



UNIVERSIDAD DE CHILE



FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS
ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS

INFECCIÓN *EX VIVO* DE VELLOSIDADES
CORIÓNICAS HUMANAS CON *Trypanosoma cruzi*: ACCIÓN DE
LAS ENZIMAS PROTEOLÍTICAS CRUZIPAÍNA Y
METALOPROTEINASAS 2 Y 9

CHRISTIAN RAUL CASTILLO RIVAS

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

Financiamiento: Proyectos Bicentenario Anillo 112 y FONDECYT 11080166

SANTIAGO, CHILE
2011



UNIVERSIDAD DE CHILE

FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS
ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS

INFECCIÓN *EX VIVO* DE VELLOSIDADES CORIÓNICAS HUMANAS CON *Trypanosoma cruzi*: ACCIÓN DE LAS ENZIMAS PROTEOLÍTICAS CRUZIPAÍNA Y METALOPROTEINASAS 2 Y 9

CHRISTIAN RAUL CASTILLO RIVAS

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

NOTA FINAL:

		NOTA:	FIRMA:
PROFESOR GUÍA:	ULRIKE KEMMERLING
PROFESOR CONSEJERO:	FERNANDO FREDES
PROFESOR CONSEJERO:	MARIA SOLEDAD FERNANDEZ

Financiamiento: Proyectos Bicentenario Anillo 112 y FONDECYT 11080166

SANTIAGO, CHILE
2011

ÍNDICE

RESUMEN	1
SUMMARY	2
INTRODUCCIÓN	3
REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	5
Epidemiología.....	5
Ciclo de vida de <i>Trypanosoma cruzi</i>	6
Vías de transmisión.....	8
Fases de la Enfermedad de Chagas	9
Enfermedad de Chagas congénita	10
Diagnóstico de la enfermedad de Chagas Congénita	11
La Placenta	12
Infección <i>ex vivo</i> de vellosidades coriónicas placentarias con <i>Trypanosma cruzi</i>	12
Mecanismos de infección e invasión tisular	13
Cruzipaína	14
Inhibidores endógenos parasitarios de la cruzipaína	15
Inhibidores de las Cisteína-proteasas sintetizados por las células mamíferas	16
Rol de las metaloproteinasas en la destrucción de la matriz extracelular.....	16
Otras proteasas de <i>T. cruzi</i> que interactúan con la matriz extracelular	17
HIPÓTESIS.....	19
OBJETIVO GENERAL	19
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	19
MATERIALES Y MÉTODOS	20
RESULTADOS.....	28
DISCUSIÓN.....	32

CONCLUSIONES	36
FIGURAS.....	37
FIGURA 1: Ciclo de vida de <i>Trypanosoma cruzi</i>	37
FIGURA 2: Estimación de la población mundial infectada con <i>T. cruzi</i>	38
FIGURA 3: Barrera placentaria.....	39
FIGURA 4: <i>T. cruzi</i> induce la expresión de MMP-2, la que no es inhibida por doxiciclina	40
FIGURA 5: <i>T. cruzi</i> induce la expresión de MMP-9, la que no es inhibida por doxiciclina	41
FIGURA 6: <i>T. cruzi</i> induce la expresión de MMP-2, la que no es inhibida por doxiciclina	42
FIGURA 7: <i>T. cruzi</i> induce la expresión de MMP-9, la que no es inhibida por doxiciclina	43
FIGURA 8: <i>T. cruzi</i> induce actividad de MMP-2 y MMP-9.....	44
FIGURA 9: <i>T. cruzi</i> induce actividad de MMP-2.....	45
FIGURA 10: <i>T. cruzi</i> induce actividad de MMP-9.....	46
FIGURA 11: La inhibición de la actividad de la Cruzipaína y las Metaloproteinasas 2 y 9 no impide la infección de los explantes de vellosidades coriónicas por tripomastigotes de <i>T.</i> <i>cruzi</i>	47
FIGURA 12: La inhibición de las metaloproteínas previene la destrucción de moléculas glicosiladas de la matriz extracelular	48
FIGURA 13: La inhibición de la actividad de la Cruzipaína y las Metaloproteinasas previene parcialmente la destrucción de la matriz extracelular vellositaria.	49
BIBLIOGRAFÍA.....	50
ANEXOS.....	57
ANEXO 1: Consentimiento informado.....	57
ANEXO 2: Certificado de Bioseguridad	59
ANEXO 3: Aprobación comité de ética humana	61

RESUMEN

La enfermedad de Chagas congénita es causada por el parásito hemoflagelado *Trypanosoma cruzi* que alcanza al feto atravesando la barrera placentaria. Durante la invasión tisular *T. cruzi* induce destrucción de la matriz extracelular (MEC) mediante secreción de proteasas como Cruzipaína (Cz) e inducción de la expresión y activación de proteasas propias del tejido como las metaloproteinasas de la matriz (MMPs). La posible participación de estas proteasas en placenta humana durante la transmisión congénita no ha sido estudiada.

Se analizó la expresión y actividad de las MMP 2 y 9 durante la infección *ex vivo* de vellosidades coriónicas placentarias humanas con el parásito. Se determinó la participación de estas MMPs y de Cz en la degradación de moléculas glicosiladas y del colágeno tipo I del tejido conectivo fetal. Adicionalmente se evaluó el efecto de inhibidores para ambos tipos de proteasas tanto sobre los efectos tisulares de la invasión parasitaria como sobre su infectividad.

Se obtuvieron tripomastigotes de la cepa Dm28c a partir de células Vero infectadas y placentas de término de madres sanas. Se incubaron trozos de tejido placentario (0,5 cm³) durante 24 horas en presencia y ausencia de 10⁵ y 10⁶ tripomastigotes y en presencia y ausencia de inhibidores para Cz (E-64) y para MMP (doxiciclina). La infección placentaria se comprobó mediante detección del parásito por PCR. Las MMP se analizaron mediante Western Blot, Inmunohistoquímica y Zimografía. Las modificaciones estructurales de colágeno I se determinaron histoquímicamente mediante la tinción de picro rojo sirio y las alteraciones de moléculas glicosiladas mediante tinción de ácido periódico de Schiff.

La expresión y activación de las MMPs depende de la cantidad de parásitos usados. La inhibición de la actividad proteolítica de Cz y las MMP previene la destrucción de colágeno tipo I y alteraciones de moléculas glicosiladas inducida por *T. cruzi*. La inhibición de la actividad de las proteasas no previene la infección *ex vivo* del parásito.

Se concluye que tanto proteasas parasitarias así como propias del tejido a infectar constituyen parte de los mecanismos de infección tisular de *T. cruzi*.

SUMMARY

Congenital Chagas disease is caused by the hemoflagellated protozoan *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*). This parasite is able to cross the placental barrier and infect the fetus. During tissue invasion, the parasite induces the destruction of the extracellular matrix by the secretion of its own proteases, such as Cruzipain (Cz), and by the induction and activation of tissue matrix metalloproteinases (MMPs). The role of these proteases during congenital transmission of Chagas disease has not yet been studied.

The expression and activity of MMPs 2 and 9 during *ex vivo* infection with the parasite of human placental chorionic villi was analyzed. The effect on glycosylated molecules and collagen I disorganization was determined. Additionally, the effect of MMP's inhibitor doxycycline on tissue destruction and infectivity was evaluated.

Trypomastigotes of Dm28c strain were obtained from VERO cells cultures and healthy term placentas were used. Chorionic villi tissue samples of 0.5 cm³ were incubated for 24 hours in the presence and absence of 10⁵ or 10⁶ trypomastigotes and in presence and absence of E64 (Cz inhibitor) or doxycycline (MMPs inhibitor). The placental infection was confirmed by PCR. The MMPs expression was assayed by Western Blot and Immunohistochemistry and the activity by Zymography. Alteration in glycosylated molecules and structural modifications of collagen I was determined histochemically with the PAS and Picro Sirius Red methods, respectively.

T. cruzi induces MMP-2 and MMP-9 expression and activity in *ex vivo* infected human chorionic villi in a parasite concentration manner. MMP-2/MMP-9 and cruzipain protease inhibitors prevent extracellular matrix (ECM) destruction induced by the parasite. However, these inhibitors did not impair *ex vivo* infection of human chorionic villi explants by *T. cruzi*

We conclude that parasite proteases as well as endogenous proteases of the tissue that is being infected are part of the infection and invasion mechanism of *T. cruzi*.

INTRODUCCIÓN

La enfermedad de Chagas es producida por el parásito hemoflagelado (*Trypanosoma cruzi*). Su ciclo de vida es indirecto con participación de insectos hematófagos de la familia Reduviidae. Como consecuencia de programas continentales de control del insecto vector, la importancia de la transmisión vectorial es cada día menor. Sin embargo, de los nuevos casos anuales, aproximadamente un tercio corresponde a la transmisión congénita. Debido a la migración de individuos infectados desde Latinoamérica hacia países no-endémicos, se ha generado el concepto de la “globalización de la enfermedad de Chagas”, ya que mediante transfusiones de sangre, trasplantes de órganos y por transmisión materno-fetal, el parásito se ha diseminado por todo el mundo, obligando a crear programas internacionales de diagnóstico y tratamiento de la enfermedad

Para lograr alcanzar al feto, el parásito debe atravesar la barrera placentaria. Durante el proceso de invasión tisular, *T. cruzi* induce destrucción de la matriz extracelular (MEC) mediante secreción de proteasas propias como Cruzipaína (Cz), e inducción de la expresión y activación de proteasas endógenas del tejido como las metaloproteinasas de la matriz (MMPs). La posible participación de estas proteasas en la placenta humana durante la transmisión congénita de *T. cruzi* no ha sido estudiada.

Analizamos la expresión y actividad de las MMPs 2 y 9 durante la infección *ex vivo* de las vellosidades coriónicas placentarias. Adicionalmente se evaluó el efecto de la inhibición de estas MMPs así como de Cz sobre la destrucción de la MEC y en relación a la infectividad parasitaria.

En esta memoria de título se estudiaron los mecanismos de infección e invasión tisular de *T. cruzi*, específicamente en la placenta humana. El parásito debe atravesar la barrera placentaria y alcanzar la sangre fetal durante la infección congénita. El rol de diversas proteasas está ampliamente estudiado en modelos *in vitro*, y se les han asignado múltiples roles en distintas etapas de la infección. Sin embargo, hay muy pocos trabajos que abordan la compleja interacción entre el parásito y los tejidos del

hospedero. Por primera vez se estudia la participación de proteasas como mecanismo de invasión parasitario en la enfermedad de Chagas congénita.

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

La enfermedad de Chagas es una enfermedad parasitaria endémica en Latinoamérica cuyo agente etiológico es el protozoo hemoflagelado *Trypanosoma cruzi* (*T.cruzi*). Este parásito se transmite a mamíferos, incluido el hombre, por insectos triatomíneos de la subfamilia *Triatominae*, conocidos coloquialmente como vinchucas. A pesar de que la enfermedad se conoce desde 1909 gracias al trabajo de Carlos Chagas, continúa siendo una de las mayores preocupaciones de Salud Pública en nuestro continente.

Epidemiología

Se estima que un cuarto de la población latinoamericana se encuentra bajo riesgo de adquirir la infección, tomando en cuenta la distribución geográfica de los insectos vectores y los múltiples reservorios involucrados en los diversos ciclos de transmisión. La enfermedad se distribuye desde el norte de México hasta el sur de Chile y Argentina (World Health Organization, 2007).

La Organización Mundial de la Salud (OMS) clasifica la enfermedad de Chagas como una enfermedad tropical abandonada. Esta designación implica que esta patología se asocia a condiciones socioeconómicas desfavorables, afectando principalmente poblaciones vulnerables, incluyendo grupos indígenas y rurales, mujeres, niños y ancianos. La pobreza constituye un factor de riesgo de la enfermedad de Chagas. Por otra parte, el gran impacto económico de esta patología contribuye, a su vez, a la mantención del estatus de pobreza (Parker y Sethi, 2011).

En los países latinoamericanos, los costos directos e indirectos, incluyendo el gasto del tratamiento y la pérdida de productividad atribuible a la enfermedad de Chagas varían desde 40 a 800 millones de dólares por país cada año. Más aún, en su conjunto, Latinoamérica experimenta pérdidas económicas totales de 18.000 millones

de dólares anuales como resultado de la temprana morbilidad y mortalidad asociada con la enfermedad (Parker y Sethi, 2011).

Debido a la importancia de la enfermedad, se iniciaron programas de control con el objetivo de interrumpir los ciclos de transmisión doméstico y peridoméstico. Estos programas incluyen el control químico de los vectores, control de reservorios animales y de personas infectadas, además de la implementación de iniciativas de mejoramiento de las condiciones de vida y educación. Actualmente, a nivel mundial, el número de nuevos casos anuales es de aproximadamente 41.200 a los cuales la transmisión congénita contribuye con aproximadamente 14.300 casos. Por ende, la transmisión congénita adquiere cada vez más importancia epidemiológica, siendo además parcialmente responsable del fenómeno de la “globalización de la enfermedad de Chagas” (World Health Organization, 2007).

La “globalización de la enfermedad de Chagas” es un fenómeno que se debe a la migración de individuos infectados desde países endémicos por motivos económicos y/o políticos a partir de la década de 1970 hacia países no endémicos, principalmente Estados Unidos y España, además de otros países como Australia, Canadá, Japón y otros miembros de la Unión Europea (Schmunis, 2007). Así por ejemplo, se estima que 300.000 personas infectadas viven actualmente en Estados Unidos, e incluso en bancos de sangre de ese país se han reportado, desde 2007 a la fecha, 800 muestras positivas (Parker y Sethi, 2011). Adicionalmente, muchas de las personas infectadas son mujeres en edad reproductiva que potencialmente pueden transmitir la enfermedad a sus hijos. No obstante lo anterior, una encuesta demostró que solo el 8,8% de los ginecólogos de Estados Unidos está al tanto del riesgo de la infección congénita de la enfermedad de Chagas (Verani *et al.*, 2010), por lo que presumiblemente la real relevancia de la transmisión congénita podría ser aún mayor.

