGUCCAUAUUUU-3'

**Tabla 2.** Oligonucleótidos usados como partidores para RT-qPCR de mRNA

Partidores qPCR	Partidor Forward	Partidor Reverse
c-FLIP	5'-CAGGAACCCTCACCTTGTT-3'	5'-CGGCCCATGTAATCCTTCAT-3'
hGCM1	5'-AAGCCCTAGAAAACAATCTC-3'	5'-AGGTTCCATGATAAGGTCAG-3'
hCG	5'-CCCCTTGACCTGTGATGACC-3'	5'-TATTGTGGGAGGATCGGGGT-3'
hGAPDH	5'-AACAGCGACACCCACTCCTC-3'	5'-GGAGGGGAGATTCAGTGTGGT-3'

### 3.7. Cuantificación de la enzima lactato deshidrogenasa (LDH)

Se recolectó el sobrenadante de los HPE controles y transfectados con antagomiR-Cy3, y las muestras se conservaron a -20°C hasta su procesamiento. Para la evaluación de la actividad de la LDH, se determinó con el sistema LDH Cytotoxicity Detection Kit (Cat# MK401, Takara Bio Inc.), siguiendo las instrucciones del fabricante. En resumen, las placas de 96 pocillos se incubaron 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 se normalizaron con respecto a los valores obtenidos en la condición control.

### **3.8. Métodos histológicos**

Los HPE se procesaron para métodos histológicos convencionales. Las muestras se fijaron durante toda la noche en formaldehído 4% preparado en un tampón fosfato pH 7,4. Posteriormente, se lavaron y deshidrataron en concentraciones crecientes de etanol, se aclararon en xilol e incluyeron en parafina fundida a 60°C (Bancroft & Gamble, 2008). Los tacos se cortaron en un micrótopo (Leitz 1512®) para obtener secciones de: i) 5 µm de espesor, los cuales se sometieron a tinción de Hematoxilina-Eosina para análisis histológico de rutina (Bancroft & Gamble, 2008; Duaso et al., 2010); ii) 5 µm de espesor, para localización de miR-512-3p mediante hibridación *in situ* cromogénica (CISH) (Nizyaeva et al., 2017; Dai & Cai, 2018); y iii) 2 µm de espesor, para los ensayos TUNEL.

### **3.9. Localización miR-512-3p en HPE**

Los HPE se procesaron para métodos histológicos convencionales. El miR-512-3p se detectó mediante CISH con digoxigenina (Dai & Cai, 2018; Nizyaeva et al., 2017) utilizando el sistema MiRCURY LNA miRNA Detection Probe con la sonda de detección específica 5'-DIG- y 3'-DIG hsa-miR-512-3p (YD00612202®).

La sonda de control LNA U6 snRNA con etiqueta de 5'-DIG (5'-DIG/CACGAATTTGCGTGTCATCCTT/-3') se utilizó como control positivo y la sonda de control de miRNA "scramble" LNA con etiqueta de 5'-DIG (YD00699004®) se utilizó como control negativo. Las sondas y el sistema comercial de optimización miRCURY LNA *kit* se utilizaron de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Qiagen®). Las secciones de tejido se contrastaron tiñendo su núcleo con Celular Nuclear Fast Red (Vector Laboratories®).

### **3.10. Ensayo TUNEL**

La visualización de la apoptosis se realizó mediante la técnica de TUNEL (TdT-mediated dUTP Nick-End Labeling). Las muestras previamente procesadas para técnicas histológicas se desparafinaron en xilol y se rehidrataron en concentraciones decrecientes de etanol, se sumergieron en una solución de cloruro de sodio al 0,85% durante 5 minutos y se lavaron con PBS durante 5 minutos, para luego ser sometidas a la técnica TUNEL utilizando el sistema comercial DeadEnd™ Fluometric TUNEL System® (Promega), de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Las secciones de tejido se contrastaron tiñendo los núcleos con DAPI 1 µg/mL (4,6-diamino2-2fenilindol, Molecular Probes®) durante 5 minutos, seguido de 3 lavados con PBS durante 5 minutos. Tanto las reacciones enzimáticas de la nucleotidil transferasa terminal, como la tinción DAPI se realizaron en ausencia de luz. Posteriormente se agregó una gota de medio de montaje acuoso para fluorescencia Vectashield® (Vector Laboratories) a cada

muestra y finalmente se analizaron en un microscopio de epifluorescencia BA310® (Motic). Las imágenes se capturaron con la cámara acoplada al microscopio Moticom 5® (Motic). La captura de imágenes se realizó al azar en cada condición experimental. Se utilizó el software ImageJ v.1.34 (National Institutes of Health, Bethesda, MD) para el análisis y la sobreposición de imágenes. Se obtuvo el índice apoptótico del recuento de núcleos positivos a la reacción TUNEL *versus* el número total de células.

### **3.11. Actividad enzimática de caspasas**

Los HPE se recolectaron y homogeneizaron en 500 µL de tampón de lisis (Tris 50 mM pH 7,5, NaCl 150 mM y Triton X-100 al 0,5%). Posteriormente el homogeneizado se agitó en frío durante 15 minutos y se centrifugó a 15.000 x g a 4°C durante 15 minutos (Castillo et al., 2013). Se recolectó el sobrenadante de las muestras y se determinó la concentración de proteínas mediante el sistema comercial BCA Protein Assay Kit® basado en el método del ácido bicinonínico (BCA), con albúmina de suero bovino como estándar (Salas et al., 2008). Se determinaron las actividades enzimáticas de caspasa 8 y caspasa 3 mediante los sistemas comerciales Caspase-Glo 8 (Promega®) y Caspase-Glo 3/7, (Promega®), respectivamente, siguiendo las instrucciones del fabricante. Estos ensayos se fundamentan en la luminiscencia producto del clivaje de sustratos luminogénicos específicos para cada una de estas enzimas (Ac-LETD-pNA para caspasa 8 y Ac-DEVD-pNA para caspasa 3). La luminiscencia se leyó con el lector

de microplacas Varioskan Flash Multimode (Thermo Scientific®). Los resultados se normalizaron con respecto a los  $\mu\text{g}$  de proteína total de cada muestra y respecto a la condición control.

### **3.12. Determinación de la diferenciación celular por detección de $\beta$ -hCG**

Se determinaron las concentraciones de  $\beta$ -hCG en los sobrenadantes de los HPE utilizando el sistema comercial ELISA  $\beta$ -hCG Kit (Bioclone®). Los sobrenadantes de los cultivos se recolectaron y se centrifugaron a  $3.000 \times g$  durante 5 minutos a  $4^\circ\text{C}$  para eliminar los desechos celulares. El sobrenadante se dispensó en placas de 96 pocillos recubiertas con anticuerpo anti-hCG y se incubó durante 5 minutos a temperatura ambiente (Komine-Aizawa et al., 2008). Después de la incubación, se lavó y se realizó el tratamiento con el anticuerpo secundario de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La densidad óptica (OD) se leyó a 450 nm usando el lector de microplacas (Varioskan Flash Multimode, Thermo Scientific®). Los resultados se normalizaron en relación de la cantidad de  $\mu\text{g}$  de proteína presente en cada sobrenadante y respecto a la condición control.

### **3.13. Amplificación de DNA por qPCR**

El DNA genómico se extrajo desde los HPE con el sistema comercial Wizard Genomic DNA Purification Kit (Promega®) de acuerdo a las instrucciones del fabricante y se cuantificó con el sistema  $\mu\text{DropPlate}$  en un lector de placas Varioskan Flash Multimode Reader (Thermo Scientific®). Para la amplificación del

DNA humano y del parásito, se usaron los partidores mostrados en la **Tabla 3**. Cada reacción contenía 10  $\mu\text{L}$  de SensiFAST™ SYBR® Hi-ROX Kit (Bioline®), 1  $\mu\text{L}$  de cada partidore a 10  $\eta\text{M}$  y 3  $\mu\text{L}$  de agua ultrapura libre de DNAsas, para un volumen total de 20  $\mu\text{L}$  y 1  $\eta\text{g}/\mu\text{L}$  de DNA genómico. El programa térmico consistió en una pre-incubación a 95°C durante 3 minutos seguido de 40 ciclos de PCR de desnaturalización a 95°C 5 segundos y apareamiento a 60°C durante 30 segundos. Para finalizar se agregó una fase de disociación que correspondió a 95°C durante 15 segundos, 60°C durante 1 minuto, 95°C durante 15 segundos y por último 60°C durante 15 segundos. La expresión relativa se calculó por el método de doble control comparativo  $\Delta\Delta\text{Ct}$  usando como gen *housekeeping* la expresión hGAPDH (Pfaffl, 2001;Castillo, et al., 2017b).

**Tabla 3.** Oligonucleótidos usados como partidores para qPCR específicos para DNA

Partidores qPCR	Primer Forward	Primer Reverse
<i>T. cruzi</i>	5'-GCTCTTGCCCACAMGGGTGC-3'	5'-CAAGCAGCGGATAGTTCAGG-3'
hGAPDH	5'-TGATGCGTGTACAAGCGTTTT-3'	5'-ACATGGTATTACCCACCCCACTAT-3'

### 3.14. Análisis estadístico

Cada experimento se realizó en triplicado y al menos en tres oportunidades distintas. Los resultados se expresan como la media más desviación estándar. La significancia de las variables cuantitativas se evaluó mediante el *test* de Student. Las variables múltiples se analizaron mediante ANOVA seguido por el *post-test* de Dunnett's. Se utilizó el programa computacional GraphPad Software PRISM

8.0 (GraphPad Software, San Diego, EE. UU.). Se consideró un  $p \leq 0,05$  como estadísticamente significativo.

### **3.15. 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**).

### **3.16. Ética**

Este estudio cuenta con la aprobación del Comité de Ética del Servicio de Salud Metropolitano Norte (AE N°010/2019) (**Anexo 3**).

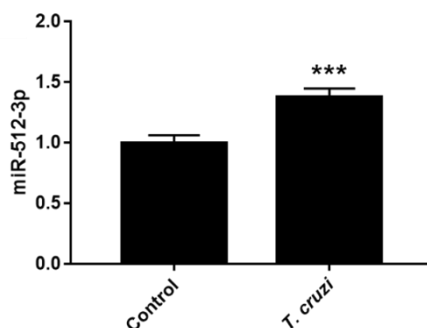
## 4. RESULTADOS

### 4.1. Resultados del Objetivo N°1

“Determinar los niveles de expresión y localización de miR-512-3p en HPE en respuesta a la infección con *T. cruzi*”

#### 4.1.1. *T. cruzi* incrementa la expresión de miR-512-3p durante la infección *ex vivo* de HPE

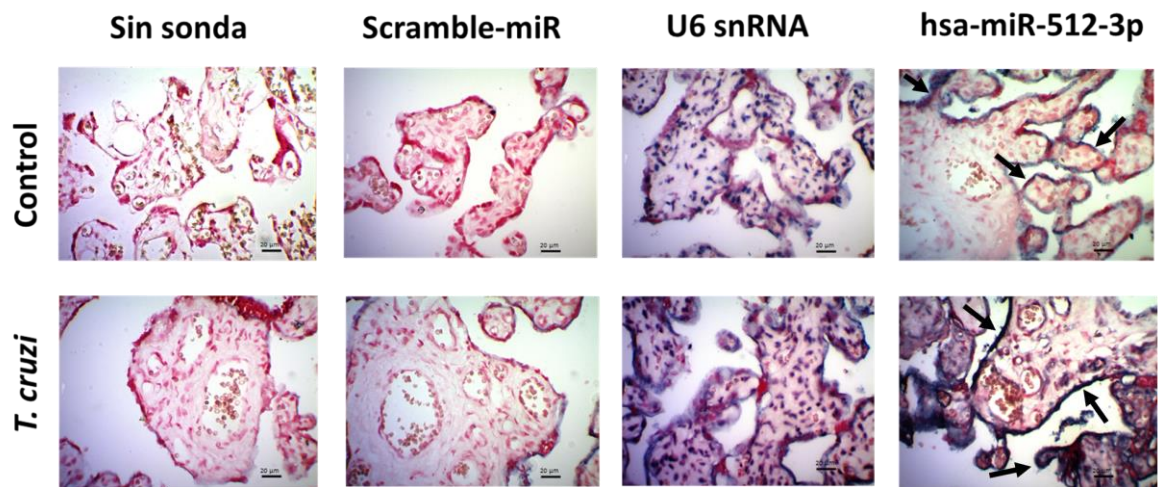
Los HPE se co-cultivaron en presencia y ausencia de tripomastigotes de *T. cruzi* a una concentración de  $10^5$  parásitos/mL durante 2 horas. Se observó que *T. cruzi* aumenta significativamente los niveles de miR-512-3p ( $37,9 \pm 6,9\%$  ( $p \leq 0,001$ )) respecto a las muestras controles sin infectar (**Figura 6**).