Ciclo de vida de *Trypanosoma cruzi*

Al menos 40 especies de triatomíneos son capaces de transmitir *T. cruzi* a lo largo de sus vidas (que pueden alcanzar hasta 2 años) (Texeira *et al.*, 2006). Además de los humanos, se sabe que más de 100 mamíferos, incluyendo perros, gatos, ratas,

perezosos, armadillos y murciélagos son reservorios del parásito. Debido al “canibalismo” entre los insectos triatominos, *T. cruzi* también se puede diseminar a través de las poblaciones de insectos (Muñoz-Saravia *et al.*, 2010). Aves y reptiles son refractarios a la infección, ya que por ejemplo, se ha observado que luego de la inyección intramuscular o endovenosa de tripomastigotes estos desaparecen inmediatamente y no pueden ser recuperados desde la sangre (Texeira *et al.*, 2006).

El ciclo de vida de *T. cruzi* es complejo, con varias formas celulares tanto en el insecto vector como en los hospederos mamíferos. El insecto vector, a diferencia del hospedero mamífero, parece no sufrir alteraciones causadas por la infección del parásito. Las formas sanguíneas no-replicativas (tripomastigotes) y las formas replicativas intracelulares (amastigotes) son las formas celulares identificables en el hospedero mamífero, mientras que las formas replicativas extracelulares (epimastigotes) y las formas infectivas no replicativas (tripomastigotes metacíclicos) se encuentran en el vector triatomino (**Figura 1**) (Rassi *et al.*, 2010,).

El triatomino adquiere tripomastigotes sanguíneos luego de alimentarse de la sangre de un mamífero infectado. Una vez en el insecto vector, el tripomastigote se diferencia a la forma celular de epimastigote y se divide rápidamente en el intestino medio y anterior. En el intestino posterior, los epimastigotes se diferencian a tripomastigotes metacíclicos, que son depositados junto con las deyecciones en la piel del mamífero cuando el triatomino se alimenta nuevamente de sangre. El parásito es capaz de penetrar al nuevo hospedero si la piel está rota (por la misma picadura del insecto, por cortes o por abrasiones) o a través de mucosas como la de la boca y los párpados (Grayson, 2010). Una vez en el organismo, los tripomastigotes invaden a macrófagos y otras células presentadoras de antígenos, diferenciándose intracelularmente a amastigotes. Luego de una serie de divisiones celulares, los amastigotes se diferencian a tripomastigotes y como tales lisan la célula y son liberados al torrente sanguíneo desde donde pueden invadir cualquier otra célula nucleada o ser ingeridos por otro triatomino (Coura, 2007).

Respecto a las 3 formas celulares de *T. cruzi*, podemos mencionar que los tripomastigotes miden aproximadamente 20 μm de largo, son fusiformes y tienen un kinetoplasto subterminal. No son capaces de multiplicarse y son la única forma

infectante para los mamíferos, incluido el hombre. Los epimastigotes miden aproximadamente 20 μm de largo, su kinetoplasto es anterior al núcleo y también son fusiformes. Representan la forma replicativa del parásito en el intestino del insecto vector. Finalmente, los amastigotes representan la forma replicativa intracelular de *T. cruzi* en el hospedero mamífero, miden aproximadamente 2 micrómetros de diámetro, son redondeados y con flagelo no emergente (Prata, 2001).

Vías de transmisión

La enfermedad también puede ser transmitida por mecanismos no-vectoriales, como la transfusión de sangre, el trasplante de órganos y en forma congénita desde la madre al hijo. Formas menos frecuentes como infección por consumo de alimentos contaminados con tripomastigotes e infección por accidentes de laboratorio también han sido descritas. La transmisión por transfusión sanguínea y la congénita son las principales formas de infección en seres humanos que viven en zonas urbanas y en países no-endémicos.

El riesgo de infección a partir de una transfusión de sangre es menor al 10 ó 20% y depende de varios factores, incluyendo la concentración de parásitos en la sangre del donante, la composición de la sangre a transfundir y probablemente de la cepa del parásito. El riesgo de transmisión parece ser mayor en la transfusión de plaquetas que en la de los otros componentes de la sangre (Rassi *et al.*, 2010).

La transmisión de la infección a partir de un donante de órganos sólidos o médula ósea también es posible y ha sido bien documentada en Latinoamérica. En regiones no-endémicas, como EE.UU, Canadá y muchas regiones de Europa, se han documentado algunos pocos casos de infección mediada por transfusión y trasplantes, pero el número actual de casos podría ser significativamente mayor debido al gran número de inmigrantes provenientes de países latinoamericanos (**Fig. 2**) (World Health Organization, 2007; Rassi *et al.*, 2010) .

Ocasionalmente, la enfermedad de Chagas puede ser contraída por ingestión de alimentos o líquidos contaminados con *T. cruzi* o a través de accidentes de laboratorio. La transmisión oral es la causa de brotes regionales de infección aguda en áreas

desprovistas de insectos domiciliarios. Ingestión de alimentos contaminados como jugo de caña de azúcar, jugo de açai o carne cruda generalmente está asociada con una infección parasitaria masiva, que se traduce en una presentación aguda severa y alta mortalidad (Rassi *et al.*, 2010).

Fases de la Enfermedad de Chagas

La enfermedad de Chagas presenta 3 fases, una aguda, una indeterminada y finalmente una crónica.

La fase aguda se caracteriza por la presencia de parásitos en la sangre del paciente, pudiéndose demostrar la presencia de tripomastigotes por examen sanguíneo directo. En un 95% de los casos la fase aguda es asintomática. En los casos sintomáticos, las manifestaciones clínicas son fiebre, malasia, dolores musculares y articulares, somnolencia, temblores, diarrea, edema, alteraciones respiratorias, cianosis y coma. Considerando que el 5% de los pacientes con enfermedad aguda muere se puede estimar que la mortalidad de esta fase varia entre 1:2.500 y 1:5.000. La muerte en la fase aguda de la enfermedad es causada por miocarditis o meningoencefalitis, con complicaciones concurrentes como bronconeumonía (Texeira *et al.*, 2006).

Posteriormente, los casos con o sin síntomas de infección aguda pasan a las fases indeterminada y crónica, las cuales puede presentarse en cualquier grupo etario. Interesantemente, el 70% de los infectados no muestran ninguna manifestación detectable de la enfermedad de Chagas (Texeira *et al.*, 2011).

La fase indeterminada ha sido definida en base a los siguientes criterios: test serológico positivo para IgG y/o hallazgo de parásitos, ausencia de signos y síntomas de la enfermedad de Chagas, ausencia de anomalías al electrocardiograma, morfología cardíaca, esofágica y colónica normal al examen radiológico (Texeira *et al.*, 2011). Usando ese criterio, independientemente del área geográfica donde se realizaron los estudios, se ha estimado que dos tercios de los individuos infectados con *T. cruzi* se mantendrán en esta condición durante sus vidas productivas. Aproximadamente 12 millones de latinoamericanos permanecerán en esta fase, lo que no representa diferencias de su expectativa de vida respecto a la población

general (Texeira *et al.*, 2006). Se considera que un paciente que está en la fase indeterminada no muere por causa de la enfermedad de Chagas (Rassi *et al.* 2010).

La fase crónica de la enfermedad se desarrolla en aproximadamente un tercio de los individuos infectados. Las principales manifestaciones clínicas son alteraciones cardíacas y gastrointestinales. Las manifestaciones cardíacas constituyen el 94,5% de los casos. La insuficiencia cardíaca relacionada es la causa de muerte en el 58% de los pacientes, mientras que las arritmias se han asociado con muertes inesperadas en el 36,5%. El resto de los pacientes con enfermedad crónica presentan megasíndromes, que afectan al esófago (megaesófago) y al colon (megacolon) (Texeira *et al.*, 2006).

La enfermedad cardíaca crónica afecta a ambos géneros por igual, sin embargo, es más frecuentemente e individuos con edades entre 30 y 45 años. En el grupo de pacientes que muestra cambios progresivos en el electrocardiograma, pueden ocurrir muertes repentinas en el 37,5% de los casos. Es relevante el hecho de que el 58% de los pacientes con enfermedad de Chagas cardíaca crónica muere entre 7 meses y 2 años luego de la aparición de los síntomas. Los pacientes con enfermedad de Chagas con manifestaciones cardíacas o gastrointestinales pueden además mostrar lesiones diseminadas que involucran el sistema nervioso periférico simpático y parasimpático. Las lesiones neurológicas explicarían además las condiciones fisiopatológicas de corazón y los megasíndromes (Texeira *et al.*, 2006).

Enfermedad de Chagas congénita

La infección congénita por *T. cruzi* se asocia a partos prematuros, bajo peso al nacer, abortos y mortinatos. Los síntomas pueden observarse al nacimiento o desarrollarse varias semanas luego del parto. Se estima que el 50% de los recién nacidos prematuros de madres con enfermedad de Chagas mueren (Carlier, 2005). La fisiopatología exacta de la infección congénita no se conoce (World Health Organization, 2007). Se ha sugerido que el parásito alcanza al feto vía sanguínea atravesando la barrera placentaria. Se postula que la enfermedad de Chagas congénita deriva de una compleja interacción entre la respuesta inmune materna, factores

placentarios y características del parásito. (Carlier, 2005; Kemmerling *et al.*, 2010). Los conceptos “transmisión materno-fatal” o “transmisión vertical” tienen una connotación amplia que implica la transmisión desde una generación a la siguiente, incluyendo la transmisión prenatal, perinatal y la postnatal de parásitos vivos. El término “infección congénita con *T. cruzi*” se refiere tanto a los casos asintomáticos como sintomáticos de infección, mientras que el término “enfermedad de Chagas congénita” debería ser usado solo para casos sintomáticos (Carlier y Truyens, 2010).

Diagnóstico de la enfermedad de Chagas Congénita

Actualmente, solo la detección directa del parásito es usada para confirmar la infección al nacimiento. Sin embargo, luego de la edad de 9 meses, con la desaparición de los anticuerpos maternos, la serología convencional de Inmunoglobulina G permite el diagnóstico de la infección congénita (Mallimaci *et al.*, 2010).

La técnica del hematocrito es el método de elección para identificar la infección congénita debido a su sensibilidad y al pequeño monto de sangre necesaria. El examen microscópico de la sangre del cordón o de la sangre periférica del niño mediante esta técnica es recomendado durante el primer mes de vida. En centros especializados, ensayos basados en amplificación de DNA parasitario mediante *Polimerase Chain Reaction* (PCR) puede ser usado para diagnósticos tempranos de la infección congénita, y en este contexto la sensibilidad del PCR parece ser mayor que la examinación microscópica (Carlier y Truyens, 2010) .

Si el resultado es repetidamente negativo o si el exámen no fue hecho durante la vida temprana, el niño debe ser examinado por serología convencional para buscar anticuerpos IgG anti-*T. cruzi* preferentemente luego de la edad de 9 meses, ya que la desaparición de los anticuerpos maternos permite el diagnóstico certero de la infección congénita (Mallimaci *et al.*, 2010) .

La Placenta

La placenta es el principal lugar de intercambio de nutrientes y gases entre la madre y el feto (Moore y Persaud, 2004; Syme *et al.*, 2004). Adicionalmente, juega un rol importante en la síntesis de hormonas, péptidos y esteroides fundamentales para un embarazo exitoso (Syme *et al.*, 2004). La placenta se compone de una porción fetal desarrollada a partir del corión frondoso y una porción materna o decidua basal que procede del endometrio (Moore y Persaud, 2004; Cross, 2006). La membrana o barrera placentaria está formada por tejidos extrafetales que separan la sangre materna de la fetal. Esta barrera se compone hasta las 20 semanas del trofoblasto (epitelio bi-estratificado compuesto por sinciotrofoblasto y citotrofoblasto), tejido conectivo de las vellosidades coriónicas libres y endotelio de los capilares fetales además de las láminas basales presentes entre los distintos compartimentos tisulares. Posterior a las 20 semanas, la placenta sufre adaptaciones que mejoran el intercambio metabólico, las células del citotrofoblasto disminuyen, los núcleos del sinciotrofoblasto se acumulan formando nodos y los capilares fetales se acercan al trofoblasto (**Fig. 3**). Esta re-estructuración favorece el intercambio metabólico por la formación de delgadas zonas citoplasmáticas sin núcleos y de esta manera la membrana placentaria se transforma en una barrera de menor grosor (Moore y Persaud, 2004; Kemmerling *et al.*, 2010). La muerte celular programada de tipo apoptosis juega un rol importante en la re-estructuración placentaria, facilitando la rápida eliminación de células no deseadas sin inflamación (Belkacemi *et al.*, 2009).

Infección *ex vivo* de vellosidades coriónicas placentarias con *Trypanosma cruzi*:

La inducción de alteraciones celulares y la interacción con la matriz extracelular (MEC) durante la infección con *T. cruzi* han sido estudiados principalmente en cultivos de células de mamífero. Se ha establecido un modelo de infección *ex vivo* de explantes de vellosidades coriónicas humanas, en el cual se pueden estudiar los mecanismos de infección tisular del parásito (Duaso *et al.*, 2010, Duaso *et al.*, 2011a).

Durante el proceso de infección e invasión de las vellosidades coriónicas humanas el parásito induce destrucción y desprendimiento del trofoblasto así como de la matriz extracelular (MEC) del tejido conectivo fetal y en forma selectiva las glicoproteínas de las láminas basales (Duaso *et al.*, 2010). Estas mismas alteraciones se han observado en placentas provenientes de madres con enfermedad de Chagas crónica (Duaso *et al.*, 2011b).

Mecanismos de infección e invasión tisular

La penetración de *T. cruzi* a las células y tejidos del hospedero ocurre a través de un proceso complejo, de varias etapas, que involucra a moléculas del parásito y del hospedero. La unión del parásito a las células del hospedero es mediada por receptores, *T. cruzi* posee una serie de moléculas de superficie que interactúan diferencialmente con moléculas tanto de células como de la MEC del hospedero (Yoshida, 2006).

Las proteasas de tripanosomátidos juegan un importante rol en distintos eventos durante el proceso de infección, incluyendo: adsorción, penetración, sobrevivencia intracelular, diferenciación, infectividad, evasión de la respuesta inmune y nutrición del parásito. Los tripanosomátidos sintetizan una amplia gama de peptidasas, tanto intracelulares como secretadas, con diferentes especificidades. Muchas de las proteasas han sido purificadas y caracterizadas y sus genes clonados y secuenciados. Las proteasas parasitarias presentan características estructurales únicas, que las hacen candidatas como potenciales blancos terapéuticos. Estas mismas propiedades estructurales les confieren inmunogenicidad por lo que muchas poseen un gran potencial para el desarrollo de vacunas y nuevos métodos de diagnóstico serológico (Nogueira de Melo *et al.*, 2010).

La invasión tisular de *T. cruzi* induce la destrucción de la MEC (Duaso *et al.*, 2010; Duaso *et al.*, 2011b) secretando proteasas propias de él, tales como la Cruzipaína (Cz)

(Yoshida, 2006) y también es capaz de activar proteasas endógenas del tejido que es invadido, como las MMPs (Gutierrez *et al.*, 2008).

Cruzipaína:

(Cz, también llamada Cruzaína o gp57/51) es una cisteína proteasa lisosomal presente en todas las formas celulares de *T. cruzi* (Yoshida, 2006). Se clasifica como una glicoproteína del tipo α -manosa, con un peso molecular aproximado de 51 kDa y pertenece a la familia de las papaínas (Cazzulo, 1999).

La mayoría de las isoformas son lisosomales, adicionalmente se han encontrado algunas en la superficie de los epimastigotes, amastigotes y tripomastigotes de *T. cruzi*, las cuales presentan reacción cruzada con Cz soluble y una masa molecular relativa similar (Berasain *et al.*, 2003).

En epimastigotes esta enzima presenta el nivel de expresión más alto y se localiza en organelos parecidos a lisosomas, llamados reservosomas. En tripomastigotes, la enzima se localiza en el bolsillo flagelar, y en el amastigote se desplaza a la superficie celular, donde probablemente actúa sobre el citoplasma de la célula hospedera. La Cz es fundamental para la sobrevivencia, crecimiento y diferenciación del parásito. Por otro lado, esta proteína es inmunogénica en todas las formas celulares (Gea *et al.*, 2006).

La Cz presenta varias funciones, entre las que se cuentan:

- 1) La digestión lisosomal de proteínas exógenas o del propio parásito (Cazzulo, 1999).
- 2) Invasión celular del parásito: el uso de inhibidores de proteasas inhibe parcialmente la invasión celular del parásito (Cazzulo, 1999).
- 3) Diferenciación celular del parásito: la sobreexpresión de Cz aumenta la diferenciación de epimastigotes hacia tripomastigotes metacíclicos (Cazzulo, 1999).
- 4) *In vitro*, se ha demostrado que la Cz tiene la capacidad de digerir a las distintas isoformas de IgG generando fragmentos inactivos. Esta actividad enzimática está dirigida principalmente -pero no en forma exclusiva-, contra las regiones bisagras de

las distintas isoformas de IgG. Se ha postulado que la digestión e inactivación de las IgG podría ser parte de los mecanismos de evasión de la respuesta inmune (Berasain *et al.*, 2003).

5) Activación de células fagocíticas del hospedero: *T. cruzi* infecta células mamíferas mediante un proceso de endocitosis mediado por un reconocimiento parásito-célula hospedera. Se ha reportado que los tripomastigotes explotan adicionalmente una vía de invasión alternativa dependiente de actina que involucra la formación de vacuolas fagocíticas, enriquecidas con los productos lipídicos de la fosfoinositol-3-quinasa (PI₃K). Se ha postulado, que distintas moléculas del parásito tanto en su superficie como también liberadas al medio extracelular podrían participar en este proceso; dentro de este grupo está la Cz (Gea *et al.*, 2006).

6) Modulación de la respuesta inmune: la resistencia a la infección por *T. cruzi* está asociada con un patrón de producción de citoquinas Th1, mientras que la susceptibilidad a la infección se relaciona con un perfil del tipo Th2. Se propone que Cz podría jugar un rol clave durante la infección por *T. cruzi* llevando la respuesta inmune hacia un perfil Th2, favoreciendo la permanencia del parásito en el hospedero. Los macrófagos con perfil Th2 son capaces de estimular una vía alternativa de activación de este tipo de fagocito, la cual se caracteriza por la inducción de la actividad de la ornitina-decarboxilasa. Esta enzima está involucrada en la síntesis de poliaminas, las que son esenciales para la replicación intracelular del parásito (Gea *et al.*, 2006).

Inhibidores endógenos parasitarios de la cruzipaina:

La chagasina es una proteína endógena parasitaria inhibidora de las cisteína-proteasas, que está codificada por un solo gen, de una masa molecular de 11 kDa y formada por 109 aminoácidos. La chagasina se expresa en todas las formas celulares del parásito (Santos *et al.*, 2005).

Se propone que un balance fino entre los niveles de expresión de chagasina y de cisteína-proteasas endógenas tiene relación con la diferenciación e infectividad parasitaria, ya que la infectividad del tripomastigote disminuye cuando la expresión de

la chagasina aumenta, debido a la reducción de la actividad enzimática extracelular de la Cz (Santos *et al.*, 2005).

Inhibidores de las Cisteína-proteasas sintetizados por las células mamíferas:

Las cisteína-proteasas son reguladas por inhibidores naturales reversibles que pertenecen a la súper familia de las cistatinas, entre ellas se cuentan los quininógenos y cistatinas. Los quininógenos son los principales inhibidores fisiológicos de estas enzimas debido a su afinidad a cisteína-proteasas y sus altas concentraciones plasmáticas. La Cz tiene actividad quininogenasa, ya que es capaz de liberar quininas pro-inflamatorias a partir del quininógeno humano. La principal quinina liberada por Cz es la Lys-bradikinina (kallidina). Además, Cz es capaz de convertir la pre-kalikeína plasmática a α -kalikeína, lo que constituye una forma indirecta de liberación de bradikinina por parte del parásito. Probablemente, ese mecanismo es usado por *T. cruzi* para atravesar los vasos capilares para propagarse a los tejidos. Además, la Cz media la invasión de las células hospederas por parte de los tripomastigotes a través de una vía que involucra la activación de receptores bradikinina B2 (Gea *et al.*, 2006).

Rol de las metaloproteinasas en la destrucción de la matriz extracelular:

Las MMPs comprenden una amplia gama de endopeptidasas, dependientes de zinc y calcio, que se dividen en familias de acuerdo al sustrato que degradan (colagenasas, estromelisinias y gelatinasas) (Gutierrez *et al.*, 2008). Comprenden más de 26 endopeptidasas que comparten secuencias proteicas homólogas, con una estructura de algunos dominios conservados y otros dominios específicos relacionados con la especificidad por sustrato y el reconocimiento de otras proteínas (Amalinei *et al.*, 2010).

Es ampliamente aceptado que la hidrólisis altamente específica de uniones peptídicas puede regular una amplia gama de procesos biológicos en todos los organismos vivos. Este procesamiento proteolítico regula la actividad y compartimentalización de muchas proteínas y procesos biológicos posteriores. La desregulación de la expresión de las proteasas y en particular de su actividad está involucrada en varias condiciones patológicas, como enfermedades cardiovasculares y

neurodegenerativas, enfermedades artríticas, infección y cáncer. Las MMPs son secretadas como pro-enzimas a la MEC, donde son activadas por ruptura de su dominio amino terminal mediante MMPs asociadas a membranas y por otras proteasas extracelulares. La actividad de las MMPs está regulada *in vivo* mediante el balance entre su tasa de síntesis y degradación, activación (de sus pro-formas) y la unión con sus inhibidores endógenos (TIMPs) (Frederiks y Mook., 2004). Las MMP-2, MMP-9 y los TIMPs son expresadas en los tejidos reproductivos de humanos, ovejas, ratas y ratones, y han sido implicados en la invasión y desarrollo de las vellosidades coriónicas placentarias. Otro rol fundamental de las MMPs es la participación en la separación de la placenta y las membranas durante el parto (Corthorn *et al.*, 2007).

Entre las MMPs más estudiadas se encuentran la MMP-2 (también conocida como Gelatinasa A, de 72 kDa) y MMP-9 (Gelatinasa B, de 92 kDa) que degradan un amplio rango de sustratos, incluyendo colágeno tipo IV, uno de los principales tipos de colágeno encontrado en las láminas basales (Corthorn *et al.*, 2007). Se han asociado niveles elevados de MMPs con enfermedades infecciosas del tejido conectivo. La infección por *T. cruzi* tiende a elevar los niveles de MMP-2 y MMP-9 y su inhibición reduce la miocarditis y aumenta la supervivencia durante la fase aguda de la infección (Gutiérrez *et al.*, 2008).

Las MMPs, en conjunto con las cisteína proteasas, las proteasas aspárticas y las serino-proteasas están involucradas en la degradación tanto de las membranas basales como de la matriz extracelular (Amalinei *et al.*, 2010).

Otras proteasas de *T. cruzi* que interactúan con la matriz extracelular

Además de la Cz, se han identificado otras proteasas en *T. cruzi* dentro de las cuales se encuentran:

- Cisteína-proteasa de 30 kD similar a Catepsina-B con una importante actividad hidrolítica sobre colágeno tipo I humano (Nogueira de Melo *et al.*, 2010).
- POPTc 80, una prolil-oligopeptidasa de 80 kDa descrita en *T. cruzi*. Mediante estudios *in vitro*, se ha demostrado que es capaz de hidrolizar grandes sustratos, como fibronectina y colágeno tipo I y IV, por lo cual se sugiere que podría tener un rol importante en el proceso de interacción e invasión celular, además de

facilitar la migración del parásito por la matriz extracelular de los tejidos el hospedero (Bastos *et al.*, 2005).

- gp83: Se ha reportado que *T. cruzi* modifica la expresión de laminina λ -1 (LAMC1) en la MEC y contribuye a la patogénesis de la infección por *T. cruzi* en células cardíacas humanas. LAMC1 está relacionada con trombospondina, colágeno VII y MMP-2, lo que sugiere que esta red podría facilitar la movilización parasitaria. Distroglicano (DAG1) es una glicoproteína asociada a distrofina responsable de la unión transmembrana entre la MEC y el citoesqueleto. La forma extracelular de DAG1 puede unirse a alfa-2-laminina. Se postula que si *T. cruzi* es capaz de alterar el complejo distroglicano, mediante gp83 desde el extracelular podría ser otro mecanismo por el cual el parásito podría invadir a los tejidos del hospedero (Cárdenas *et al.*, 2010).

La infección *ex vivo* de vellosidades coriónicas induce alteraciones tisulares importantes. Explantes de vellosidades coriónicas humanas infectadas *ex vivo* con *T. cruzi* muestran una severa desorganización y destrucción de colágeno I así como una desorganización selectiva de los distintos componentes de las láminas basales, especialmente de fibronectina y colágeno IV (Duaso *et al.*, 2010). Recientemente se ha descrito que en vellosidades coriónicas de madres chagásicas en la fase crónica de la enfermedad también se observan alteraciones en las láminas basales y en el colágeno I del tejido conectivo fetal (Duaso *et al.*, 2011b).

En base a los antecedentes expuestos, es esperable que durante el proceso infeccioso el parásito secreta proteasas propias como la Cz y que active proteasas endógenas del tejido a invadir, como las MMPs, como parte de los mecanismos de invasión tisular.

HIPÓTESIS

Cruzipaína y metaloproteinasas 2 y 9 participan en la desorganización y destrucción del colágeno I en el tejido conectivo fetal así como de glicoproteínas en las láminas basales presentes en explantes de vellosidades coriónicas placentarias humanas infectadas *ex vivo* con tripomastigotes de *T. cruzi*.

OBJETIVO GENERAL

Estudiar el posible rol de cruzipaína y de las metaloproteinasas 2 y 9 en la destrucción tisular de explantes de vellosidades coriónicas placentarias humanas infectadas *ex vivo* con tripomastigotes de *T. cruzi*

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Determinar los niveles de expresión y actividad de las metaloproteinasas en explantes de vellosidades coriónicas humanas infectadas *ex vivo*.
2. Determinar el efecto de la inhibición específica de estas enzimas sobre la capacidad infectiva de *T. cruzi* en las vellosidades coriónicas placentarias humanas.
3. Determinar en explantes de vellosidades coriónicas humanas infectadas *ex vivo* con tripomastigotes de *T. cruzi* el posible rol de cruzipaína y metaloproteinasas 2 y 9 en la desorganización y destrucción de:
 - Colágeno I del tejido conectivo fetal.
 - Moléculas glicosiladas presentes en las láminas basales.

MATERIALES Y MÉTODOS

Obtención de formas infectivas de *T. cruzi*:

Se cultivaron células VERO (fibroblastos renales de mono verde africano, ATCC® CCL-81) en medio RPMI 1640® suplementado con suero fetal bovino (SFB) no inactivado al 5% y antibióticos (penicilina-estreptomicina). Se mantuvieron a 37°C en una atmósfera húmeda con 5% CO₂, el medio fue sustituido cada 24-48 horas. Las células VERO en semi-confluencia fueron inoculadas con un cultivo de epimastigotes cepas DM28c (fase estacionaria) que presentaba aproximadamente un 5% de la forma infectiva tripomastigote. Luego de que los tripomastigotes invadieron las células VERO, se diferenciaron a amastigotes y se multiplicaron, luego de 4 o 5 días se diferenciaron nuevamente a tripomastigotes, lisaron las células VERO y fueron recolectados desde el sobrenadante mediante centrifugación a 500 x g por 5 minutos para separarlos de los restos celulares. El centrifugado se dejó en reposo durante 30 minutos a 37°C para lograr que los tripomastigotes ascendieran hacia el sobrenadante. Este sobrenadante fue recolectado y centrifugado a 3.000 x g durante 10 minutos para obtener desde el sedimento las formas infectivas de *T. cruzi*. Los tripomastigotes fueron resuspendidos en medio RPMI y su número se determinó mediante conteo en una cámara de Neubauer (Duaso *et al.*, 2010).