**Figura 6.** *T. cruzi* incrementa la expresión de miR-512-3p durante la infección *ex vivo* de HPE. Los HPE se incubaron en presencia y ausencia de tripomastigotes de *T. cruzi* ( $10^5$  parásitos/mL) durante 2 horas. La presencia de miRNA se determinó por RT-qPCR. Los datos representan la media  $\pm$  SD analizada por la prueba de t-Student de dos colas. N=3 en triplicado. \*\*\*  $p \leq 0,001$ .



El aumento de la expresión de miR-512-3p se corroboró mediante hibridación *in situ* cromogénica donde se evidencia una mayor reacción en las muestras incubadas con el parásito. Adicionalmente, se observó que miR-512-3p se localiza preferentemente en el trofoblasto que recubre las vellosidades coriónicas (**Figura 7**, flechas negras).



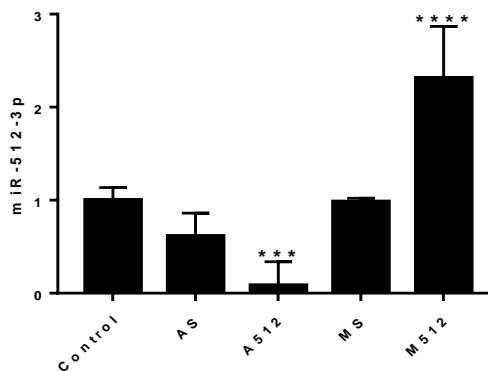
**Figura 7. *T. cruzi* incrementa la expresión de miR-512-3p en el trofoblasto.** Los HPE se incubaron en presencia o ausencia de tripomastigotes de *T. cruzi* ( $10^5$  parásitos/mL) durante 2 horas. Las muestras se procesaron con técnicas histológicas de rutina. Se muestran imágenes representativas de la hibridación *in situ* cromogénica, Scramble-miR y U6 snRNA son los controles negativos y positivos, respectivamente; hsa-miR-512-3p corresponde a la sonda específica para el miRNA. Los tejidos se contrastaron tiñendo el núcleo con Celular Nuclear Fast Red. Barra de aumento 20  $\mu$ m.

## 4.2. Resultados del Objetivo N° 2

“Estudiar el efecto de miR-512-3p inducido por *T. cruzi* en HPE sobre la diferenciación celular y apoptosis en el trofoblasto”

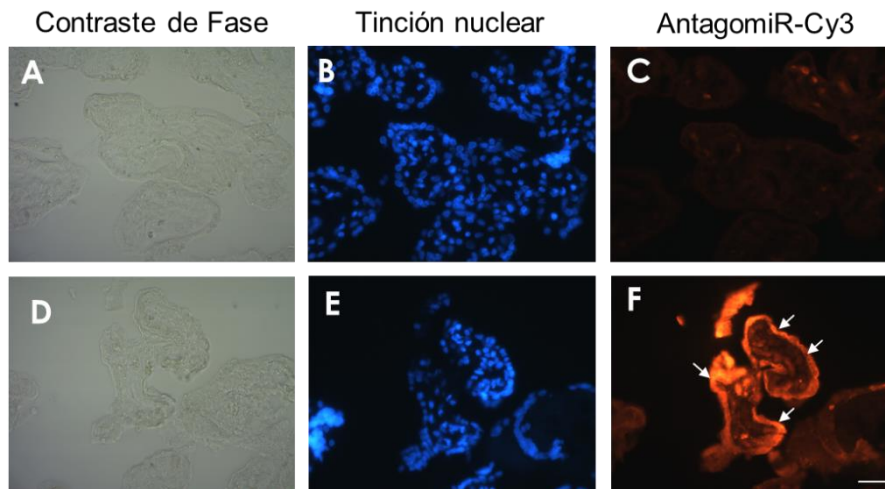
### 4.2.1. HPE se transfectan efectivamente con antagomiR y mimic de miR-512-3p

Los HPE se transfectaron con 200  $\eta$ M de antagomiR-512-3p (A512), mimic (M512) o sus respectivas versiones *scrambled* (AS o MS). Los HPE se transfectan efectivamente con antagomiR y mimic de miR-512-3p, pues la transfección con A512 disminuyó los niveles de miR-512-3p en un  $91,8 \pm 25,7\%$  ( $p \leq 0,001$ ), mientras que la transfección con M512 aumentó los niveles del miRNA en un  $131,5\% \pm 55,3\%$  ( $p \leq 0,0001$ ) con respecto a las muestras control sin transfectar. La transfección con los respectivos controles *scrambled* no afectó significativamente la expresión del miR-512-3p (**Figura 8**).



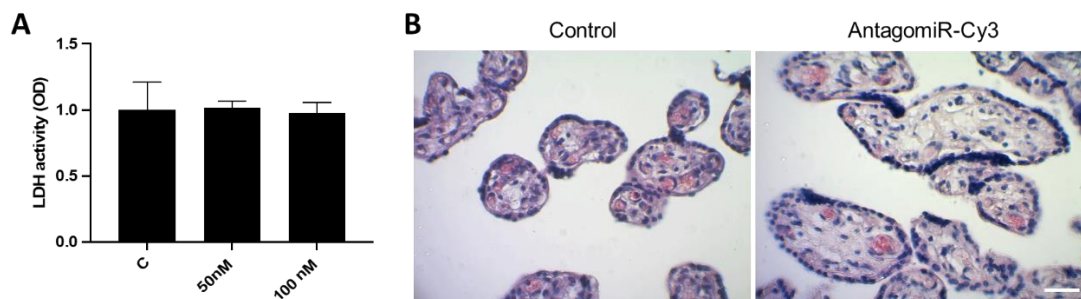
**Figura 8. Los niveles de miR-512-3p en HPE se modifican en presencia de un antagomiR y mimic específico.** Los HPE se transfectaron con 200 nM de antagomiR o mimic específico para miR-512-3p durante 24 horas. Los niveles de miRNA se determinaron mediante RT-qPCR. Todos los valores se expresan como 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. N=4 en triplicado. \*\*\*  $p \leq 0,001$ , \*\*\*\*  $p \leq 0,0001$ . AS: AntagomiR Scrambled, MS: Mimic Scrambled, A512: AntagomiR-512-3p y M512: Mimic-512-3p.

También se transfectaron los HPE con un antagomiR *off-target* conjugado con Cy3 con el objetivo de detectar su localización en el tejido (**Figura 9**). El antagomiR-Cy3 se observa en toda la vellosidad coriónica, pero se localiza principalmente en el trofoblasto (**Figura 9F**, flechas blancas).



**Figura 9. HPE se transfectan efectivamente con antagomiR-off target Cy3.** (A, B y C) HPE control sin transfectar. (D, E y F) HPE transfectados con 100  $\eta$ M de antagomiR-Cy3 durante 24 horas. Las muestras se procesaron con técnicas histológicas de rutina y los núcleos se tiñeron con DAPI. Barra de aumento 20  $\mu$ m.

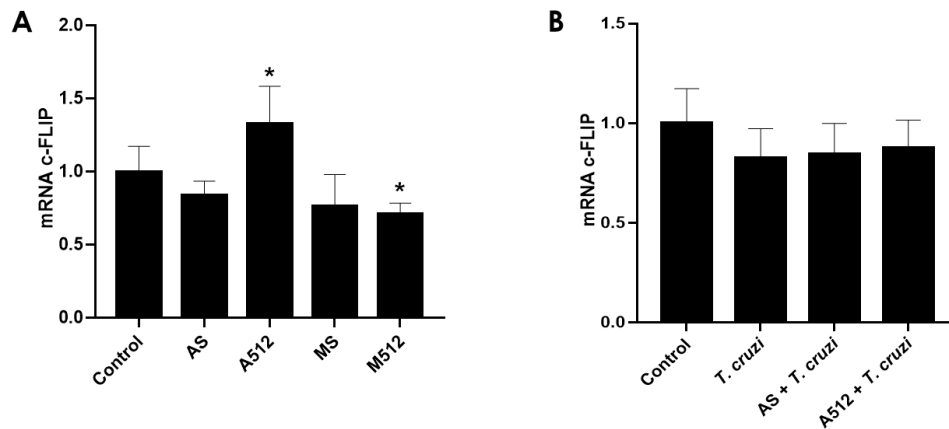
Adicionalmente, se analizó si había daño a nivel tisular en los HPE transfectados (**Figura 10**). La transfección con 50 o 100  $\eta$ M de antagomiR-cy3 no afectó la viabilidad de los HPE, lo que se demostró midiendo la actividad enzimática de la lactato deshidrogenasa en el sobrenadante (**Figura 10<sup>a</sup>**). Paralelamente se realizó un análisis histopatológico de las muestras transfectadas, mediante el cual se evidencia que no hay daño tisular respecto a los controles sin transfectar (**Figura 10B**). En todas las condiciones se observó integridad estructural, tanto en el trofoblasto como en el estroma vellositario. Con los resultados anteriores se confirma que los HPE se pueden transfectar exitosamente con el antagomiR y mimic de miR-512-3p sin generar daño tisular alguno.



**Figura 10. Transfección de HPE no causa daño tisular.** Los HPE se transfectaron con 50 o 100  $\eta$ M de AntagomiR-Cy3 durante 24 horas. En **A** se grafica la actividad de la lactato deshidrogenasa en los sobrenadantes de los cultivos. La actividad de la LDH se determinó con el sistema comercial LDH *Cytotoxicity Detection kit*, de acuerdo con las instrucciones del fabricante. En **B** imágenes representativas de los HPE transfectados con 100  $\eta$ M de AntagomiR-Cy3 y procesados para análisis histológicos de rutina y teñidos con hematoxilina-eosina. N= 3. Barra de aumento 20  $\mu$ m.

#### 4.2.2. Los niveles de mRNA de c-FLIP son regulados por miR-512-3p, pero no son modificados por *T. cruzi*

El inhibidor de la caspasa 8 (c-FLIP) es un blanco del miR-512-3p (Chen et al., 2010). La caspasa 8 media la diferenciación celular del trofoblasto y es activada por *T. cruzi* en células del trofoblasto (Carrillo et al., 2016). Los HPE se transfectaron y posteriormente se incubaron en presencia y ausencia de  $10^5$  tripomastigotes/mL de *T. cruzi*. Se confirmó que la inhibición y sobreexpresión del miR-512-3p incrementa ( $32,9 \pm 25,7\%$  ( $p \leq 0,05$ )) y disminuye ( $28,7 \pm 7,4\%$  ( $p \leq 0,05$ )) los niveles del mRNA de c-FLIP, respectivamente (**Figura 11<sup>a</sup>**). Sin embargo, el parásito no altera los niveles del transcrito de c-FLIP (**Figura 11<sup>b</sup>**).