Obtención de placentas:

Se obtuvieron placentas humanas de término durante el alumbramiento en partos por cesárea para asegurar la asepsia y preservación de la muestra. Los órganos fueron obtenidos de madres sanas con embarazos monogestacionales y fetos con desarrollo normal. Los criterios de exclusión para la obtención de placentas fueron cualquier patología materna, placentaria o fetal. El consentimiento informado¹ para uso experimental de la placenta fue firmado por cada paciente según las regulaciones del Comité de Ética Humana de la Facultad de Medicina, Universidad de Chile. Los órganos se recogieron en tampón fosfato salino pH 7,2 (PBS, NaCl 135 mM, KCl 2,7

1 Anexo 1

mM, Na₂HPO₄ 10 mM, KH₂PO₄ 1,8 mM) estéril a 4°C y se procesaron inmediatamente. Las caras placentarias maternas y fetales fueron desechadas y las vellosidades coriónicas se obtuvieron de la parte central de los cotiledones. Las vellosidades coriónicas aisladas fueron lavadas con PBS a fin de eliminar la sangre y cortadas en trozos 0,5 cm³ (Duaso *et al.*, 2010).

Infección *ex vivo* de vellosidades coriónicas con *T. cruzi*:

Las vellosidades coriónicas fueron co-cultivadas en presencia y ausencia de tripomastigotes de la cepa DM28c (concentraciones de 1x10⁵ y 1x10⁶ tripomastigotes por ml) durante 24 horas en medios de cultivo RPMI suplementados con SFB inactivado y antibióticos. Las vellosidades coriónicas controles se mantuvieron en las mismas condiciones, sin parásitos. Adicionalmente se usaron inhibidores para cisteínoproteasas (E64, trans-epoxi-succinil-leucilamido-4-guanidino butano, 10 μ M) e inhibidores de las MMPs (Doxicilina, 100 μM) para inhibir Cz y MMP-2/MMP-9, respectivamente. Posteriormente las vellosidades coriónicas se procesaron para los estudios microscópicos, bioquímicos y de biología molecular (Duaso *et al.*, 2010).

Determinación de la infección con *T. cruzi* de las vellosidades coriónicas por PCR:

Las muestras de las vellosidades coriónicas incubadas en presencia y ausencia del parásito y en presencia y ausencia de los inhibidores para Cz (E64) y para MMPs (doxiciclina) se lavaron al menos 10 veces en PBS, posteriormente se extrajo el DNA genómico con el kit Wizard Genomic® (Promega) según indicaciones del fabricante. La concentración de DNA se determinó en un fluorómetro (Qubit®, Invitrogen) mediante el kit Quant-iT™ dsDNA BR Assay según indicaciones del fabricante. Se amplificó un fragmento de 384 pares de bases correspondiente a DNA de minicírculos de *T. cruzi* (Zulantay *et al.*, 2004). Las secuencias de los partidores usados fueron:

S35: 5'-AAATAATGTACGGGKGAGATGCAT-3';

S36: 5'-GGGTTTCGATTGGGGTTGGTGT-3'.

Para un volumen total de 50 μ L se mezclaron 500 pg de DNA genómico, 25 μ l de SapphireAmp® Fast PCR Master Mix (Takara Bio Inc., Japón) y 10 nanomoles de cada uno de los partidores. Los ciclos termales fueron: 2 ciclos de denaturación de 1 min a 98°C y 2 minutos a 64°C, seguidos de 30 ciclos de 1 minuto a 94°C y 1 minuto a 64°C. La extensión final fue de 10 min a 72°C. Los amplificadores de DNA se separaron en geles de agarosa al 1% preparados en tampón Tris-borato-EDTA y se tiñeron con el colorante de ácidos nucleicos GelRed® (Biotium, EE.UU.) según instrucciones del fabricante.

Detección de la expresión de MMP-2 y MMP-9 mediante Western blot:

Las vellosidades coriónicas fueron homogenizadas en 1 ml de buffer de lisis (Tris 10 mM pH 8,0; SDS 1% p/v en presencia de una mezcla de inhibidores de proteasas Complete Mini (Roche®)) en un homogenizador Potter-Elvehjem a 4°C. Posteriormente las muestras fueron agitadas en frío durante 15-20 minutos y luego centrifugadas a 15.000 x g. La concentración de proteínas se determinó en un fluorómetro (Quibit®, Invitrogen) mediante el kit Quant-iT™ protein Assay según indicaciones del fabricante. Los sobrenadantes de los homogenados fueron diluidos en un buffer de carga denaturante (glicerol 10%, dodecil sulfato de sodio (SDS) 4,5%, β -mercaptoetanol 5%, 62,5 mM Tris-HCL (pH 6,8) 1,5 mM EDTA y 0,1% azul de bromofenol) y hervidos durante 5 minutos. Las proteínas fueron separadas en geles por SDS-PAGE al 10% y luego transferidas a membranas de PDVF (Milipore Corp.) durante 2 horas a 75 mV. Se utilizó 30 μ g de proteínas para la detección de MMP-2 y MMP-9. Las membranas se bloquearon durante dos horas a temperatura ambiente con PBST-BSA 5% para evitar marcas inespecíficas. Posteriormente las membranas fueron incubadas con el anticuerpo primario (anti-MMP-2 (sc-53630 Santa Cruz®) anti-MMP-9 (sc-21733, Santa Cruz®) durante toda la noche a 4°C. Al día siguiente las membranas fueron lavadas tres veces durante 10 minutos con PBST e incubadas con el anticuerpo secundario “goat antimouse (sc-2055)” conjugado con peroxidasa durante 60 minutos. Las proteínas inmunoreactivas fueron detectadas mediante quimioluminiscencia (Western Blotting Luminol Reagent, Santa Cruz Technologies®, sc-2048) según las instrucciones del fabricante). Posteriormente las membranas se incubaron en una solución de “stripping”

(62.5 mM Tris-HCl, pH 6.8, 2% SDS y 50mM β -mercaptoetanol) a 50°C durante 30 minutos. Después las membranas fueron lavadas 3 veces durante 10 minutos en TBST, bloqueadas en PBST-BSA 5%, incubadas con el anticuerpo primario contra la proteína Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH, sc-51905, Santa Cruz®) durante toda la noche a 4°C como control de carga. El tratamiento para la detección de GAPDH fue el mismo que el descrito anteriormente.

Las películas fueron digitalizadas en un sistema automático de barrido y se utilizó el programa ImageJ v 1.34 (National Institute of Health, Bethesda, Maryland, EE.UU) para el análisis densitométrico de las bandas. Los resultados se expresaron como la razón de MMP-2 ó MMP-9 versus GAPDH.

Se normalizaron a 1 los valores de la razón MMP-2/MMP-9 con los controles en los distintos blots de cada experimento y se expresaron los datos de las distintas condiciones experimentales en relación con sus controles respectivos. (Kemmerling *et al.*, 2007)

Detección de la expresión de MMP-2 y MMP-9 mediante Inmunohistoquímica:

Las vellosidades coriónicas se fijaron durante 24 horas en formaldehído 4% preparado en un tampón fosfato pH 7,3. Posteriormente se lavaron durante 2 horas en agua corriente, se deshidrataron mediante inmersión en concentraciones crecientes de etanol (80%, 90%, 95%, 100%, 100%, 100%) por 10 minutos cada vez, se aclararon en xilol 100% 3 veces durante 15 minutos y se incluyeron en parafina fundida a 60°C. Se obtuvieron cortes de 8 μ m de espesor que fueron colocados en portaobjetos silanizados con carga positiva (Superfrost® plus, Thermo Scientific), y luego fueron desparafinados en xilol 100% 3 veces por 15 minutos, e hidratados en concentraciones decrecientes de etanol (100%, 100%, 100%, 95%, 80%, 70% y agua destilada) por 10 minutos cada vez. La inmunodetección se realizó mediante el kit comercial R.T.U. Vectastain (Vector Laboratories, EE.UU.). Se bloqueó por 30 minutos con el bloqueador de peroxidasas endógenas ProBlock® (ScyTek, EE.UU.), luego se lavó con PBS por 15 minutos, se boqueó con suero normal equino R.T.U al 2,5%. Luego se incubaron con los anticuerpos primarios anti MMP-2 (sc-53630 Santa Cruz®, dilución 1:400 v/v) y anti

MMP-9 (sc-21733, Santa Cruz®, dilución 1:400 v/v) durante toda la noche a 4°C. Después de lavados en PBS, las muestras fueron incubadas con un anticuerpo secundario biotinilado y conjugado con estreptovidina Universal R.T.U (Vector Laboratories, EE.UU.). El complejo antígeno-anticuerpo fue revelado con el cromógeno diamino bencidina (DAB) y el contraste nuclear se realizó con hematoxilina de Mayer. Los controles de inmunohistoquímica se realizaron mediante la sustitución de los anticuerpos primarios con PBS. Los preparados se montaron en medio Entellan (Merck®), fueron observados en un microscopio (Nikon, Optiphot-2) y las imágenes se capturaron con un equipo de digitalización (Canon Powershot SX100) acoplado al microscopio y procesadas empleando el programa computacional GIMP. (Duaso *et al.*, 2010)

Determinación de la actividad gelatinasa de MMP-2 y MMP-9 mediante fluorescencia:

Se utilizó el Kit InnoZyme Gelatinase (MMP-2/MMP-9) Activity (Calbiochem, EE.UU.) que se basa en la utilización de un sustrato fluorogénico similar al colágeno altamente selectivo para MMP-2 y MMP-9.

Las muestras fueron homogenizadas utilizando 1 ml de tampón de lisis no-reductor (Tris-HCl 500 nM; Tritón x-100 1%; CaCl₂ 10 mM; NaCl 200 mM, pH 7,5) a 4°C en un homogenizador Potter-Elvehjem. Posteriormente las muestras fueron agitadas en frío durante 15-20 minutos y luego centrifugadas a 15.000 x g. La concentración de proteínas se determinó en un fluorómetro (Quibit®, Invitrogen) mediante el kit QuantiTTM protein Assay, según indicaciones del fabricante.

1 mg de cada muestra fue activada usando acetato p-Aminofenilmercúrico en una relación 1:3 durante 2 horas a 37°C. Se agregó 90 µl de cada muestra activada en distintos pocillos, luego se añadió 10 µl de sustrato a cada pocillo y se incubó por 2 horas a 37°C. Se midió la fluorescencia usando un fluorómetro Jasco FP-6200 configurado con una longitud de onda de excitación de 320 nm y 405 nm de emisión.

Se normalizaron a 1 los valores de la razón MMP-2/MMP-9 de los controles en los distintos experimentos y se expresaron los datos de las distintas condiciones experimentales en relación con su control (Lauer-Fields *et al.*, 2003).

Determinación de la actividad gelatinasa de MMP-2 y MMP-9 mediante zimografía:

La actividad gelatinolítica de las MMP-2 y 9 fue estudiada mediante zimografía en geles de poliacrilamida al 10% co-polimerizado con 2% de gelatina (ReadyGel, BioRad, EE.UU.) Las muestras fueron homogenizadas utilizando 1 ml de tampón de lisis no-reductor (Tris-HCl 500 nM; Tritón x-100 1%; CaCl₂ 10 mM; NaCl 200 mM, pH 7,5) a 4°C en un homogenizador Potter-Elvehjem. Posteriormente las muestras fueron agitadas en frío durante 15-20 minutos y luego centrifugadas a 15.000 x g a 4°C. La concentración de proteínas se determinó en un fluorómetro (Quibit®, Invitrogen) mediante el kit Quant-iT™ protein Assay, según indicaciones del fabricante. 30µg de proteína del homogenizado fue sometido a electroforesis en un gel de poliacrilamida al 8% con 2% de gelatina (2 mg/ml, tipo A de piel porcina; Sigma). MMP 2 y 9 humanas recombinantes fueron usadas como controles positivo (Calbiochem, EE.UU.). La separación electroforética se realizó a 90 volts durante 2.5 horas en condiciones no reductoras. Los geles fueron renaturados con Triton X-100 2,5% por 60 minutos e incubados por 24 horas a 37°C en un buffer de activación (150 mM Tris-HCl; 150 mM NaCl; 5 mM Ca²⁺; 0,02% NaN₃, pH 7,5). Posteriormente, los geles fueron teñidos con azul brillante Coomassie 0,5% (G-250; Sigma). La actividad gelatinolítica fue detectada como bandas transparentes en contraste al azul oscuro del fondo. Los zimogramas fueron escaneados digitalmente y las intensidades de las bandas se cuantificaron usando el programa ImageJ v.1.34 (National Institute of Health, Bethesda, MD), y expresadas como una relación con las muestras control. (Gutiérrez *et al.*, 2008).

Análisis histoquímico de colágeno I:

La organización de colágeno I fue analizada mediante la técnica histoquímica de picro rojo sirio. Las vellosidades coriónicas fueron procesadas como descrito más arriba. Las muestras cortadas e hidratadas fueron teñidas por 8 minutos con hematoxilina de Mayer y se lavaron con agua corriente por 10 minutos. Posteriormente fueron

sumergidas en una solución de picro rojo sirio (0,5g Direct red 80 (Sigma-Aldrich®) en 500 ml de solución acuosa sobresaturada de ácido pícrico (Sigma-Aldrich®)) por una hora, se lavaron dos veces con agua destilada acidificada al 0,5% con ácido acético glacial, y finalmente con agua destilada 3 veces cambiando el agua cada vez (Junqueira *et al.*, 1979). Los preparados fueron montados con Entellan (Merck®), observados en un microscopio de luz polarizada (Leitz Wetzlar) y las imágenes fueron capturadas con un equipo de digitalización (Canon Powershot SX100 15) acoplado al microscopio y procesadas empleando el programa computacional GIMP (Duaso *et al.*, 2010).

Análisis histoquímico de moléculas glicosiladas de la MEC mediante tinción de ácido periódico de Schiff (PAS):

El ácido periódico oxida los grupos hidroxilo de hexosas neutras a aldehídos, que son visualizados con el reactivo de Schiff resultando un color rojo púrpura (Thompson, 1966). Las membranas basales presentan macromoléculas con una alta proporción de hidratos de carbono (Junqueira, *et al.*, 1979), por lo cual se tiñen bien mediante la reacción de PAS y otros colorantes histológicos que detecten glicosaminoglicanos (GAGs) (Kiernan, 2008; Brancroft y Gamble, 2008).

Las muestras fueron procesadas para análisis histológico de rutina, como fue descrito más arriba. Se utilizó el kit de tinción PAS (kit periodic acid-Schiff (PAS) staining system) de Sigma-Aldrich®, según las instrucciones dadas por el fabricante. Los cortes fueron desparafinados e hidratados como ya fue descrito anteriormente, sumergidos en agua desionizada, tres veces por 5 minutos cada vez, luego sumergidos en solución de ácido periódico, durante 5 minutos a temperatura ambiente, lavados al menos 10 veces en agua destilada cambiando el agua cada vez, sumergidos en reactivo de Schiff, durante 15 minutos a temperatura ambiente y lavados durante 5 minutos en agua corriente. El contraste nuclear se realizó mediante tinción nuclear con hematoxilina de Gill por 90 segundos, finalmente fueron deshidratadas, aclaradas y montadas en medio Entellan® como ya fue descrito. Adicionalmente se realizaron controles de la técnica mediante la aplicación, en los cortes previo a la tinción, de α -amilasa (4 μ g/ml) durante 30 minutos a 37°C (Duaso *et al.*, 2010).

Análisis estadístico:

Cada experimento fue realizado en triplicado y al menos en tres oportunidades distintas. Los resultados se expresaron como promedio más desviación estándar. La significancia de las variables cuantitativas se evaluó mediante el test de Student. Las variables múltiples se analizaron mediante ANDEVA seguido por “Dunnett’s post test” (comparando todas las columnas respecto al control). Se utilizó el programa computacional GraphPad Software PRISM 5.0 (GraphPad Software, San Diego, EE.UU.). Se consideró un $p < 0,05$ como estadísticamente significativo.

Bioseguridad:

Los experimentos fueron desarrollados en el “Laboratorio de Mecanismos de la Infección Parasitaria”, ubicado en el Instituto de Ciencias Biomédicas de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile; que cuenta con los requerimientos básicos de Bioseguridad certificados por la "Unidad de Prevención de Riesgos y Bioseguridad de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile"². **Las formas infectivas del parásito fueron manipuladas por la profesora guía.**

Bioética:

Este estudio contó con la aprobación del “Comité de Ética Humana de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile”³.

2 Anexo 2
3 Anexo 3

RESULTADOS

Se ha planteado que durante el proceso de invasión celular y tisular de *T. cruzi* participen tanto proteasas propias del parásito, entre ellas la Cz (Yoshida, 2006) así como proteasas del tejido que es invadido, como las MMPs (Gutierrez *et al.*, 2008). Además se ha descrito como potencial mecanismo de invasión tisular la desorganización de la MEC de vellosidades coriónicas infectadas con *T. cruzi* tanto en modelos de explantes *ex vivo* (Duaso *et al.*, 2010) como en placentas de mujeres con enfermedad de Chagas asintomática (Duaso *et al.*, 2011b).

La infección *ex vivo* de los explantes de vellosidades coriónicas humanas con tripomastigotes de *T. cruzi* induce la expresión de Metaloproteinasas 2 y 9.

Vellosidades coriónicas fueron incubadas en presencia y ausencia de 10^5 ó 10^6 tripomastigotes y en presencia y ausencia del inhibidor de MMP-2 y MMP-9, doxiciclina ($100\mu\text{M}$). La expresión de las MMP-2 y MMP-9 fue analizada mediante Western blot. Se observa un aumento estadísticamente significativo de la expresión tanto de MMP-2 (**Fig. 4**) como de MMP-9 (**Fig. 5**) en las vellosidades coriónicas incubadas con el parásito respecto al control. Las muestras incubadas con la concentración más alta de parásitos presentaron también una mayor expresión de las proteasas (**Figs. 4 y 5**). Así, muestras incubadas con 10^5 tripomastigotes presentan un aumento de un 75% de la expresión de MMP-2 (**Fig. 4**) ($p\leq 0,05$) y de un 57% de la expresión de MMP-9 ($p\leq 0,05$). El aumento de la expresión de las MMPs es más notorio aún en las muestras incubadas con 10^6 parásitos, ya que la expresión de MMP-2 aumenta en un 137% ($p\leq 0,001$) y la de MMP-9 en un 101% ($p\leq 0,001$). El inhibidor de las MMPs, doxiciclina no alteró la expresión de las proteasas (**Figs. 4 y 5**). Se observa una leve disminución de la expresión de ambas MMPs en presencia del parásito e inhibidor al comparar con las muestras incubadas sólo con el parásito. Sin embargo, estas diferencias no son estadísticamente significativas.

La expresión y localización tisular de MMP-2 (**Fig. 6**) y MMP-9 (**Fig. 7**) fue analizada mediante inmunohistoquímica. Se confirma el aumento de la expresión de ambas proteasas en presencia del parásito (**Fig. 6, paneles B y C; Fig. 7 paneles B y C**)

También se evidencia que la incubación con el inhibidor no altera la expresión de ambas proteasas (**Fig. 6 paneles D y F; Fig. 7 paneles D y F**). Tanto la MMP-2 como la MMP-9 se localizan en todos los compartimentos tisulares de las vellosidades coriónicas (**Figs. 7 y 8**). Sin embargo, la mayor inmunoreactividad se observó en el trofoblasto.

La infección *ex vivo* de los explantes de vellosidades coriónicas humanas con tripomastigotes de *T. cruzi* induce la actividad de las Metaloproteinasas 2 y 9.

Vellosidades coriónicas fueron incubadas en presencia y ausencia de 10^5 ó 10^6 tripomastigotes. Se determinó la actividad enzimática de MMP-2 y MMP-9 fluorimétricamente mediante un kit comercial que presenta sustratos altamente específicos para MMP-2 y MMP-9. Las muestras incubadas con los parásitos presentan el doble de la actividad de las MMPs respecto a los controles ($p \leq 0,05$) (**Fig. 8**). Sin embargo, este método presenta la desventaja que no se puede utilizar a doxiciclina como inhibidor, ya que esta droga emite fluorescencia e interfiere por ende con la medición de la actividad enzimática.

Consecuentemente, se analizó la actividad enzimática mediante zimografías. Las vellosidades coriónicas fueron incubadas en presencia y ausencia del parásito así como en presencia y ausencia del inhibidor Doxiciclina. Las muestras incubadas con 10^5 parásitos duplican la actividad enzimática de MMP-2 (**Fig. 9** $p \leq 0,05$,) y de MMP-9 (**Fig. 10**, $p \leq 0,05$) respecto a los controles y muestras incubadas además con el inhibidor. Cuando el tejido placentario es incubado con 10^6 parásitos la actividad enzimática prácticamente se triplica (**Figs. 9 y 10**, $p \leq 0,001$). Las zimografías adicionalmente permitieron comprobar que la concentración de doxiciclina utilizada efectivamente inhibe la actividad enzimática de estas MMPs (**Figs. 9 y 10**).

La inhibición de la actividad de cruzipaina y las metaloproteinasas no previene la infección de explantes de vellosidades coriónicas humana con tripomastigotes de *T. cruzi*.

Vellosidades coriónicas humanas fueron incubadas durante 24 horas en presencia y ausencia de 10^6 millones de tripomastigotes y en presencia y ausencia de E-64 y doxiciclina (10 y 100 μ M respectivamente). Ninguno de los dos inhibidores fue capaz de impedir la infección de las vellosidades coriónicas.

En la **figura 11** se observa la detección de DNA parasitario en las vellosidades coriónicas humanas mediante PCR. En todas las muestras incubadas con el parásito en ausencia y presencia de los inhibidores (**Fig. 11 carriles 4-9**) se detecta DNA parasitario. Si bien la densidad de los productos de PCR de aquellas muestras tratadas con los inhibidores es menor en relación a las muestras incubadas sólo con el parásito, no es posible afirmar que doxiciclina o E64 inhiban la infección *ex vivo* de las vellosidades coriónicas humanas

La inhibición de la actividad de la cruzipaina y las metaloproteinasas previene parcialmente la destrucción de la matriz extracelular.

La MEC es un componente fundamental de los tejidos, forma una red macromolecular tridimensional que es molecular y bioquímicamente muy compleja. Las láminas basales son estructuras de la MEC altamente estructuradas que se ubican entre tejidos epiteliales y tejidos conectivos. Las láminas basales presentan una alta concentración de moléculas glicosiladas, ya que presentan una alta concentración de glicoproteínas como laminina y fibronectina así como de proteoglicanos como el heparansulfato. En las vellosidades coriónicas las láminas basales se ubican entre el trofoblasto y tejido conectivo fetal y alrededor de los endotelios de los capilares fetales (Kemmerling *et al.*, 2010).

Por otra parte, el tejido conectivo fetal es rico en colágeno I, que forma el “esqueleto” básico de la compleja red que forma la MEC en este tejido mesenquimático. En estudios previos se ha determinado que el parásito induce una marcada desorganización de la MEC en las vellosidades coriónicas humanas (Duaso *et al.*, 2010, Duaso *et al.*, 2011c), la que probablemente se debe a la actividad de proteasas. Para

determinar si las MMPs y Cz participan en este proceso se analizó el efecto de la inhibición éstas sobre la organización de la MEC en las vellosidades coriónicas incubadas en presencia y ausencia del parásito.

1) La inhibición de las metaloproteínas previene la destrucción de moléculas glicosiladas de la matriz extracelular.

Vellosidades coriónicas fueron incubadas en presencia y ausencia de 10^5 ó 10^6 tripomastigotes y en presencia y ausencia del inhibidor de MMP-2 y MMP-9, doxiciclina ($100\mu\text{M}$). Las muestras fueron analizadas histoquímicamente mediante con la tinción de ácido periódico de Schiff (PAS). Vellosidades coriónicas incubadas en presencia del parásito y en presencia de doxiciclina (**Fig. 12, paneles E y F**) muestran una tinción PAS positiva similar a las vellosidades coriónicas controles (sin el parásito) (**Fig. 12, paneles A y D**) y mucho mayor que las muestras incubadas con *T. cruzi* (**Fig. 12, paneles B y C**).

2) La inhibición de las metaloproteínas y la cruzipaina previene la desorganización del colágeno tipo I de la matriz extracelular.

El mismo resultado se obtiene al analizar el colágeno I del tejido conectivo fetal. Vellosidades coriónicas incubadas en presencia del parásito y en presencia de doxiciclina (**Fig. 13, paneles E-F**) o E64 (**Fig 13, paneles H e I**) muestran una organización del colágeno I, analizada histoquímicamente con el método de picro rojo sirio, similar a las vellosidades coriónicas controles (sin el parásito) (**Fig. 13, paneles A, D y G**) y mucho mayor que las muestras incubadas con sólo con *T. cruzi* (**Fig. 13, paneles B y C**).

Por ende, doxiciclina y el inhibidor de cisteínoproteasas no son capaces de impedir la infección *ex vivo* con *T. cruzi*. Sin embargo previenen la destrucción tisular inducida por el parásito.

DISCUSIÓN

En la transmisión materno-fetal de la enfermedad de Chagas, para alcanzar los capilares fetales el parásito debe atravesar la barrera placentaria, compuesta por el sinciotrofoblasto, citotrofoblasto, tejido conectivo fetal y endotelio de los capilares fetales además de las láminas basales presentes entre los distintos compartimentos tisulares (Kemmerling *et al.*, 2010; Duaso *et al.*, 2011a; Duaso *et al.*, 2011b) .

La infección *ex vivo* de vellosidades coriónicas humanas induce destrucción y desprendimiento del trofoblasto, desorganización selectiva de los componentes moleculares de las láminas basales y desorganización severa de colágeno tipo I en el tejido conectivo fetal (Duaso *et al.*, 2010). Alteraciones histopatológicas similares se observan en placentas de mujeres con enfermedad de Chagas crónica asintomática (Duaso *et al.*, 2011b). Esta destrucción del tejido placentario permitiría alcanzar al parásito los vasos sanguíneos fetales y así alcanzar a la circulación fetal (Kemmerling *et al.*, 2010). En este contexto es particularmente importante considerar que el colágeno es un componente fundamental de la red tridimensional que forma la MEC. Esta red tridimensional está formada por los distintos tipos de colágenos, fibras elásticas, glicosaminoglicanos, proteoglicanos y glicoproteínas (Junqueira y Carneiro, 2005). Si se destruye este "esqueleto básico" de la MEC, la conformación normal de MEC y el tejido se desorganiza, condición que facilitaría la movilización del parásito dentro de ellos. Además, se ha propuesto que las alteraciones de MEC producidas por la presencia del parásito no sólo promueven su movilidad en los tejidos y su entrada en las células, sino también alteran la presencia de citocinas y quimiocinas, que a su vez permite a *T. cruzi* modular y evadir la respuesta inmune (Marino *et al.*, 2003; Mendes da Cruz *et al.*, 2006; Duaso *et al.*, 2010).

La destrucción celular y especialmente la de la MEC se debe, en parte a proteasas del parásito como la Cz (Yoshida, 2006), así como de la activación de proteasas propias del tejido que es invadido como son las MMPs (Gutierrez *et al.*, 2008).