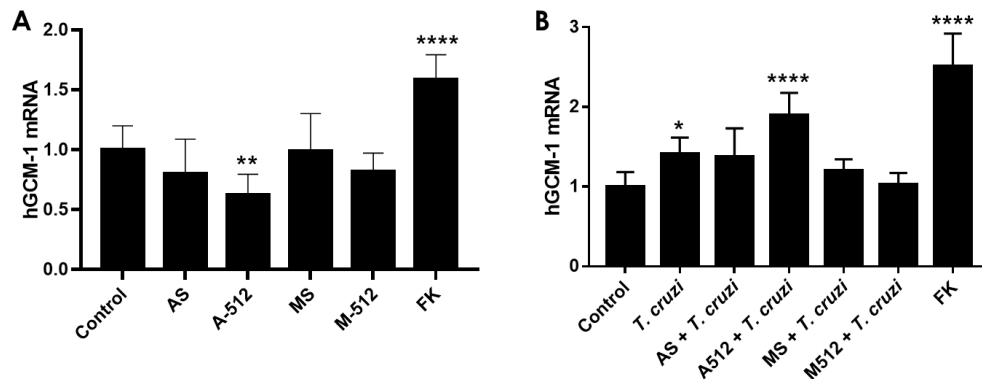


**Figura 11. *T. cruzi* no altera los niveles de transcrito de c-FLIP.** Los HPE se transfectaron con 200  $\eta$ M de antagomiR o mimic específico para miR-512-3p. **(A)** Transcripción de c-FLIP después de 24 horas de la transfección con el antagomiR o control, **(B)** Transcripción de c-FLIP después de 24 horas de la transfección con el antagomiR o control, y posterior infección con tripomastigotes de *T. cruzi* ( $10^5$  parásitos/mL) durante 2 horas. Los niveles del mRNA de c-FLIP se determinaron 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. N=4 en triplicado. \*  $p \leq 0,05$ . AS: AntagomiR Scrambled, A512: AntagomiR-512-3p, MS: Mimic Scrambled y M512: Mimic-512-3p.

#### 4.2.3. miR-512-3p regula los niveles de transcrito de hGCM-1, pero no previene el aumento inducido por *T. cruzi*

El factor de transcripción hGCM-1 (del inglés *human Glial Cell Missing-1*) media la transcripción de genes involucrados en la diferenciación del trofoblasto (Huppertz & Gauster, 2011). Los HPE fueron transfectados y desafiados con tripomastigotes de *T. cruzi* o forskolina (50  $\mu$ M) durante 24 horas. La forskolina se usó como control positivo de la diferenciación del trofoblasto. Aunque hGCM-1 no es blanco directo del miR-512-3p, es importante señalar que éste modula sus niveles de mRNA. Así, la transfección con el antagomiR disminuye en un  $37,3 \pm$

17% ( $p \leq 0,01$ ) la expresión de hGCM-1 con respecto al control (**Figura 12<sup>a</sup>**). Sin embargo, la transfección con A512 no impide el incremento de hGCM-1 inducido por el parásito ( $41,4 \pm 20,2\%$  ( $p \leq 0,05$ )), sino que la aumenta ( $89,1 \pm 28,5\%$  ( $p \leq 0,0001$ )) (**Figura 12B**).

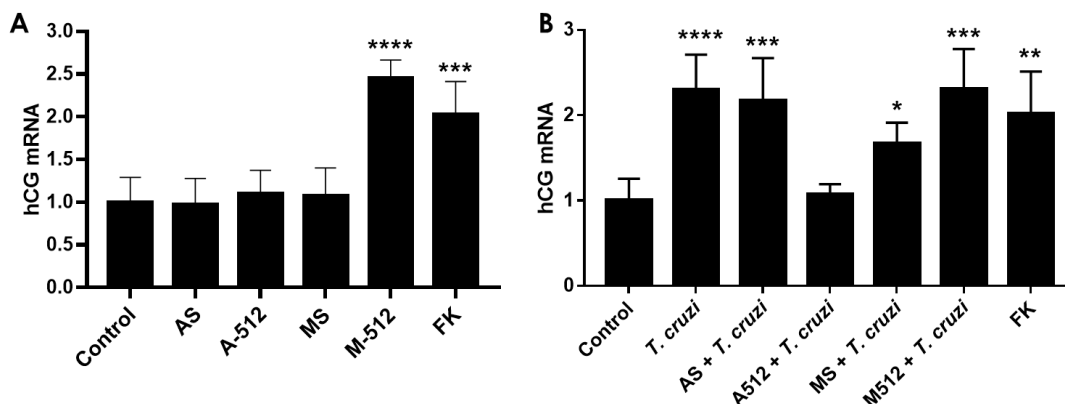


**Figura 12. miR-512-3p no previene el aumento de hGCM-1 inducido por *T. cruzi*.** Los HPE se transfectaron con 200 nM de antagomiR o mimic específico para miR-512-3p durante 24 horas (**A**), posteriormente se infectaron con tripomastigotes de *T. cruzi* ( $10^5$  parásitos/mL) durante 2 horas (**B**) o incubados con forskolina (50  $\mu$ M) durante 26 horas. La presencia del mRNA de hGCM-1 se determinó 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. N=5 en triplicado. \*  $p \leq 0,05$ , \*\*  $p \leq 0,01$ , \*\*\*\*  $p \leq 0,0001$ . AS: AntagomiR Scrambled, MS: Mimic Scrambled, A-512: AntagomiR-512-3p, M-512: Mimic-512-3p y FK: Forskolina.

#### 4.2.4. miR-512-3p regula el incremento de hCG inducido por *T. cruzi*

La hormona gonadotrofina coriónica humana (hCG) es uno de los principales marcadores de diferenciación del trofoblasto y su expresión es mediada por hGCM-1 (Huppertz & Gauster, 2011). Adicionalmente, el parásito induce la expresión de esta hormona en HPE (Liempi et al., 2014). Se evaluó si el miR-512-3p está involucrado en la expresión de hCG inducida por *T. cruzi*. La

transfección con mimic-512-3p aumentó en un  $145,4 \pm 21,2\%$  ( $p \leq 0,0001$ ) los niveles de transcrito de hCG (**Figura 13<sup>a</sup>**). A pesar de que A-512 no altera los niveles del transcrito de la hCG, al disminuir los niveles del miR-512-3p se impide el aumento del mRNA de hCG inducido por *T. Cruzi* ( $233,6 \pm 29\%$  ( $p \leq 0,0001$ )). Sin embargo, el aumento en los niveles de miR-512-3p con el mimic no incrementa el aumento del transcrito de hCG inducido por el parásito ( $230,8 \pm 46,8\%$  ( $p \leq 0.001$ )) (**Figura 13B**).

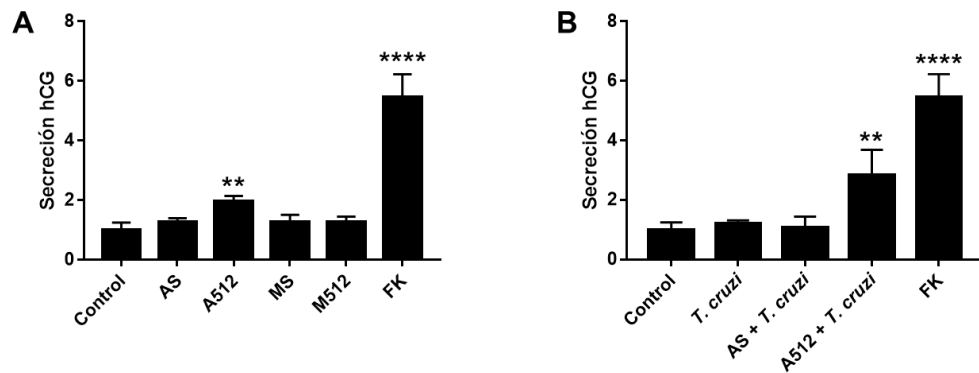


**Figura 13. miR-512-3p impide el aumento de hCG inducido por *T. cruzi*.** Los HPE se transfectaron con 200  $\eta$ M de antagomiR o mimic de miR-512-3p durante 24 horas (**A**), posteriormente se infectaron con tripomastigotes de *T. cruzi* ( $10^5$  parásitos/mL) durante 2 horas (**B**) o se incubaron con forskolina (50  $\mu$ M) durante 26 horas. La presencia del mRNA de hCG se determinó 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. N=5 en triplicado. \*  $p \leq 0,05$ , \*\*  $p \leq 0,01$ , \*\*\*  $p \leq 0,001$ , \*\*\*\*  $p \leq 0,0001$ . AS: AntagomiR Scrambled, MS: Mimic Scrambled, A-512: AntagomiR-512-3p, M-512: Mimic-512-3p y FK: Forskolina.

Adicionalmente, se midieron los niveles de hCG en el sobrenadante después de 48 horas de co-incubación con  $10^5$  tripomastigotes/mL de *T. cruzi* mediante ELISA con un sistema comercial. Contrario a lo esperado, ni la



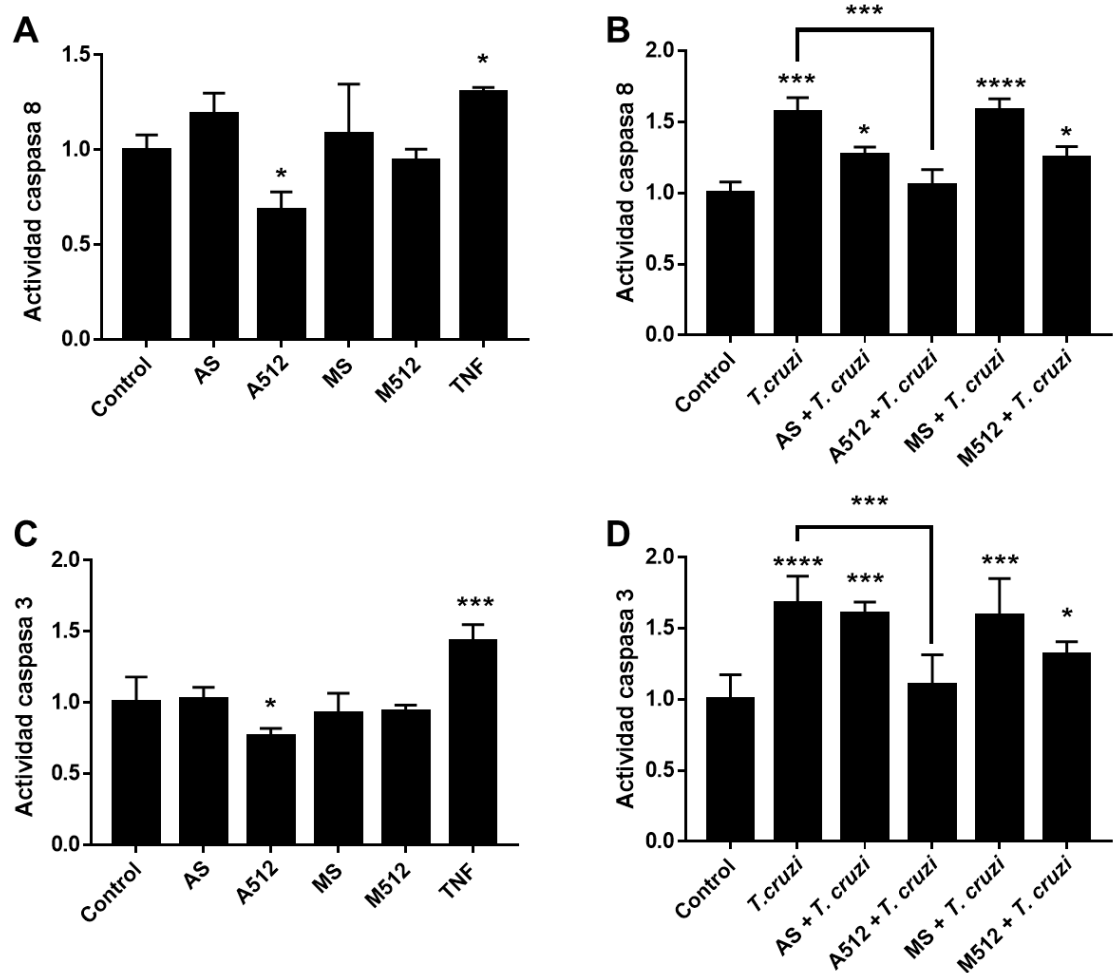
transfección con mimic-512-3p, ni la infección con *T. cruzi* incrementaron los niveles de hCG secretada (**Figura 14**). La transfección con A512 aumentó en un  $96,1 \pm 18,1$  % ( $p \leq 0,01$ ) la secreción de hCG (**Figura 14<sup>a</sup>**). El control positivo de diferenciación del trofoblasto (forskolina) sí aumenta la secreción de hCG ( $446,5 \pm 76,1\%$  ( $p \leq 0,0001$ )). También se observó que al transfectar con A512 y posteriormente infectar con *T. cruzi* aumentó en un  $182,5 \pm 86,2$  % ( $p \leq 0,01$ ) la secreción de hCG (**Figura 14B**).