Entre las MMPs más estudiadas se encuentran las MMP-2 y MMP-9 (Demir-Weusten *et al.*, 2007), Estas proteasas han sido vinculadas a la etiopatogenia de la miocarditis chagásica observada en la fase aguda de la enfermedad (Gutierrez *et al.*, 2008). Tanto la expresión como actividad de estas MMPs están aumentadas en la miocarditis siendo responsables de la remodelación de la MEC en los tejidos cardíacos (Gutierrez *et al.*, 2008).

Tanto MMP-2 como MMP-9 se expresan en la placenta humana (Castellucci y Kaufmann, 2006; Demir-Weusten *et al.*, 2007). Estas proteasas son responsables de la remodelación de la MEC en el tejido placentario en procesos fisiológicos y patológicos (Marbaix *et al.*, 1992; Castellucci y Kaufmann, 2006; Demir-Weusten *et al.*, 2007). Estas proteasas se expresan durante la invasión del trofoblasto en la implantación del embrión (Demir-Weusten *et al.*, 2007) y durante el parto (Huisman *et al.*, 2004; Xu *et al.*, 2002; Demir-Weusten *et al.*, 2007). Especialmente MMP-9 aumenta su expresión y actividad previo y durante el parto (Demir-Weusten *et al.*, 2007). Por otra parte, se ha descrito un aumento de la expresión de MMPs en patologías derivadas del trofoblasto, como son los tumores placentarios, especialmente el coriocarcinoma (Singh *et al.*, 2011). También se ha descrito un aumento de MMPs durante infecciones corio-amnióticas (Oha *et al.*, 2011). Infección por *Lactobacillus acidophylus* y *Ureaplasma urealyticum* (Estrada-Gutierrez *et al.*, 2010) inducen expresión de MMP-9 y citoquinas pro-inflamatorias. En cambio en placentas del primer trimestre, virus como Citomegalovirus pueden inhibir a las MMPs, impidiendo una adecuada vascularización de este órgano e inducir de esta manera abortos (Tao *et al.*, 2011). *T. cruzi* induce tanto la expresión como actividad de MMP-2 y MMP-9 en explantes de vellosidades coriónicas humanas (**Figs. 4,5,6,7,8,9 y 10**). De esta manera, se demuestra por primera vez, que MMPs participan en la etiopatogenia de la infección congénita por *T. cruzi*.

Doxiciclina es un inhibidor de las MMPs, su mecanismo de acción es mediante la quelación de cationes bivalentes como Ca^{2+} y Zn^{2+} . Estos cationes son co-factores esenciales para la activación de la pro-MMP (zimógeno) a su estado proteolítico (Snoek-Van Beurden y Von Den Hoff, 2005; Gutierrez *et al.*; 2008; Nogueira de Melo *et al.*, 2010). Este mecanismo de acción de la doxiciclina explicaría porque en presencia

de ésta, sólo se inhibe la actividad de las MMPs (**Figs. 9 y 10**) y no la expresión (**Figs. 4 y 5**).

La inhibición de las MMPs no impide la infección *ex vivo* de las vellosidades coriónicas humanas, aunque se observa una leve disminución del amplificado DNA del parásito obtenido de las vellosidades coriónicas incubadas en presencia del parásito y de doxiciclina. Actualmente están en curso experimentos para cuantificar la presencia del parásito en el tejido placentario mediante Real-time PCR. Esta disminución de la presencia de DNA parasitario se debe, probablemente, a que al impedir la remodelación de la MEC al parásito se le dificulta el paso a través de las barreras tisulares, especialmente a nivel de láminas basales y tejido conectivo fetal. El hecho de que el uso de doxiciclina previene la destrucción de la MEC inducida por el parásito, apoya esta teoría. Otra posibilidad que explicaría este hecho, es que la doxiciclina tendría un efecto trypanocida. Sin embargo, dosis tan altas como 1 mM no son capaces de matar al parásito (dato no mostrado).

Por otro lado, la inhibición de cisteína proteasas también previene la destrucción inducida por el parásito y tampoco impide la infección *ex vivo* de las vellosidades coriónicas. Cz es la principal proteasa del parásito, pero no es la única proteasa que presenta *T. cruzi*. El hecho de que se observen efectos similares al inhibir tanto proteasas del parásito como del tejido a invadir indicaría que la participación de ambos tipos de enzimas es fundamental en el proceso de invasión tisular. También es posible que E-64 usado para inhibir a la Cz actúe sobre otras cisteína proteasas del parásito y además secundariamente sobre cisteína proteasas propias de la placenta. Entre éstas últimas se cuentan las caspasas que participan la muerte celular tipo apoptosis (Jerzak y Bischof, 2002; Duaso *et al.*, 2011a) así como en la diferenciación del trofoblasto (Huppertz y Borges, 2008).

Para evaluar los potenciales beneficios terapéuticos de la inhibición de las proteasas estudiadas, se necesitan experimentos adicionales, en los cuales se combinen el uso de inhibidores de las MMPs con las drogas antichagásicas convencionales. Posibles resultados positivos tendrían la ventaja de poder disminuir las dosis de las drogas antichagásicas convencionales, que presentan efectos secundarios adversos importantes. Adicionalmente, es necesario buscar otro modelo de infección

tisular o modelo animal, ya que ni las drogas antichagásicas (Carlier y Truyens, 2010) ni la doxiciclina se pueden usar durante el embarazo (Tan *et al.*; 2011). Sin embargo, doxiciclina se ha usado en el tratamiento contra cepas de malaria multiresistente en mujeres embarazadas y niños menores de 8 años sin mayores efectos adversos (Tan *et al.*; 2011) y se recomienda como potencial antibiótico a usar durante el embarazo en caso de bioterrorismo (Cooper *et al.*; 2009).

Los resultados de la presente memoria muestran que la destrucción de la MEC en las vellosidades coriónicas infectadas *ex vivo* con tripomastigotes de *T. cruzi* es consecuencia tanto de la activación de proteasas endógenas (MMP-2 y MMP-9) y de la secreción por parte del parásito de proteasas como la Cz. La desorganización de la estructura normal del colágeno de la MEC podría facilitar la penetración e infección del parásito a los tejidos del hospedero, promoviendo su paso hacia la circulación fetal.

Por primera vez se describe la participación de proteasas como mecanismo de infección parasitaria en la enfermedad de Chagas congénita.

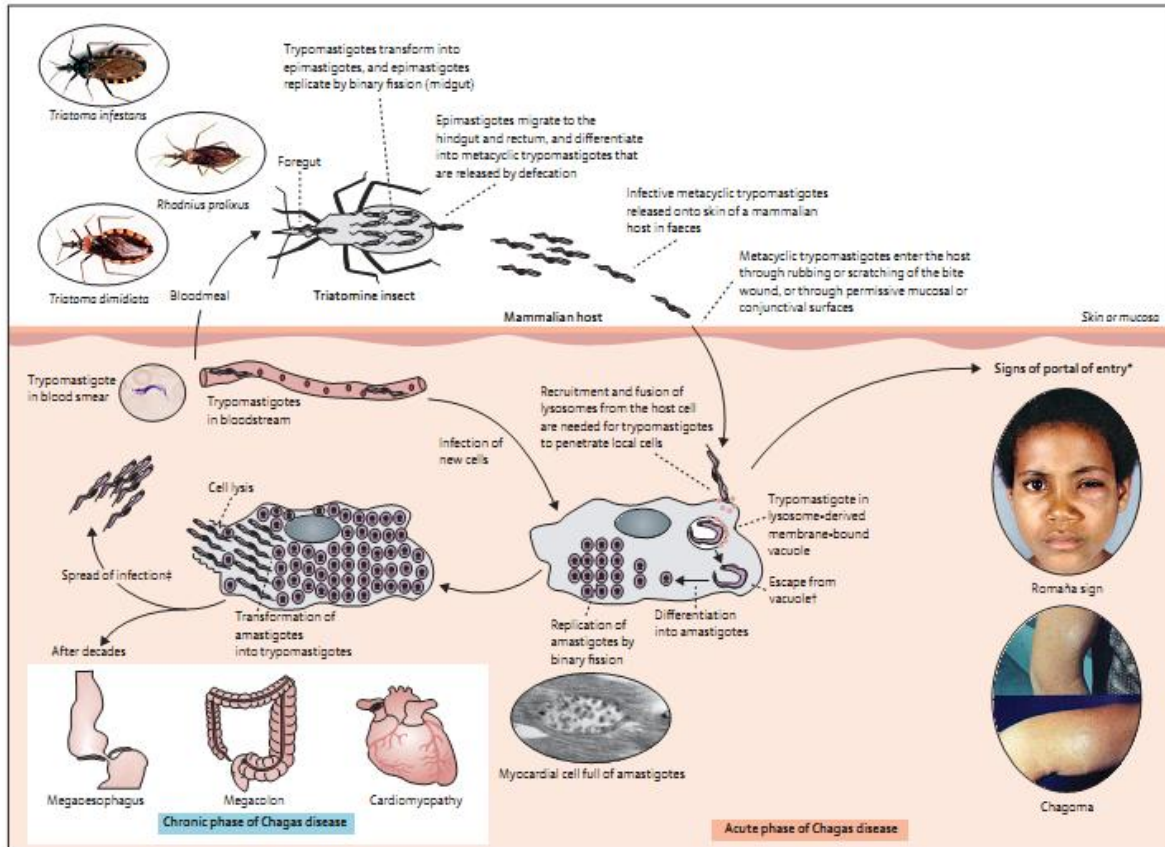
CONCLUSIONES

- *T. cruzi* induce la expresión y actividad de MMP-2 y MMP-9 durante la infección *ex vivo* de explantes de vellosidades coriónicas humanas
- Tanto la expresión como actividad de las MMPs es dependiente de la concentración de parásitos usados.
- Cisteína-proteasas parasitarias, como Cz, participan en la destrucción de la MEC de las vellosidades coriónicas humanas infectadas *ex vivo*.
- La inhibición de la actividad proteolítica de las MMP-2/MMP-9 y Cz previene la destrucción de la MEC inducida por el parásito.
- La inhibición de la actividad proteolítica de MMP-2/MMP-9 y Cz no evita la infección *ex vivo* de los explantes vellositarios por parte de *T. cruzi*

Se concluye, que durante la infección e invasión tisular de *T. cruzi* participan tanto proteasas parasitarias (Cz) como tisulares endógenas (MMPs).

FIGURAS

FIGURA 1

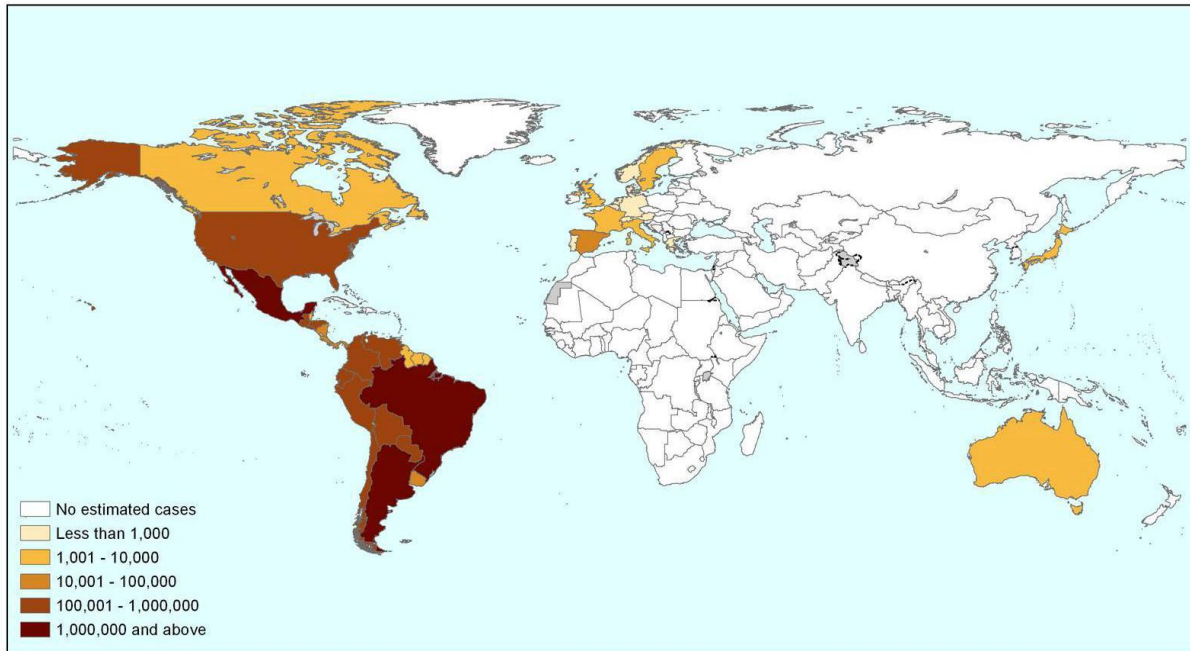


Ciclo de vida de *Trypanosoma cruzi*:

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

Fuente: Rassi *et al.* 2010.