**Figura 14. *T. cruzi* no altera los niveles de hCG secretada durante la infección *ex vivo*.** Los HPE se transfectaron con 200 nM de antagomiR o mimic específico para miR-512-3p durante 24h (**A**), posteriormente se infectaron con tripomastigotes de *T. cruzi* ( $10^5$  parásitos/mL) durante 48 horas (**B**) o se incubaron con forskolina ( $50 \mu\text{M}$ ) también durante 48 horas. Se recolectó el sobrenadante del medio de cultivo y se analizó la presencia de  $\beta$ -hCG mediante ELISA con un sistema comercial. Todos los valores se indican como la media  $\pm$  SD, los datos se normalizaron en relación a los  $\mu\text{g}$  de proteína total por muestra y posteriormente en función de los valores del control y se analizaron mediante ANOVA de una vía y *post-test* de Dunnet. N=3 en triplicado. \*\*  $p \leq 0,01$ , \*\*\*\*  $p \leq 0,0001$ . AS: AntagomiR Scrambled, MS: Mimic Scrambled, A512: AntagomiR-512-3p, M512: Mimic-512-3p y FK: Forskolina.

#### 4.2.5. miR-512-3p impide el aumento en la actividad enzimática de las caspasas 3 y 8 inducidas por *T. cruzi*

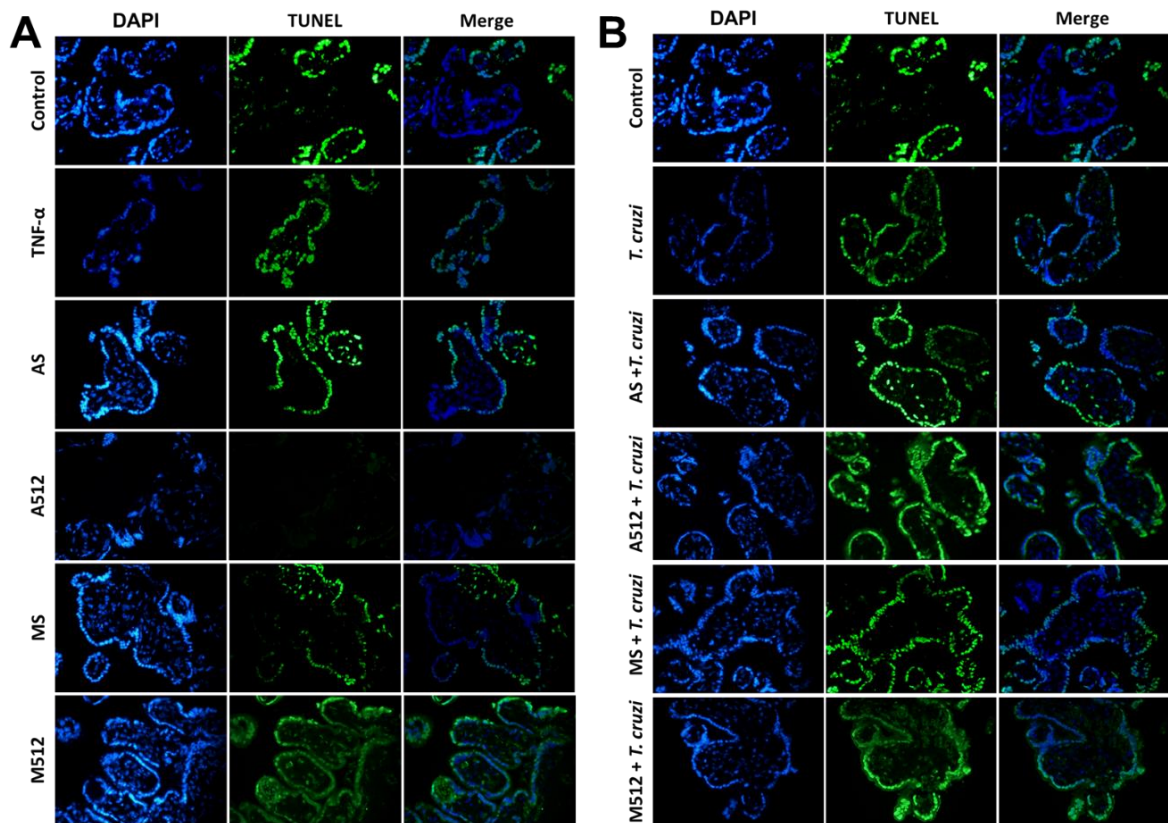
La caspasa 8 es una proteasa cisteína-aspartato que tiene un rol crucial en la cascada de la apoptosis, actuando como iniciador de la vía extrínseca de la apoptosis, en cambio la caspasa 3 actúa como efectora de la apoptosis (Gauster & Huppertz, 2010). Los HPE se transfectaron con antagomiR y mimic de miR-512-3p y sus respectivos controles *scrambled*, posteriormente se incubaron en presencia y ausencia de tripomastigotes de *T. cruzi* ( $10^5$  parásitos/mL), así como en presencia y ausencia de r-hTNF- $\alpha$  (20  $\eta$ g/mL) durante 48 horas. El tratamiento con el control positivo de la actividad de las caspasas 8 y 3 (TNF- $\alpha$ ) generó un aumento significativo de un  $31,2 \pm 2,8\%$  ( $p \leq 0,05$ ) (**Figura 15A**) y un  $43,4 \pm 11,5\%$  ( $p \leq 0,001$ ) (**Figura 15C**) en la actividad de la caspasa 8 y caspasa 3, respectivamente. La disminución de los niveles de miR-512-3p mediante la transfección con su antagomiR provocó una disminución tanto en la actividad de la caspasa 8 ( $31,5 \pm 9,3\%$  ( $p \leq 0,05$ )) (**Figura 15A**) como en la caspasa 3 ( $23,8 \pm 5,7\%$  ( $p \leq 0,05$ )) (**Figura 15C**). Más aún, la disminución de los niveles del miR-512-3p impide el aumento de la actividad enzimática inducido por *T. cruzi*, tanto de la caspasa 8 ( $56,7 \pm 10,4\%$  ( $p \leq 0,001$ )) (**Figura 15B**) como de la caspasa 3 ( $67,6 \pm 19,1\%$  ( $p \leq 0,0001$ )) (**Figura 15D**).



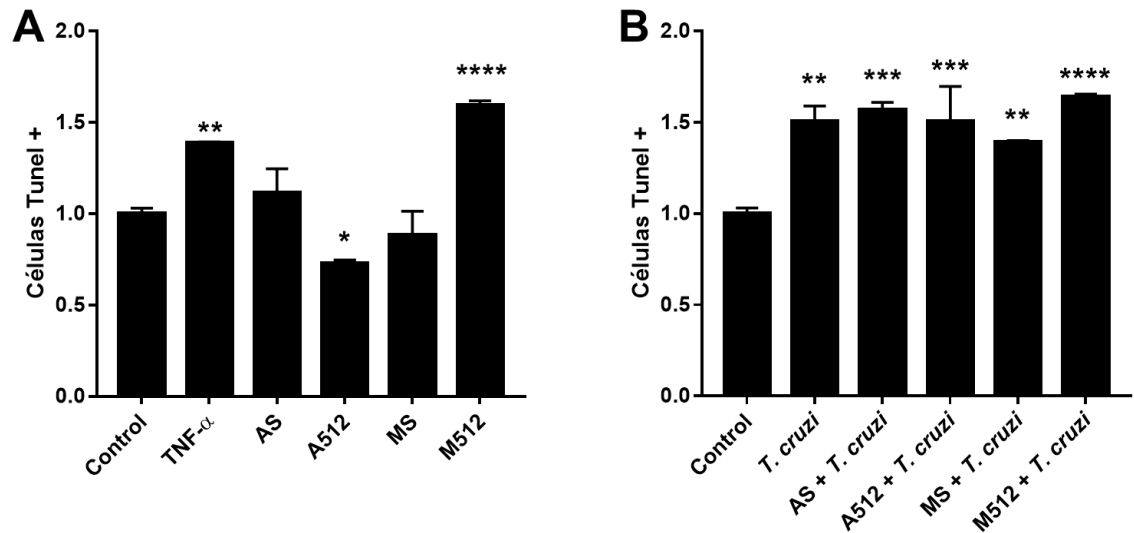
**Figura 15. miR-512-3p impide el aumento en la actividad enzimática de las caspasas 8 y 3 inducida por *T. cruzi* durante la infección *ex vivo* de HPE.** Los HPE se transfectaron con 200 nM de antagomiR o mimic específico para miR-512-3p durante 24h, posteriormente se infectaron con tripomastigotes de *T. cruzi* ( $10^5$  parásitos/mL) durante 48 horas o se incubaron con r-hTNF- $\alpha$  (20 ng/mL) también durante 48 horas. La actividad enzimática de la caspasa 8 (**A** y **B**) y de la caspasa 3 (**C** y **D**) se midió con sistemas comerciales según las instrucciones del fabricante. Todos los valores se indican como la media  $\pm$  SD, los datos se normalizaron en relación a los  $\mu$ g de proteína total por muestra y posteriormente en función de los valores del control y se analizaron mediante ANOVA de una vía y *post-test* de Dunnet. N=3 en triplicado. \*  $p \leq 0,05$ , \*\*\*  $p \leq 0,001$ , \*\*\*\*  $p \leq 0,0001$ . AS: AntagomiR *Scrambled*, MS: Mimic *Scrambled*, A512: AntagomiR-512-3p, M512: Mimic-512-3p y TNF: Factor de Necrosis Tumoral (TNF- $\alpha$ ).

#### 4.2.6. miR-512-3p regula la fragmentación de DNA, pero no impide la fragmentación de DNA inducida por *T. cruzi*

Se evaluó la fragmentación del DNA mediante el método de TUNEL. Así, HPE se transfectaron con antagomiR y mimic de miR-512-3p y sus respectivos controles *scrambled*; posteriormente se incubaron en presencia y ausencia de tripomastigotes de *T. cruzi* ( $10^5$  parásitos/mL), así como en presencia y ausencia de r-hTNF- $\alpha$  (20 ng/mL) (como control positivo de la apoptosis) durante 48 horas. Se observó que la transfección con antagomiR-512-3p y con mimic-512-3p resulta en una menor y mayor marcación de células TUNEL positivas, respectivamente, en comparación al control sin transfectar (**Figura 16A**). Tanto el tratamiento con TNF- $\alpha$  (control positivo) como la infección con *T. cruzi* causan un aumento en la marcación de células TUNEL positivas (**Figura 16A y 16B**). Al realizar un análisis cuantitativo, se aprecia que el tratamiento con TNF- $\alpha$  generó un aumento significativo de un  $38,8 \pm 0,6\%$  ( $p \leq 0,01$ ) (**Figura 17A**) de células TUNEL positivas en comparación al control. La disminución de los niveles de miR-512-3p mediante la transfección con su antagomiR provocó una disminución en la cantidad de células TUNEL positivas ( $27,3 \pm 2,0\%$  ( $p \leq 0,05$ )). Por otro lado, al aumentar los niveles de miR-512-3p también se observó un incremento del número de células TUNEL positivas ( $59,4 \pm 2,5\%$  ( $p \leq 0,0001$ )) (**Figura 17A**). Sin embargo, la transfección con antagomiR o con mimic no altera el aumento de células TUNEL positivas inducido por el parásito ( $50,7 \pm 8,3\%$  ( $p \leq 0,0001$ )) (**Figura 17B**).



**Figura 16. La sobreexpresión e inhibición de miR-512-3p no altera la fragmentación de DNA causada por *T. cruzi*.** Los HPE se transfectaron con 200 nM de antagomiR o mimic específico para miR-512-3p durante 24h, posteriormente se cultivaron en presencia o ausencia de r-hTNF- $\alpha$  (20 ng/mL) (**A**) o en presencia de tripomastigotes de *T. cruzi* ( $10^5$  parásitos/mL) (**B**) durante 48 horas. Las muestras se procesaron con técnicas histológicas de rutina, los núcleos se tiñeron con DAPI y la fragmentación del DNA se determinó con el ensayo TUNEL (se muestran imágenes representativas del ensayo). AS: AntagomiR Scrambled, MS: Mimic Scrambled, A512: AntagomiR-512-3p, M512: Mimic-512-3p y TNF: Factor de Necrosis Tumoral (TNF- $\alpha$ ).



**Figura 17. Cuantificación del porcentaje de células TUNEL+.** Los HPE se transfectaron con 200 nM de antagoniR o mimic específico para miR-512-3p durante 24h, posteriormente se cultivaron en presencia o ausencia de r-hTNF-α (20 ng/mL) (A) o en presencia de tripomastigotes de *T. cruzi* (10<sup>5</sup> parásitos/mL) (B) durante 48 horas. Los gráficos muestran la cuantificación del porcentaje de células TUNEL+. Todos los valores se expresan como el promedio ± SD del recuento de al menos 500 núcleos, los datos se normalizaron en función de los valores del control y se analizaron mediante ANOVA de una vía y *post-test* de Dunnet. N=1 en triplicado. \* p≤0.05, \*\* p≤0.01, \*\*\* p≤0.001, \*\*\*\* p≤0.0001. AS: AntagomiR Scrambled, MS: Mimic Scrambled, A512: AntagomiR-512-3p, M512: Mimic-512-3p y TNF: Factor de Necrosis Tumoral (TNF-α).

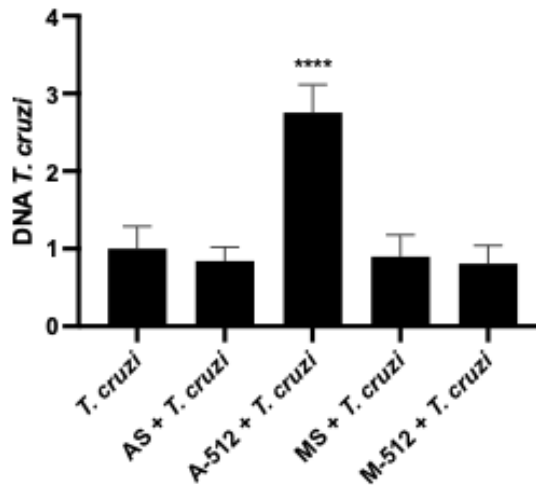
### 4.3. Resultados del Objetivo N° 3

“Determinar el posible rol de miR-512-3p en la probabilidad de infección de *T. cruzi* en HPE”

#### 4.3.1. miR-512-3p media la susceptibilidad a la infección con *T. cruzi*

Dado que la diferenciación y muerte celular tipo apoptosis son parte del recambio epitelial del trofoblasto y este proceso es considerado un mecanismo de defensa local contra la infección con *T. cruzi*, se analizó si al modular los niveles

del miR-512-3p se modifica la infección. Como se esperaba, al inhibir miR-512-3p, y con ello la diferenciación del trofoblasto, la carga parasitaria aumenta significativamente, encontrándose aumentos en un  $175,6 \pm 35,8\%$  ( $p \leq 0,0001$ ) (Figura 18).



**Figura 18. miR-512-3p media la susceptibilidad a la infección con *T. cruzi*.** Los HPE se transfectaron con 200  $\eta$ M de antagomiR o mimic específico para miR-512-3p durante 24 horas, posteriormente se infectaron con tripomastigotes de *T. cruzi* ( $10^5$  parásitos/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. N=5 en triplicado. \*\*\*\*  $p \leq 0,0001$ . AS: AntagomiR *Scrambled*, MS: Mimic *Scrambled*, A512: AntagomiR-512-3p y M512: Mimic-512-3p.

## 5. DISCUSIÓN

### 5.1. Contexto y generalidades

Para que ocurra la transmisión congénita de la enfermedad de Chagas, *T. cruzi* debe atravesar la barrera placentaria para alcanzar al feto (Duaso et al., 2010; Kemmerling et al., 2019). El trofoblasto es el primer tejido de la barrera placentaria que toma contacto con la sangre materna, en la cual circula el parásito (Kemmerling et al., 2010; Duaso et al., 2011, 2012a).

El hecho de que la tasa de transmisión congénita de *T. cruzi* sea baja, junto con la escasa evidencia de nidos de amastigotes en placentas provenientes de madres chagásicas, indican que existen mecanismos antiparasitarios locales en la placenta humana (Duaso, et al., 2012b; Liempi et al., 2014; Carlier et al., 2020). Además, los nidos de amastigotes se pueden observar solamente en explantes de placenta humana infectadas *ex vivo*, cuando se remueve enzimáticamente el trofoblasto de estos (Luján et al., 2004).

Por estos motivos cobra gran importancia el recambio del trofoblasto, pues mantiene intacta la barrera anatómica. Además, este recambio del trofoblasto que forma parte de la respuesta inmune innata podría explicar parcialmente las bajas tasas de transmisión de la enfermedad (Liempi et al., 2014). Estudios previos del laboratorio demuestran que la presencia del parásito induce proliferación (Droguett et al., 2017), diferenciación (fusión/sincialización) (Liempi et al., 2014) y muerte celular tipo apoptosis (Duaso et al., 2011) en el trofoblasto, sugiriendo un



aumento en el recambio epitelial en este tejido (Liempi et al., 2014, 2016; Droguett et al., 2017). Los procesos de diferenciación celular y muerte celular tipo apoptosis están estrechamente relacionados en el trofoblasto (Gauster & Huppertz, 2010; Huppertz & Gauster, 2011; Mayhew, 2014). La caspasa 8 no sólo regula la apoptosis en el trofoblasto sino también los procesos de fusión de células del citotrofoblasto al sinciciotrofoblasto, participando así en el recambio epitelial (Gauster et al., 2009; Gauster & Huppertz, 2010). La coordinación de estos procesos celulares involucrados en el recambio epitelial, implican profundos cambios en la expresión génica que son regulados a un nivel post-transcripcional mediante miRNAs (Hayder et al., 2018).

Los miRNAs regulan la expresión de más del 30% de los genes fundamentales involucrados en procesos biológicos como la diferenciación celular y la respuesta inmunitaria, determinando el éxito o fracaso de la infección. Durante la interacción hospedero-patógeno, distintos patógenos (entre ellos parásitos protozoarios) modulan la expresión génica del hospedero para evitar su eliminación y establecer la infección (Medina et al., 2020; Villares et al., 2020).

## **5.2. MiR-512-3p es modulado por la infección con *T. cruzi***

En HPE, la infección con *T. cruzi* no sólo induce un perfil específico de mRNAs (Castillo et al., 2018), sino que también de miRNAs (Medina et al., 2020) que es distinto al de *Toxoplasma gondii*, otro parásito protozoario. Esto podría

explicar en parte la baja tasa de transmisión congénita observada para *T. cruzi* y la alta tasa de transmisión de *Toxoplasma gondii* (Medina et al., 2020). En ese estudio miR-512-3p se validó como un miRNA modulado por *T. cruzi*, lo cual se confirmó en esta tesis (**Figura 6**). Este miRNA está codificado en el cromosoma 19 (C19MC), el mayor *cluster* de miRNAs en humanos y se expresa casi exclusivamente en placenta (Donker et al., 2012; Sadovsky et al., 2015). Los miRNAs de este *cluster* se han asociado al desarrollo de la placenta (Hayder et al., 2018), a patologías relacionadas con el embarazo y a infecciones (Hromadnikova et al., 2015; Mouillet et al., 2015; Sadovsky et al., 2015; Hayder et al., 2018).

miR-512-3p regula la diferenciación celular (Chen et al., 2010), proceso que como ya se mencionó, es parte del recambio epitelial del trofoblasto. Las células epiteliales infectadas disponen de un sistema de alarma para alertar a las células vecinas no infectadas mediante la transferencia de señales de peligro a través de *gap junctions*, lo que permite al epitelio deshacerse de las células del hospedero infectadas (Kasper et al., 2010; Chang et al., 2013). Las señales de peligro se propagan a través de NF $\kappa$ B y la señalización de la MAPK, vías que *T. cruzi* activa en explantes de placenta humana (Castillo et al., 2013; Liempi et al., 2019).

### **5.3. MiR-512-3p regula los niveles de transcrito de c-FLIP**

miR-512-3p actúa reprimiendo al inhibidor de la caspasa 8, c-FLIP, lo que conduce a un aumento en la actividad de la caspasa 8 (Chen et al., 2010). Se ha visto en estudios previos que *T. cruzi* aumenta la actividad de la caspasa 8. Además la inhibición de esta caspasa promueve la infección del parásito en células BeWo, lo que se evidencia en un aumento de la carga parasitaria (Carrillo et al., 2016). En esta tesis se confirma que, en HPE, los niveles de transcrito de c-FLIP son regulados por miR-512-3p, pero no así por *T. cruzi* (**Figura 11**). En cuanto a la caspasa 8, se confirma que en HPE, la actividad de ésta es regulada por miR-512-3p, que *T. cruzi* aumenta la actividad de la caspasa 8 y que la disminución en los niveles del miRNA impide el aumento producido por *T. cruzi* (**Figura 15A y 15B**).

### **5.4. MiR-512-3p participa en la diferenciación del trofoblasto inducida por *T. cruzi*, al menos a nivel de transcritos de hGCM1 y hCG**

Si bien la diferenciación del trofoblasto propiamente tal no se vio alterada por el miR-512-3p, al medir los niveles de proteína de  $\beta$ -hCG en el sobrenadante, *T. cruzi* tampoco incrementó la secreción de esta hormona, lo cual es contrario a lo que se esperaba, puesto que en células BeWo se había visto que *T. cruzi* aumentaba la secreción de  $\beta$ -hCG (Carrillo et al., 2016; Droguett et al., 2017). Esto

podría explicarse por la metodología que se utilizó, donde se cultivaron los HPE con *T. cruzi* durante 48 horas, y la diferenciación (por tanto, la secreción de hCG) ocurre entre las 48 a 72 horas (Huppertz & Gauster, 2011; Orendi et al., 2011), por lo que quizás incubaciones durante un tiempo mayor sí hubiesen mostrado una variación en la secreción de la hormona.