FIGURA 2

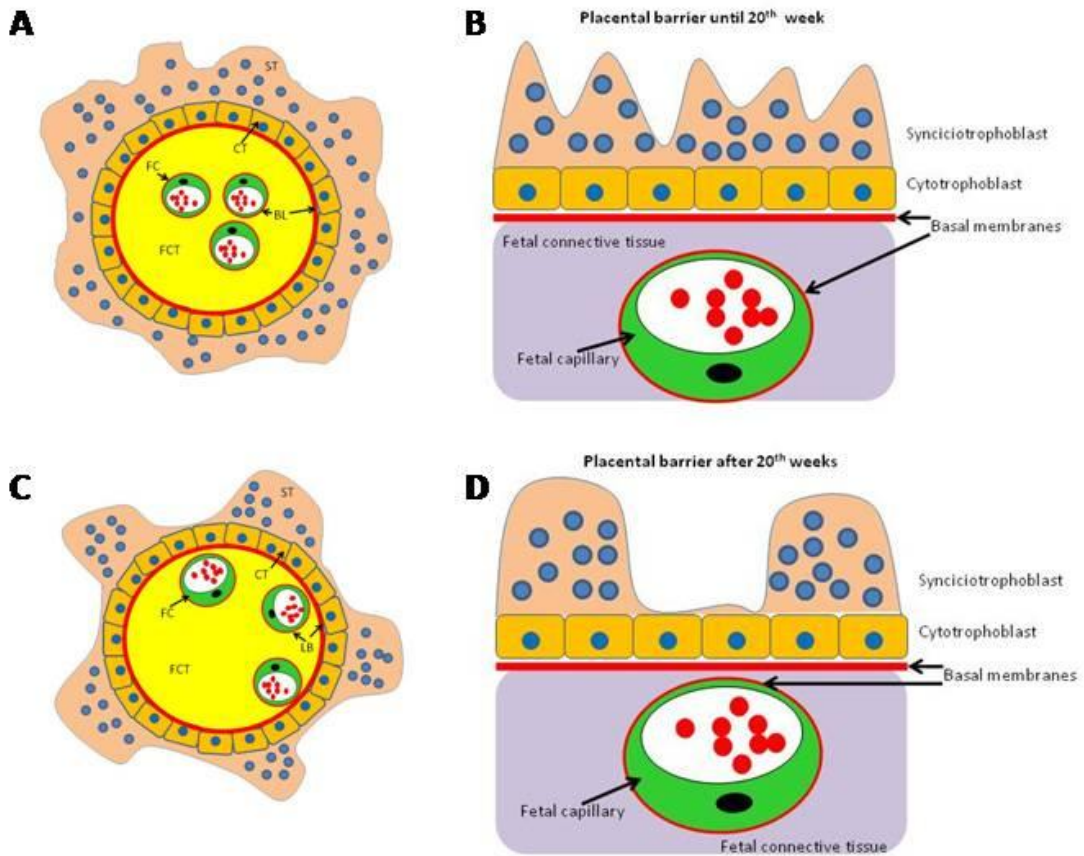


Estimación de la población mundial infectada con *Trypanosoma cruzi*:

La enfermedad de Chagas es endémica en el continente americano, afectando a 21 países. Adicionalmente se está detectando a esta patología en países no endémicos debido a formas de transmisión no vectorial (transfusiones, trasplantes y congénita). La “globalización” de la enfermedad de Chagas” se debe a migraciones tanto legales como ilegales de personas infectadas desde países endémicos.

Fuente: http://www.treatchagas.org/imagenes/MapChagasJun09_large.jpg

FIGURA 3

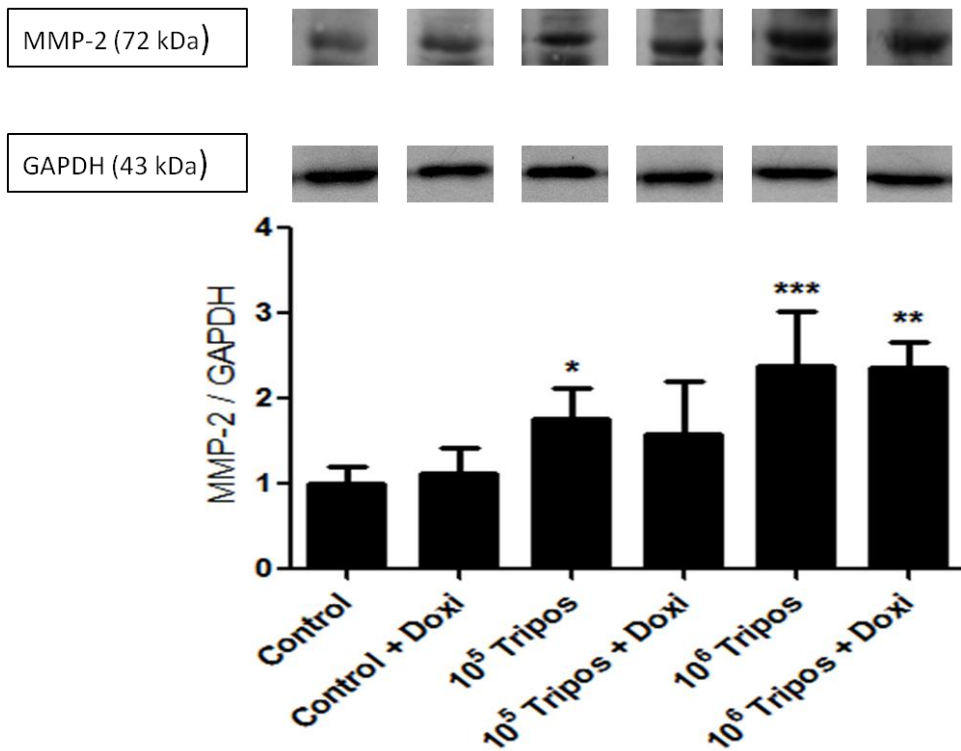


Barrera placentaria:

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

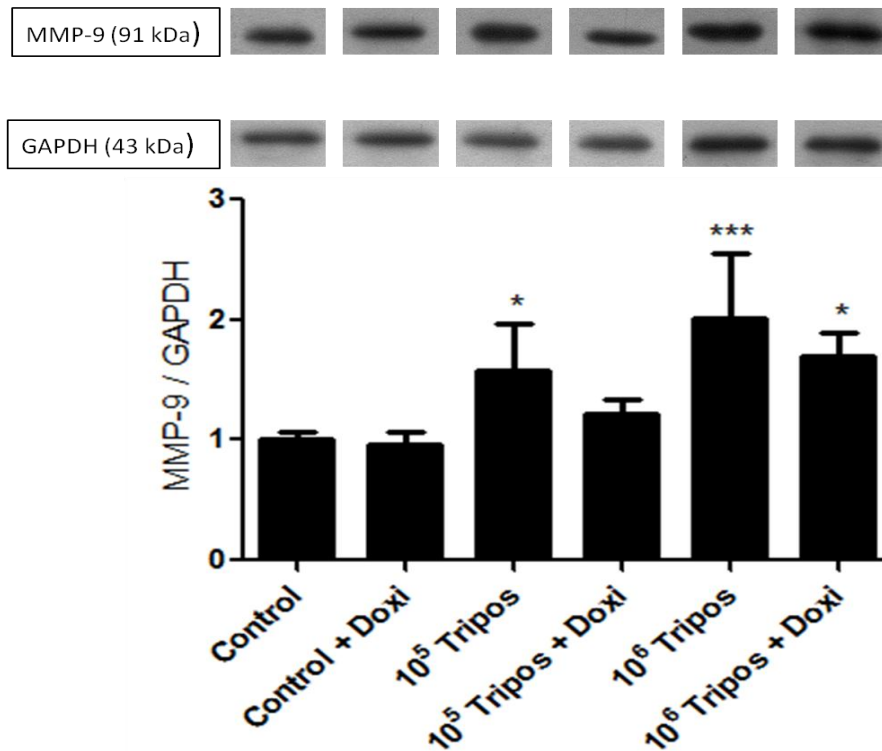
Fuente: Kemmerling *et al.*, 2010.

FIGURA 4



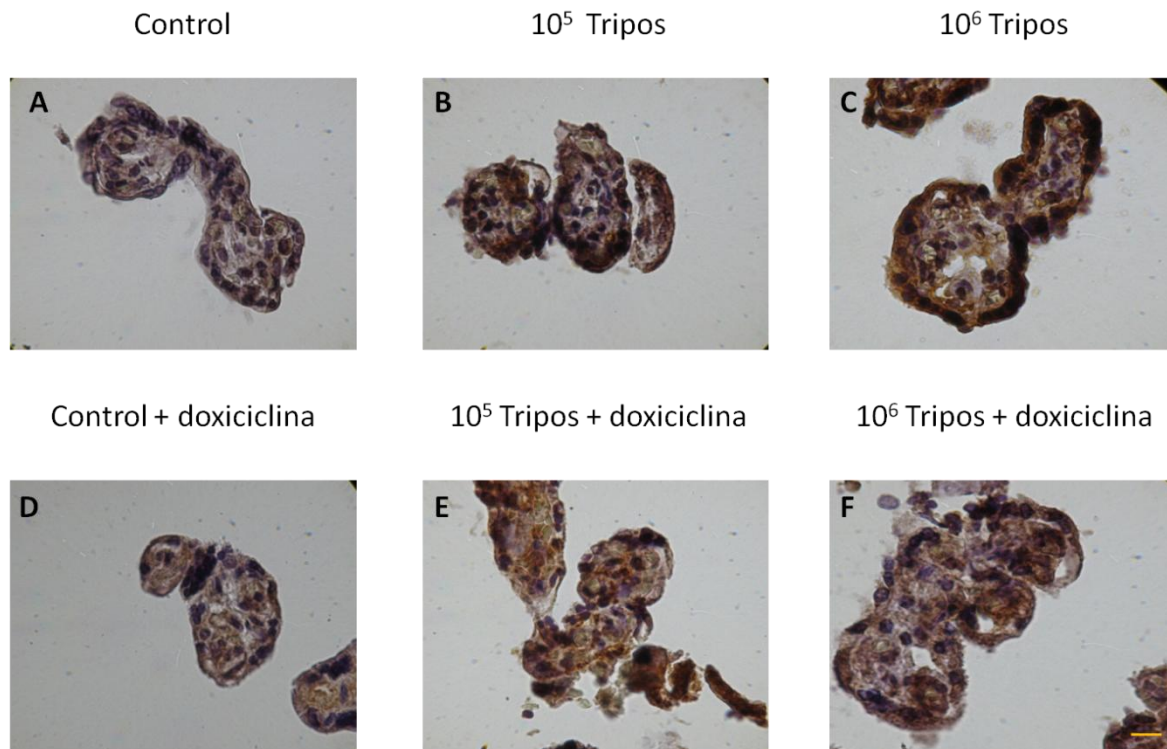
***Trypanosoma cruzi* induce la expresión de MMP-2, la que no es inhibida por doxiciclina:** Vellosidades coriónicas fueron incubadas en presencia y ausencia de 10⁵ y 10⁶ tripomastigotes de la cepa DM28c durante 24 horas a 37°C y en ausencia (A-C) y presencia de doxiciclina (100µM). Las muestras incubadas con tripomastigotes presentan mayores niveles de expresión de MMP-2 respecto al control. Doxiciclina, inhibidor de MMPs, no altera la expresión de MMP-2. Los niveles de expresión de MMP-2 fueron obtenidas mediante análisis densitométrico de los Western blots. Se muestra un Western blot representativo. Las columnas corresponden a los promedios, con su desviación estándar, de la razón MPP-2/GAPDH. Todos los valores fueron normalizados respecto a sus controles. Se utilizó el test estadístico ANDEVA seguido por “Dunnett’s post-test”. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

FIGURA 5



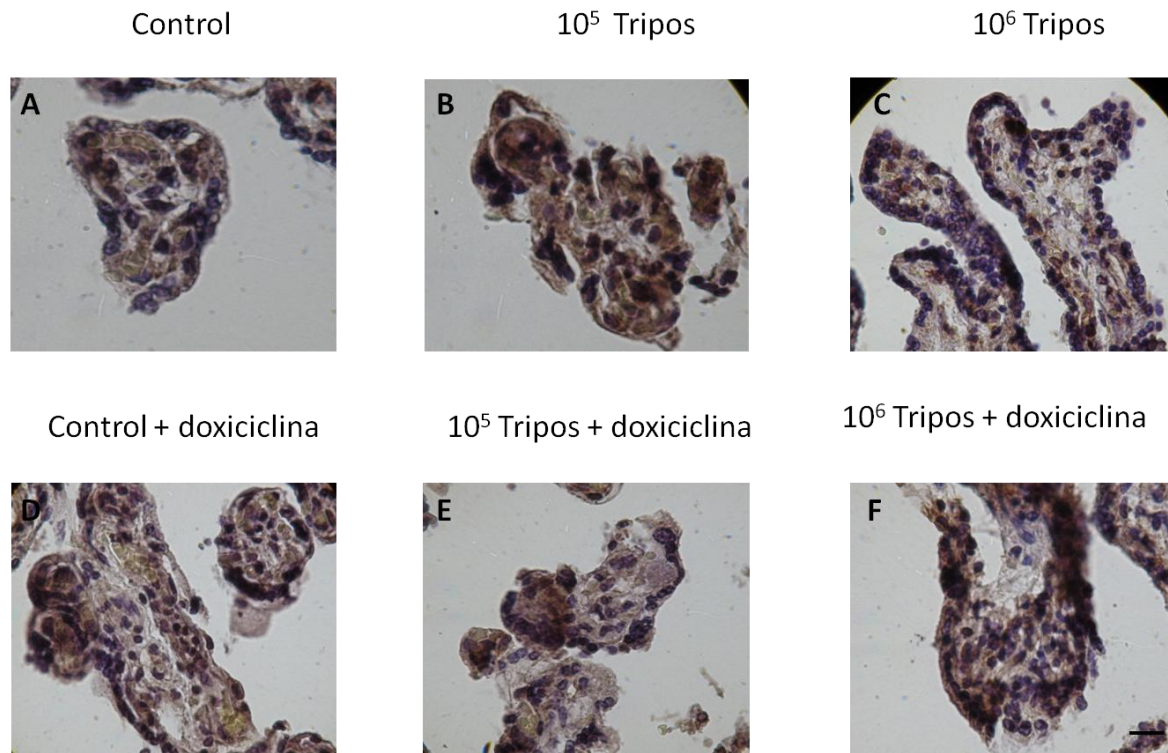
***Trypanosoma cruzi* induce la expresión de MMP-9, la que no es inhibida por doxiciclina:** Vellosidades coriónicas fueron incubadas en presencia y ausencia de 10⁵ y 10⁶ tripomastigotes de la cepa DM28c durante 24 horas a 37°C y en ausencia (A-C) y presencia de doxiciclina (100µM). Las muestras incubadas con tripomastigotes presentan mayores niveles de expresión de MMP-9 respecto al control. Doxiciclina, inhibidor de MMPs, no altera la expresión de MMP-9. Los niveles de expresión de MMP-9 fueron obtenidas mediante análisis densitométrico de los Western blots. Se muestra un Western blot representativo. Las columnas corresponden a los promedios, con su desviación estándar, de la razón MPP-9/GAPDH. Todos los valores fueron normalizados respecto a sus controles. Se utilizó el test estadístico ANDEVA seguido por “Dunnett’s post-test”. * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$.