En cuanto a la expresión de los mRNAs de los principales marcadores de diferenciación del trofoblasto tanto el factor transcripcional hGCM-1 como la gonadotrofina coriónica, se vieron alterados sus niveles de transcrito con la disminución de miR-512-3p (para el caso de la hGCM1) (**Figura 12A**), así como con la sobreexpresión del miRNA (para el caso de la hCG) (**Figura 13A**). A pesar de que la transfección con antagomiR-512-3p no disminuye los niveles de transcrito de la hCG (**Figura 13A**), es interesante que una disminución de los niveles del miR-512-3p evita completamente el aumento del mRNA de hCG inducido por *T. cruzi* (**Figura 13B**). Este cambio en la expresión de mRNAs causado por la disminución o sobreexpresión del miR-512-3p indicaría que miR-512-3p efectivamente participa en la diferenciación del trofoblasto a nivel transcripcional. De todas formas, se hace necesario un estudio a nivel proteómico para complementar los resultados aquí obtenidos.

### **5.5. MiR-512-3p media la muerte celular tipo apoptosis inducida por *T. cruzi*, que se ve reflejada en la actividad de las caspasas 3 y 8**

La muerte celular tipo apoptosis se considera como la parte final del recambio del trofoblasto que culmina con la liberación de los nodos apoptóticos hacia la sangre materna. La apoptosis permite la renovación y mantención de un espesor adecuado del trofoblasto, contrarrestando la incorporación continua de células del CT al ST (Burton & Kaplan, 2022). Previamente se había demostrado que *T. cruzi* induce un aumento en la actividad de la caspasa 3 en HPE (Duaso et al., 2011). La caspasa 3 es una caspasa efectora, la que puede ser activada proteolíticamente por la caspasa 8 (Kurokawa & Kornbluth, 2009). Las caspasas efectoras actúan sobre un amplio rango de sustratos, facilitando la condensación de la cromatina y el desensamblaje del citoesqueleto en etapas finales de la apoptosis (Kurokawa & Kornbluth, 2009).

En esta tesis se confirma la participación de miR-512-3p en la muerte celular tipo apoptosis. Esto se demostró tanto en la actividad de la caspasa 3 (**Figura 15C**) como en la fragmentación del DNA, la que se determinó como el porcentaje de células TUNEL positivas (**Figura 16A y 17A**). Además, la disminución de los niveles de miR-512-3p impide completamente el aumento de la actividad de la caspasa 3 inducido por la infección con *T. cruzi* en HPE (**Figura 15D**), lo que concuerda con el resultado de la actividad de la caspasa 8, su caspasa iniciadora (**Figura 15B**). Aun así, En el contexto de los resultados de la

actividad de las caspasas, la inhibición y sobreexpresión de miR-512-3p no alteraron la fragmentación del DNA causada por el parásito (**Figura 16B y 17B**). Es necesario indicar que este resultado corresponde a un solo ensayo. Dado que las placentas presentan una variación considerable de una madre a otra, es necesario repetir este ensayo con un mayor número de placentas para sacar conclusiones definitivas a partir de estos resultados.

#### **5.6. La susceptibilidad a la infección por *T. cruzi* es mediada, en parte por el miR-512-3p**

En cuanto a la susceptibilidad a la infección del parásito, como se esperaba, la transfección con el antagomiR-512-3p aumentó la carga de DNA de *T. cruzi* en los HPE (**Figura 18**). Por lo tanto, al disminuir la diferenciación y muerte celular tipo apoptosis a través de este miRNA, el parásito puede superar la barrera placentaria más fácilmente (Liempi et al., 2016). Es de importancia mencionar que la proliferación celular es también un proceso clave del recambio del trofoblasto (Mayhew, 2014; Liempi et al., 2016; Kemmerling et al., 2019), y su desregulación altera la fisiología normal de la barrera placentaria. Por lo tanto, cualquier cambio en la barrera anatómica de la placenta podría conducir a un aumento en la infección por patógenos.

Es importante destacar que el conocimiento del rol de los miRNAs alterados por *T. cruzi* en la placenta podría permitir su uso como posibles biomarcadores en

el futuro, así como proporcionar herramientas tanto pronósticas como terapéuticas para la enfermedad de Chagas congénita.

A partir de estos resultados se concluye que *T. cruzi* disminuye los niveles del miR-512-3p, que éste reprime el mensajero del inhibidor de la caspasa 8, c-FLIP, produciendo un perfil de mRNAs característicos de la diferenciación del trofoblasto, además de disminuir la actividad de las caspasas 8 y 3 cuando se disminuyen los niveles del miRNA. Asimismo, la susceptibilidad a la infección por *T. cruzi* en HPE es mayor con niveles más bajos de miR-512-3p.

Los resultados obtenidos en la presente tesis sugieren que la diferenciación y apoptosis del trofoblasto inducida por *T. cruzi* está mediada por miR-512-3p. Estos procesos del recambio epitelial del trofoblasto determinan, al menos en parte, la susceptibilidad de explantes de placenta humana a la infección *ex vivo* por este parásito.

## 6. RESUMEN DE RESULTADOS Y CONCLUSIONES

- La infección *ex vivo* de explantes de placenta humana con *Trypanosoma cruzi* aumenta la expresión del miR-512-3p, y este miRNA se localiza principalmente en el trofoblasto.
- La diferenciación celular, a nivel de transcritos de hCG y hGCM-1, y la apoptosis del trofoblasto inducida por *Trypanosoma cruzi* es mediada, al menos en parte, por el miR-512-3p.
- La disminución en los niveles del miR-512-3p, aumentan la susceptibilidad de la placenta a la infección por *Trypanosoma cruzi*. Esta observación es consistente con la participación del miRNA en los procesos celulares de diferenciación y apoptosis del trofoblasto, que determinan el recambio epitelial y este es, a su vez, un mecanismo del sistema inmune local de la placenta contra patógenos.

Los resultados obtenidos comprueban el rol del miR-512-3p ante la infección de explantes de placenta humana con el parásito. Aun así, es necesario llevar el estudio más allá y evaluar los cambios a nivel proteómico que generados por alteraciones en los niveles del miRNA. Además, sería muy interesante estudiar otros blancos del miR-512-3p que involucrados en los procesos del recambio del trofoblasto y que estén siendo alterados por la infección con el parásito.



## 7. BIBLIOGRAFÍA

- Aghaeepour, N., Ganio, E. A., Mcilwain, D., Tsai, A. S., Tingle, M., Van Gassen, S., Gaudilliere, D. K., Baca, Q., McNeil, L., Okada, R., Ghaemi, M. S., Furman, D., Wong, R. J., Winn, V. D., Druzin, M. L., El-Sayed, Y. Y., Quaintance, C., Gibbs, R., Darmstadt, G. L., ... Gaudilliere, B. (2017). An immune clock of human pregnancy. *Science Immunology*, 2(15), 1–12. <https://doi.org/10.1126/sciimmunol.aan2946>
- Ambros, V. (2004). The functions of animal microRNAs. *Nature*, 431(7006), 350–355. <https://doi.org/10.1038/nature02871>
- 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). <https://doi.org/10.1093/nar/gkx588>
- Anthiya, S., Griveau, A., Loussouarn, C., Baril, P., Garnett, M., Issartel, J. P., & Garcion, E. (2018). MicroRNA-Based Drugs for Brain Tumors. *Trends in Cancer*, 4(3), 222–238. <https://doi.org/10.1016/j.trecan.2017.12.008>
- Apt, W., Zulantay, I., Arnello, M., Oddó, D., González, S., Rodríguez, J., Kemmerlingd, U., Truyense, C., & Carliere, Y. (2013). Congenital infection by *Trypanosoma cruzi* in an endemic area of Chile: A multidisciplinary study. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 107(2), 98–104. <https://doi.org/10.1093/trstmh/trs013>
- Arora, N., Sadovsky, Y., Dermody, T. S., & Coyne, C. B. (2017). Microbial Vertical Transmission during Human Pregnancy. *Cell Host and Microbe*, 21(5), 561–567. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2017.04.007>
- Auvinen, E. (2017). Diagnostic and Prognostic Value of MicroRNA in Viral

Diseases. *Molecular Diagnosis and Therapy*, 21(1), 45–57.  
<https://doi.org/10.1007/s40291-016-0236-x>

- Baczyk, D., Satkunarathnam, A., Nait-Oumesmar, B., Huppertz, B., Cross, J. C., & Kingdom, J. C. P. (2004). Complex patterns of GCM1 mRNA and protein in villous and extravillous trophoblast cells of the human placenta. *Placenta*, 25(6), 553–559. <https://doi.org/10.1016/j.placenta.2003.12.004>
- Bancroft, J., & Gamble, M. (2008). *Theory and Practice of Histological Techniques* (6<sup>o</sup> Edition). Elsevier.
- Barr, S. C. (2009). Canine Chagas' Disease (American Trypanosomiasis) in North America. *Veterinary Clinics of North America - Small Animal Practice*, 39(6), 1055–1064. <https://doi.org/10.1016/j.cvsm.2009.06.004>
- Benirschke, K., Kaufmann, P., Baergen, R. (2006). *Pathology of the Human Placenta, 5th Edition*. Springer-Verlag New York.  
<https://doi.org/10.1007/b137920>
- Bertoli, G., Cava, C., & Castiglioni, I. (2015). Micrnas: New biomarkers for diagnosis, prognosis, therapy prediction and therapeutic tools for breast cancer. *Theranostics*, 5(10), 1122–1143. <https://doi.org/10.7150/thno.11543>
- Bisio, M., Seidenstein, M. E., Burgos, J. M., Ballering, G., Risso, M., Pontoriero, R., Moreau, M., Altcheh, J., Leguizamón, M. S., Freilij, H., Marceillac, M., & Schijman, A. G. (2011). Urbanization of congenital transmission of *Trypanosoma cruzi*: Prospective polymerase chain reaction study in pregnancy. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 105(10), 543–549. <https://doi.org/10.1016/j.trstmh.2011.07.003>
- Brennecke, J., Stark, A., Russell, R. B., & Cohen, S. M. (2005). Principles of

- microRNA-target recognition. *PLoS Biology*, 3(3), 0404–0418. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0030085>
- Burton, G. J., & Kaplan, C. G. (2022). Benirschke's Pathology of the Human Placenta. In *Benirschke's Pathology of the Human Placenta*. <https://doi.org/10.1007/978-3-030-84725-8>
- Carlier, Y., & Truyens, C. (2015). Congenital Chagas disease as an ecological model of interactions between *Trypanosoma cruzi* parasites, pregnant women, placenta and fetuses. *Acta Tropica*, 151(1), 103–115. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2015.07.016>
- Carlier, Y., Sosa-Estani, S., Luquetti, A. O., & Buekens, P. (2015). Congenital Chagas disease: An update. *Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz*, 110(3), 363–368. <https://doi.org/10.1590/0074-02760140405>
- Carlier, Y., Schijman, A. G., & Kemmerling, U. (2020). Placenta, *Trypanosoma cruzi*, and Congenital Chagas Disease. *Current Tropical Medicine Reports*, 7(4), 172–182. <https://doi.org/10.1007/s40475-020-00210-5>
- Carrillo, I., Droguett, D., Castillo, C., Liempi, A., Muñoz, L., Maya, J. D., Galanti, N., & Kemmerling, U. (2016). Caspase-8 activity is part of the BeWo trophoblast cell defense mechanisms against *Trypanosoma cruzi* infection. *Experimental Parasitology*, 168, 9–15. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2016.06.008>
- Castillo, C., Villarroel, A., Duaso, J., Galanti, N., Cabrera, G., Maya, J. D., & Kemmerling, U. (2013). Phospholipase C gamma and ERK1/2 Mitogen Activated Kinase Pathways are differentially modulated by *Trypanosoma cruzi* during tissue invasion in human placenta. *Experimental Parasitology*, 133(1), 12–17. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2012.10.012>

- Castillo, C., Muñoz, L., Carrillo, I., Liempi, A., Gallardo, C., Galanti, N., Maya, J. D., & 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*, 78(1), 1–8. <https://doi.org/10.1111/aji.12660>
- Castillo, C., Muñoz, L., Carrillo, I., Liempi, A., Medina, L., Galanti, N., Maya, J. D., & 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. <https://doi.org/10.1016/j.placenta.2017.10.005>
- 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 and Vectors*, 11(1), 1–13. <https://doi.org/10.1186/s13071-018-2988-0>
- Chang, S. Y., Lee, S. N., Yang, J. Y., Kim, D. W., Yoon, J. H., Ko, H. J., Ogawa, M., Sasakawa, C., & Kweon, M. N. (2013). Autophagy controls an intrinsic host defense to bacteria by promoting epithelial cell survival: A murine model. *PLoS ONE*, 8(11), 1–12. <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, 1457–1462. [https://doi.org/10.3892/or\\_00000784](https://doi.org/10.3892/or_00000784)
- Dai, X., & Cai, Y. (2018). Down-regulation of microRNA let-7d inhibits the proliferation and invasion of trophoblast cells in preeclampsia. *Journal of*

- Cellular Biochemistry*, 119(1), 1141–1151. <https://doi.org/10.1002/jcb.26282>
- Daly, M., & Driscoll, L. O. (2017). Chapter 5 MicroRNA Profiling of Exosomes. 1509, 37–46. <https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6524-3>
- De Oliveira, A. B. B., Alevi, K. C. C., Imperador, C. H. L., Madeira, F. F., & De Azeredo-Oliveira, M. T. V. (2018). Parasite-vector interaction of chagas disease: A mini-review. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 98(3), 653–655. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.17-0657>
- De Rie, D., Abugessaisa, I., Alam, T., Arner, E., Arner, P., Ashoor, H., Åström, G., Babina, M., Bertin, N., Burroughs, A. M., Carlisle, A. J., Daub, C. O., Detmar, M., Deviatiiarov, R., Fort, A., Gebhard, C., Goldowitz, D., Guhl, S., Ha, T. J., ... De Hoon, M. J. L. (2017). An integrated expression atlas of miRNAs and their promoters in human and mouse. *Nature Biotechnology*, 35(9), 872–878. <https://doi.org/10.1038/nbt.3947>
- 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), 417–424. <https://doi.org/10.1093/molehr/gas013>
- Droguett, D., Carrillo, I., Castillo, C., Gómez, F., Negrete, M., Liempi, A., Muñoz, L., Kemmerling, U., Galanti, N., & Maya, J. D. (2017). Trypanosoma cruzi induces cellular proliferation in the trophoblastic cell line BeWo. *Experimental Parasitology*, 173, 9–17. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2016.12.005>
- Duaso, J., Rojo, G., Cabrera, G., Galanti, N., Bosco, C., Maya, J. D., Morello, A., & Kemmerling, U. (2010). Trypanosoma cruzi induces tissue disorganization and destruction of chorionic villi in an ex vivo infection model of human placenta. *Placenta*, 31(8), 705–711.

<https://doi.org/10.1016/j.placenta.2010.05.007>

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

Duaso, J., Castillo, C., & Kemmerling, U. (2012a). Mechanism of Congenital Chagas Disease: Effective Infection Depends on the Interplay Between Trypanosoma cruzi and the Different Tissue Compartments in the Chorionic Villi of the Human Placenta. *Recent Advances in Research on the Human Placenta*. <https://doi.org/10.5772/32799>

Duaso, J., Yañez, E., Castillo, C., Galanti, N., Cabrera, G., Corral, G., Maya, J. D., Zulantay, I., Apt, W., & Kemmerling, U. (2012b). Reorganization of extracellular matrix in placentas from women with asymptomatic chagas disease: Mechanism of parasite invasion or local placental defense? *Journal of Tropical Medicine*, 2012. <https://doi.org/10.1155/2012/758357>

Esteller, M. (2011). Non-coding RNAs in human disease. *Nature Reviews Genetics*, 12(12), 861–874. <https://doi.org/10.1038/nrg3074>

Ferreira, L. R. P., Ferreira, F. M., Laugier, L., Cabantous, S., Navarro, I. C., Da Silva Cândido, D., Rigaud, V. C., Real, J. M., Pereira, G. V., Pereira, I. R., Ruivo, L., Pandey, R. P., Savoia, M., Kalil, J., Lannes-Vieira, J., Nakaya, H., Chevillard, C., & Cunha-Neto, E. (2017). Integration of miRNA and gene expression profiles suggest a role for miRNAs in the pathobiological processes of acute Trypanosoma cruzi infection. *Scientific Reports*, 7(1), 1–12. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-18080-9>

Forbes, K., & Westwood, M. (2010). Maternal growth factor regulation of human

- placental development and fetal growth. *Journal of Endocrinology*, 207(1), 1–16. <https://doi.org/10.1677/JOE-10-0174>
- Franzén, O., Arner, E., Ferella, M., Nilsson, D., Respuela, P., Carninci, 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>
- Gauster, M., Moser, G., Orendi, K., & Huppertz, B. (2009). Factors Involved in Regulating Trophoblast Fusion: Potential Role in the Development of Preeclampsia. *Placenta*, 30(SUPPL.), 49–54. <https://doi.org/10.1016/j.placenta.2008.10.011>
- Gauster, M., & Huppertz, B. (2010). The paradox of caspase 8 in human villous trophoblast fusion. *Placenta*, 31(2), 82–88. <https://doi.org/10.1016/j.placenta.2009.12.007>
- 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>
- Ha, M., & Kim, V. N. (2014). Regulation of microRNA biogenesis. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 15(8), 509–524. <https://doi.org/10.1038/nrm3838>
- Hayder, H., O'Brien, J., Nadeem, U., & Peng, C. (2018). MicroRNAs: Crucial regulators of placental development. *Reproduction*, 155(6), 1–39. <https://doi.org/10.1530/REP-17-0603>
- Hromadnikova, I., Kotlabova, K., Ondrackova, M., Pirkova, P., Kestlerova, A., Novotna, V., Hympanova, L., & Krofta, L. (2015). Expression profile of C19MC

- microRNAs in placental tissue in pregnancy-related complications. *DNA and Cell Biology*, 34(6), 437–457. <https://doi.org/10.1089/dna.2014.2687>
- 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)
- Janeway, C., & Traver, P. (2004). Immunobiology: The Immune System in Health and Disease. *Garland Science*, 6th Editio, 264–275.
- Jercic, M. I., Mercado, R., & Villarroel, R. (2010). Congenital Trypanosoma cruzi infection in neonates and infants from two regions of Chile where Chagas' disease is endemic. *Journal of Clinical Microbiology*, 48(10), 3824–3826. <https://doi.org/10.1128/JCM.00048-10>
- Kasper, C. A., Sorg, I., Schmutz, C., Tschon, T., Wischnewski, H., Kim, M. L., & Arriemerlou, C. (2010). Cell-cell propagation of NF-κB transcription factor and MAP kinase activation amplifies innate immunity against bacterial infection. *Immunity*, 33(5), 804–816. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2010.10.015>
- Kemmerling, U., Bosco, C., & Galanti, N. (2010). Infection and invasion mechanisms of Trypanosoma cruzi in the. *Medecine Et Hygiene*, 307–316. [https://scielo.conicyt.cl/scielo.php?pid=S0716-97602010000300007&script=sci\\_arttext](https://scielo.conicyt.cl/scielo.php?pid=S0716-97602010000300007&script=sci_arttext)
- 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>



- Kim, Y. K., & Kim, V. N. (2007). Processing of intronic microRNAs. *EMBO Journal*, 26(3), 775–783. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7601512>
- Komine-Aizawa, S., Majima, H., & Yoshida-Noro, C. (n.d.). (2008). *PDFlib PLOP : PDF Linearization , Optimization , Protection Page inserted by evaluation version Stimuli through Toll-like receptor (TLR) 3 and 9 affect human chorionic gonadotropin (hCG) production in a choriocarcinoma cell line.* <https://doi.org/10.1111/j.1447-0756.2008.00752.x>
- Kredo-Russo, S., & Hornstein, E. (2011). MicroRNA knock down by cholesterol-conjugated antisense oligos in mouse organ culture. *Methods Mol Biol*, 732, 89–97.
- Kurokawa, M., & Kornbluth, S. (2009). Caspases and Kinases in a Death Grip. *Cell*, 138(5), 838–854. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.08.021>
- Li, J., Smyth, P., Flavin, R., Cahill, S., Denning, K., Aherne, S., Guenther, S. M., O’Leary, J. J., & Sheils, O. (2007). Comparison of miRNA expression patterns using total RNA extracted from matched samples of formalin-fixed paraffin-embedded (FFPE) cells and snap frozen cells. *BMC Biotechnology*, 7, 1–6. <https://doi.org/10.1186/1472-6750-7-36>
- Liang, Y., Ridzon, D., Wong, L., & Chen, C. (2007). Characterization of microRNA expression profiles in normal human tissues. *BMC Genomics*, 8, 1–20. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-8-166>
- 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), 1035–1042. <https://doi.org/10.1016/j.placenta.2014.09.017>

- 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*, 123–129. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2016.08.022>
- Liempi, A., Castillo, C., Medina, L., Rojas, M., Maya, J. D., Parraguez, V. H., & 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*(April), 105153. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2019.105153>
- Lin, S., Cheung, W. K. C., Chen, S., Lu, G., Wang, Z., Xie, D., Li, K., Lin, M. C. M., & Kung, H. F. (2010). Computational identification and characterization of primate-specific microRNAs in human genome. *Computational Biology and Chemistry*, *34*(4), 232–241. <https://doi.org/10.1016/j.compbiolchem.2010.08.001>
- Linhares-Lacerda, L., Palu, C. C., Ribeiro-Alves, M., Paredes, B. D., Morrot, A., Garcia-Silva, M. R., Cayota, A., & Savino, W. (2015). Differential expression of microRNAs in thymic epithelial cells from *Trypanosoma cruzi* acutely infected mice: Putative role in thymic atrophy. *Frontiers in Immunology*, *6*(AUG), 1–12. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2015.00428>
- Lowe, D. E., Robbins, J. R., & Bakardjiev, A. I. (2018). Animal and human tissue models of vertical *Listeria monocytogenes* transmission and implications for other pregnancy-associated infections. *Infection and Immunity*, *86*(6). <https://doi.org/10.1128/IAI.00801-17>
- Lu, J., Getz, G., Miska, E. A., Alvarez-Saavedra, E., Lamb, J., Peck, D., Sweet-

- Cordero, A., Ebert, B. L., Mak, R. H., Ferrando, A. A., Downing, J. R., Jacks, T., Horvitz, H. R., & Golub, T. R. (2005). MicroRNA expression profiles classify human cancers. *Nature*, *435*(7043), 834–838. <https://doi.org/10.1038/nature03702>
- Luján, C. D., Triquell, M. F., Sembaj, A., Guerrero, C. E., & Fretes, R. E. (2004). Trypanosoma cruzi: Productive infection is not allowed by chorionic villous explant from normal human placenta in vitro. *Experimental Parasitology*, *108*(3–4), 176–181. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2004.07.013>
- Luo, S.-S., Ishibashi, O., Ishikawa, G., Ishikawa, T., Katayama, A., Mishima, T., Takizawa, T., Shigihara, T., Goto, T., Izumi, A., Ohkuchi, A., Matsubara, S., Takeshita, T., & Takizawa, T. (2009). Human Villous Trophoblasts Express and Secrete Placenta-Specific MicroRNAs into Maternal Circulation via Exosomes<sup>1</sup>. *Biology of Reproduction*, *81*(4), 717–729. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.108.075481>
- Lycoudi, A., Mavreli, D., Mavrou, A., Papantoniou, N., & Kolialexi, A. (2015). MIRNAs in pregnancy-related complications. *Expert Review of Molecular Diagnostics*, *15*(8), 999–1010. <https://doi.org/10.1586/14737159.2015.1053468>
- Maccani, M. A., Padbury, J. F., & Marsit, C. J. (2011). miR-16 and miR-21 expression in the placenta is associated with fetal growth. *PLoS ONE*, *6*(6). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0021210>
- 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), 229–240. <https://doi.org/10.1016/j.placenta.2014.01.011>
- Medina, L., Castillo, C., Liempi, A., Herbach, M., Cabrera, G., Valenzuela, L.,

- Galanti, N., de los Angeles Curto, M., Schijman, A. G., & Kemmerling, U. (2018). Differential infectivity of two *Trypanosoma cruzi* strains in placental cells and tissue. *Acta Tropica*, 186(July), 35–40. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2018.07.001>
- Medina, L., Castillo, C., Liempi, A., Guerrero-Muñoz, J., Rojas-Pirela, M., Maya, J. D., Prieto, H., & Kemmerling, U. (2020). *Trypanosoma cruzi* and *Toxoplasma gondii* Induce a Differential MicroRNA Profile in Human Placental Explants. *Frontiers in Immunology*, 11(November), 1–14. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.595250>
- Min, P. K., & Chan, S. Y. (2015). The biology of circulating microRNAs in cardiovascular disease. *European Journal of Clinical Investigation*, 45(8), 860–874. <https://doi.org/10.1111/eci.12475>
- Ministerio de Salud. (2016). *Informe Programa Nacional Integral de Enfermedad de Chagas*. 1–30. <http://epi.minsal.cl/chagas-materiales-relacionados/>
- Moore, K., & Perseaud, T. V. N. (2004). The Developing Human, Clinically Oriented Embryology. *Elsevier, 7th Editio*.
- Mor, G., Aldo, P., & Alvero, A. B. (2017). The unique immunological and microbial aspects of pregnancy. *Nature Reviews Immunology*, 17(8), 469–482. <https://doi.org/10.1038/nri.2017.64>
- Morales-Prieto, D. M., Chaiwangyen, W., Ospina-Prieto, S., Schneider, U., Herrmann, J., Gruhn, B., & Markert, U. R. (2012). MicroRNA expression profiles of trophoblastic cells. *Placenta*, 33(9), 725–734. <https://doi.org/10.1016/j.placenta.2012.05.009>
- Morales-Prieto, D. M., Ospina-Prieto, S., 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>
- Mouillet, J. F., Ouyang, Y., Coyne, C. B., & Sadovsky, Y. (2015). MicroRNAs in placental health and disease. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 213(4), S163–S172. <https://doi.org/10.1016/j.ajog.2015.05.057>
- Muñoz-Saravia, S. G., 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. <https://doi.org/10.1007/s10741-010-9211-5>
- Navarro, I. C., Ferreira, F. M., Nakaya, H. I., Baron, M. A., Vilar-Pereira, G., Pereira, I. R., Silva, A. M. G., Real, J. M., De Brito, T., Chevillard, C., Lannes-Vieira, J., Kalil, J., Cunha-Neto, E., & Ferreira, L. R. P. (2015). MicroRNA transcriptome profiling in heart of trypanosoma cruzi-infected mice: Parasitological and cardiological Outcomes. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 9(6), 1–17. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0003828>
- Nizyaeva, N. V., Kulikova, G. V., Nagovitsyna, M. N., Kan, N. E., Prozorovskaya, K. N., Shchegolev, A. I., & Sukhikh, G. T. (2017). Expression of MicroRNA-146a and MicroRNA-155 in Placental Villi in Early- and Late-Onset Preeclampsia. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*, 163(3), 394–399. <https://doi.org/10.1007/s10517-017-3812-0>
- 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>

- Obad, S., Dos Santos, C. O., Petri, A., Heidenblad, M., Broom, O., Ruse, C., Fu, C., Lindow, M., Stenvang, J., Straarup, E. M., Hansen, H. F., Koch, T., Pappin, D., Hannon, G. J., & Kauppinen, S. (2011). Silencing of microRNA families by seed-targeting tiny LNAs. *Nature Genetics*, *43*(4), 371–380. <https://doi.org/10.1038/ng.786>
- Orendi, K., Kivity, V., Sammar, M., Grimpel, Y., Gonen, R., Meiri, H., Lubzens, E., & Huppertz, B. (2011). Placental and trophoblastic in vitro models to study preventive and therapeutic agents for preeclampsia. *Placenta*, *32*(SUPPL. 1), S49–S54. <https://doi.org/10.1016/j.placenta.2010.11.023>
- Ortiz, S., Zulantay, I., Solari, A., Bisio, M., Schijman, A., Carlier, Y., & Apt, W. (2012). Presence of *Trypanosoma cruzi* in pregnant women and typing of lineages in congenital cases. *Acta Tropica*, *124*(3), 243–246. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2012.08.001>
- Ottosen, S., Parsley, T. B., Yang, L., Zeh, K., Van Doorn, L. J., Van Der Veer, E., Raney, A. K., Hodges, M. R., & Patick, A. K. (2015). In Vitro antiviral activity and preclinical and clinical resistance profile of miravirsen, a novel anti-hepatitis C virus therapeutic targeting the human factor miR-122. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *59*(1), 599–608. <https://doi.org/10.1128/AAC.04220-14>
- Pfaffl, M. W. (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT – PCR. *Nucleic Acids Research*, *29*(9), 16–21. <https://doi.org/10.1093/nar/29.9.e45>.
- Pidoux, G., Gerbaud, P., Cocquebert, M., Segond, N., Badet, J., Fournier, T., Guibourdenche, J., & Evain-Brion, D. (2012). Review: Human trophoblast fusion and differentiation: Lessons from trisomy 21 placenta. *Placenta*,

33(SUPPL.), S81–S86. <https://doi.org/10.1016/j.placenta.2011.11.007>

Prata, A. (2001). Clinical and epidemiological aspects of chagas disease. *Lancet infection disease. Clinical and Epidemiological Aspects of Chagas Disease*, 1(September), 92–100. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(01\)00065-2](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(01)00065-2)

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 Trypanosomiasis (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*, 1–17. <https://doi.org/10.1002/cpcb.15>

Requena-Méndez, A., Aldasoro, E., de Lazzari, E., Sicuri, E., Brown, M., Moore, D. A. J., Gascon, J., & Muñoz, J. (2015). Prevalence of Chagas Disease in Latin-American Migrants Living in Europe: A Systematic Review and Meta-analysis. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 9(2), 1–16. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0003540>

Rojo, G., Castillo, C., Duaso, J., Liempi, A., Droguett, D., Galanti, N., Maya, J. D., López-Muñoz, R., & Kemmerling, U. (2014). Toxic and therapeutic effects of Nifurtimox and Benznidazol on *Trypanosoma cruzi* ex vivo infection of human placental chorionic villi explants. *Acta Tropica*, 132(1), 112–118. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2014.01.002>

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*

*Harbor Perspectives in Medicine*, 5(8), 1–16.  
<https://doi.org/10.1101/cshperspect.a023036>

- Salas, C., Tapia, R. A., Ciudad, K., Orellana, M., Kemmerling, U., Ferreira, J., Diego, J., & Morello, A. (2008). *Trypanosoma cruzi*: Activities of lapachol and a - and b -lapachone derivatives against epimastigote and trypomastigote forms. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 16, 668–674.  
<https://doi.org/10.1016/j.bmc.2007.10.038>
- 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>
- Souza, W. (2002). Basic Cell Biology of *Trypanosoma cruzi*. *Current Pharmaceutical Design*, 8(4), 269–285.  
<https://doi.org/10.2174/1381612023396276>
- Stillwaggon, E., Perez-Zetune, V., Bialek, S. R., & Montgomery, S. P. (2018). Congenital chagas disease in the United States: Cost savings through maternal screening. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 98(6), 1733–1742. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.17-0818>
- Sun, C., Zhu, J., Wu, B., Chen, J., Zhu, Z., Cai, P., Guo, W., Gu, Z., Wang, J., & Huang, S. (2018). Diagnostic and prognostic value of microRNAs in cholangiocarcinoma: A systematic review and meta-analysis. *Cancer Management and Research*, 10, 2125–2139.  
<https://doi.org/10.2147/CMAR.S158155>
- Syme, M. R., Paxton, J. W., & Keelan, J. a. (2004). Human Placenta. *Clinical*



*Pharmacokinetics*, 43(8), 487–514.

- Tustin, A., & Bowman, N. (2016). Chagas disease. *Pediatrics in Review*, 37(4)(7301 SUPPL.), 177–178. <https://doi.org/10.1038/465S3a>
- Van Der Ree, M. H., Van Der Meer, A. J., Van Nuenen, A. C., De Bruijne, J., Ottosen, S., Janssen, H. L., Kootstra, N. A., & Reesink, H. W. (2016). Miravirsen dosing in chronic hepatitis C patients results in decreased microRNA-122 levels without affecting other microRNAs in plasma. *Alimentary Pharmacology and Therapeutics*, 43(1), 102–113. <https://doi.org/10.1111/apt.13432>
- Vasudevan, S. (2012). Posttranscriptional Upregulation by MicroRNAs. *Wiley Interdisciplinary Reviews: RNA*, 3(3), 311–330. <https://doi.org/10.1002/wrna.121>
- Villares, M., Berthelet, J., & Weitzman, J. B. (2020). The clever strategies used by intracellular parasites to hijack host gene expression. *Seminars in Immunopathology*, 42(2), 215–226. <https://doi.org/10.1007/s00281-020-00779-z>
- 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.
- WHO. (2015). Chagas disease in Latin America: an epidemiological update based on 2010 estimates. *Relevé Épidémiologique Hebdomadaire / Section d'hygiène Du Secrétariat de La Société Des Nations = Weekly Epidemiological Record / Health Section of the Secretariat of the League of Nations*, 90(6), 33–43.

- Zhang, Y. C., 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), 9853–9862. <https://doi.org/10.3748/wjg.v21.i34.9853>
- Zheng, Y., Cai, X., & Bradley, J. E. (2013). MicroRNAs in parasites and parasite infection. *RNA Biology*, 10(3), 377–385. <https://doi.org/10.4161/rna.23716>
- Zingales, B. (2018). Trypanosoma cruzi genetic diversity: Something new for something known about Chagas disease manifestations, serodiagnosis and drug sensitivity. *Acta Tropica*, 184, 38–52. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2017.09.017>

## 8. ANEXOS

### Anexo 1. Consentimiento informado



#### 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. Certificado requerimientos básicos de bioseguridad



FACULTAD DE  
**MEDICINA**  
UNIVERSIDAD DE CHILE

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  
**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. Aprobación comité de ética



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 Tryjpanosoma 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  
lorena.carrasco@rdsalud.gov.cl  
Fono (56-2) 2575 8506  
www.ssmn.cl