FIGURA 6



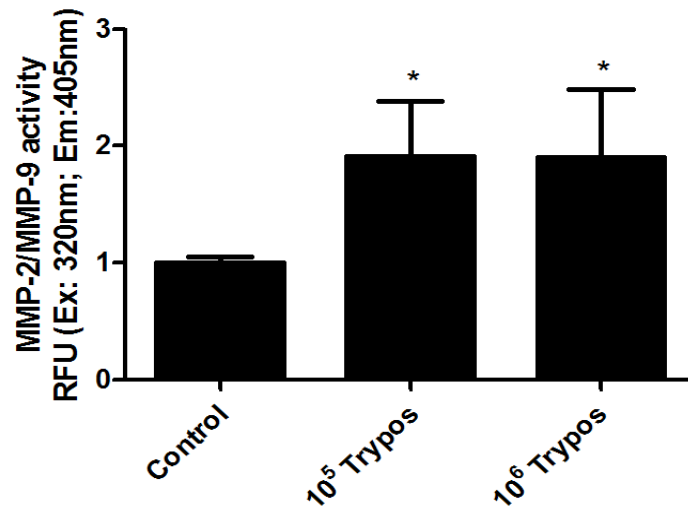
***Trypanosoma cruzi* induce la expresión de MMP-2, la que no es inhibida por doxiciclina:** Vellosidades coriónicas fueron incubadas en presencia y ausencia de 10^5 y 10^6 tripomastigotes de la cepa DM28c durante 24 horas a 37°C y en ausencia (A-C) y presencia de doxiciclina ($100\mu\text{M}$). Se observa un aumento de la inmunoreactividad para MMP-2 en las vellosidades incubadas con 10^5 y 10^6 tripomastigotes (B, C, E, F) respecto al control (A, D). Doxiciclina, inhibidor de MMPs, no altera la expresión de MMP-2. Las muestras fueron procesadas para inmunohistoquímica de rutina, el complejo Antígeno-anticuerpo fue revelado con DAB. Barra: $25\mu\text{m}$.

FIGURA 7



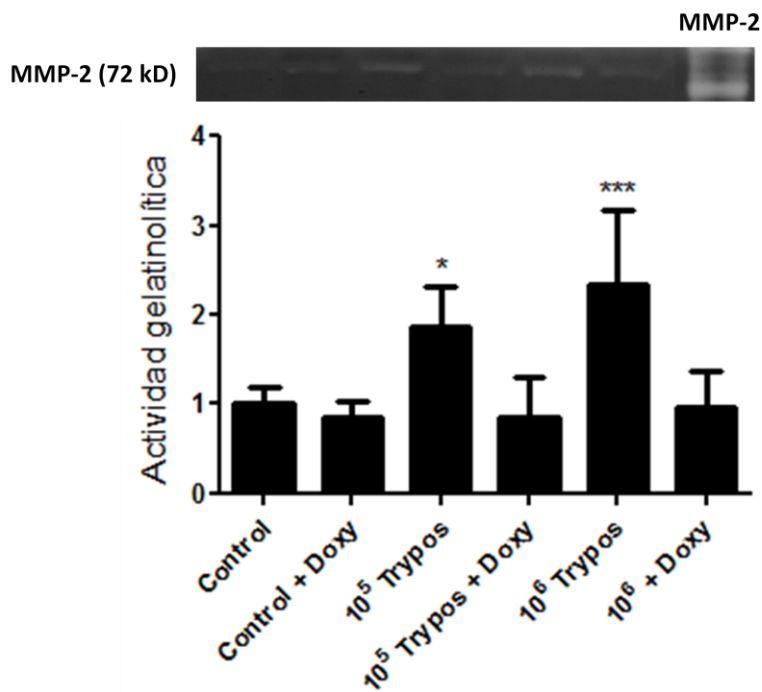
***Trypanosoma cruzi* induce la expresión de MMP-9, la que no es inhibida por doxiciclina:** Vellosidades coriónicas fueron incubadas en presencia y ausencia de 10^5 y 10^6 tripomastigotes de la cepa DM28c durante 24 horas a 37°C y en ausencia (A-C) y presencia de doxiciclina ($100\mu\text{M}$). Se observa un aumento de la inmunoreactividad para MMP-9 en las vellosidades incubadas con 10^5 y 10^6 tripomastigotes (B, C, E, F) respecto al control (A, D). doxiciclina, inhibidor de MMPs, no altera la expresión de MMP-9. Las muestras fueron procesadas para inmunohistoquímica de rutina, el complejo Antígeno-anticuerpo fue revelado con DAB. Barra: $25\mu\text{m}$.

FIGURA 8



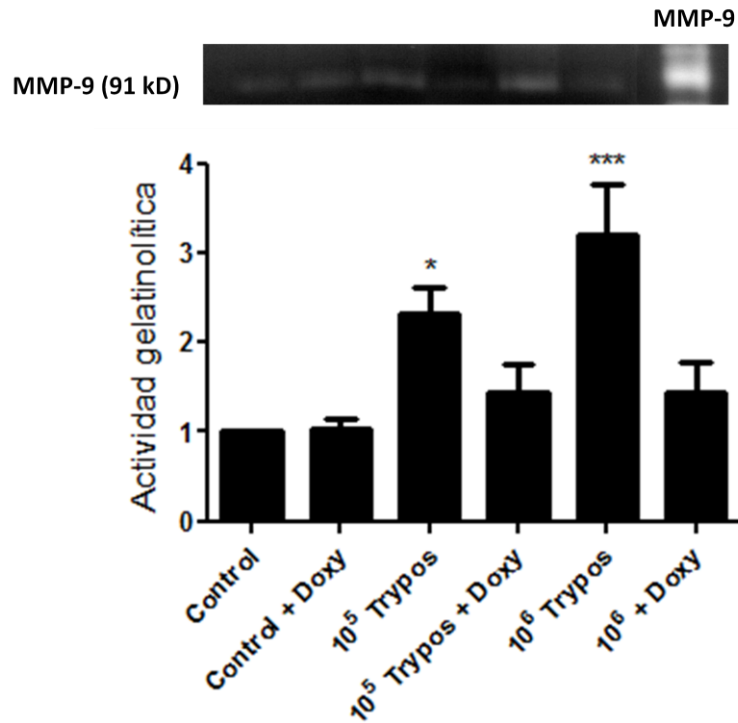
***T. cruzi* induce actividad de MMP-2 y MMP-9:** Vellosidades coriónicas fueron incubadas en presencia y ausencia de 10^5 y 10^6 tripomastigotes de la cepa DM28c durante 24 horas a 37°C. Las vellosidades incubadas con el parásito muestran un aumento estadísticamente significativo de la actividad enzimática. La actividad enzimática fue determinada mediante el Kit InnoZyme Gelatinase (MMP-2/MMP-9) Activity (Calbiochem, EE.UU.). Las columnas corresponden a los promedios, con su desviación estándar. Todos los valores fueron normalizados respecto a sus controles. Se utilizó el test estadístico T de Student. * $p < 0.05$.

FIGURA 9



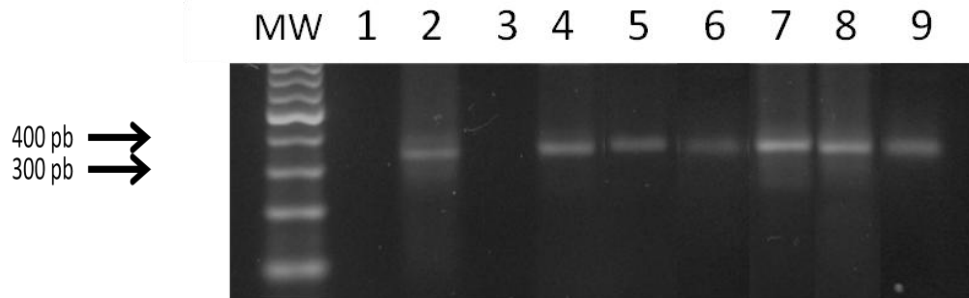
T. cruzi* induce actividad de MMP-2:** Vellosidades coriónicas fueron incubadas en presencia y ausencia de 10⁵ y 10⁶ tripomastigotes de la cepa DM28c durante 24 horas a 37°C y en ausencia y presencia de doxiciclina (100µM). La actividad gelatinolítica de MMP-2 fue determinada mediante zimografía en geles de poliacrilamida al 10% y 2% de gelatina. Las vellosidades incubadas con el parásito muestran un aumento estadísticamente significativo de la actividad enzimática. Se utilizó MMP-2 recombinante (Calbiochem®) como control positivo. Se muestra una zimografía representativa. Las columnas corresponden a los promedios, con su desviación estándar del análisis densitométrico de la bandas correspondientes a la actividad gelatinolítica. Todos los valores fueron normalizados respecto a sus controles. Se utilizó el test estadístico ANDEVA seguido por “Dunnett’s post-test”. **p* < 0.05, *p* < 0.001.

FIGURA 10



***T. cruzi* induce actividad de MMP-9:** Vellosidades coriónicas fueron incubadas en presencia y ausencia de 10^5 y 10^6 tripomastigotes de la cepa DM28c durante 24 horas a 37°C y en ausencia y presencia de doxiciclina ($100\mu\text{M}$). La actividad gelatinolítica de MMP-9 fue determinada mediante zimografía en geles de poliacrilamida al 10% y 2% de gelatina. Las vellosidades incubadas con el parásito muestran un aumento estadísticamente significativo de la actividad enzimática. Se utilizó MMP-9 recombinante (Calbiochem®) como control positivo. Se muestra una zimografía representativa. Las columnas corresponden a los promedios con su desviación estándar del análisis densitométrico de las bandas correspondientes a la actividad gelatinolítica. Todos los valores fueron normalizados respecto a sus controles. Se utilizó el test estadístico ANDEVA seguido por "Dunnnett's post-test". * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$.

FIGURA 11



La inhibición de la actividad de la Cruzipaina y las Metaloproteinasas 2 y 9 no impide la infección de los explantes de vellosidades coriónicas por tripomastigotes de *T. cruzi*. Vellosidades coriónicas fueron incubadas en presencia y ausencia de 10^5 y 10^6 tripomastigotes de la cepa DM28c durante 24 horas a 37°C y en presencia y ausencia de doxiciclina ($100\mu\text{M}$) o E64 ($10\mu\text{M}$).

Se amplificó un fragmento de 384 pb de minicírculo de kinetoplasto de *T. cruzi*. Las secuencias de los partidores usados fueron:

S35: 5'-AAATAATGTACGGGKAGATGCAT-3';

S36: 5'-GGGTTTCGATTGGGGTTGGTGT-3'.

Los amplificados de DNA se separaron en geles de agarosa al 1% preparados en tampón Tris-borato-EDTA y se tiñeron con la tinción de ácidos nucleicos GelRed®.

MW: Marcadores de peso molecular

1: Control negativo (sin DNA)

2: DNA de tripomastigotes

3: DNA de vellosidades coriónicas sin infectar

4: DNA de vellosidades coriónicas infectadas *ex vivo* con 10^5 tripomastigotes

5: DNA de vellosidades coriónicas infectadas *ex vivo* con 10^5 tripomastigotes y doxiciclina $100\mu\text{M}$

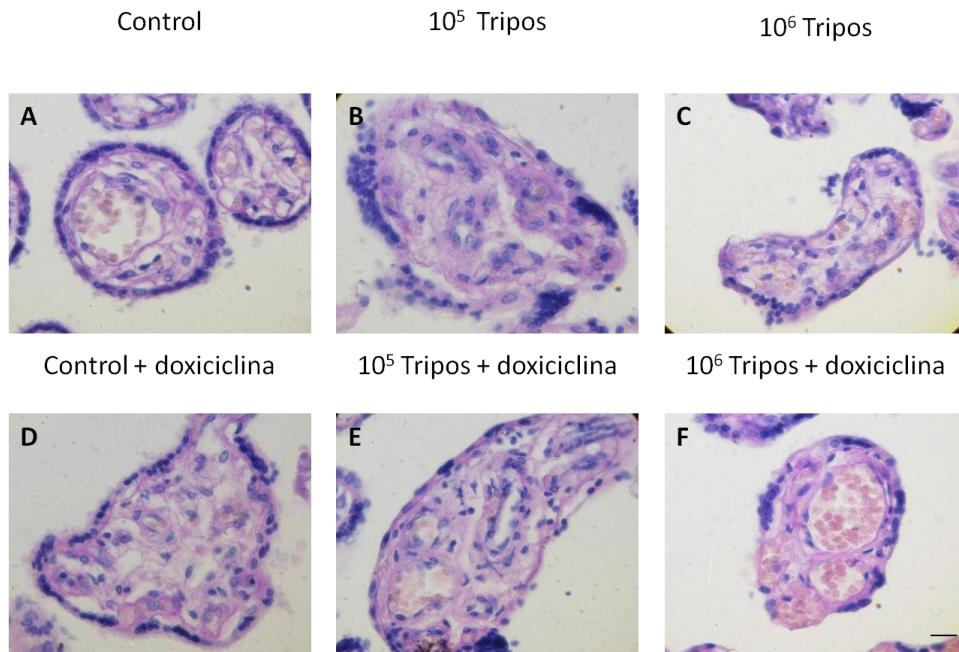
6: DNA de vellosidades coriónicas infectadas *ex vivo* con 10^5 tripomastigotes y E64 $10\mu\text{M}$

7: DNA de vellosidades coriónicas infectadas *ex vivo* con 10^6 tripomastigotes

8: DNA de vellosidades coriónicas infectadas *ex vivo* con 10^6 tripomastigotes y doxiciclina $100\mu\text{M}$

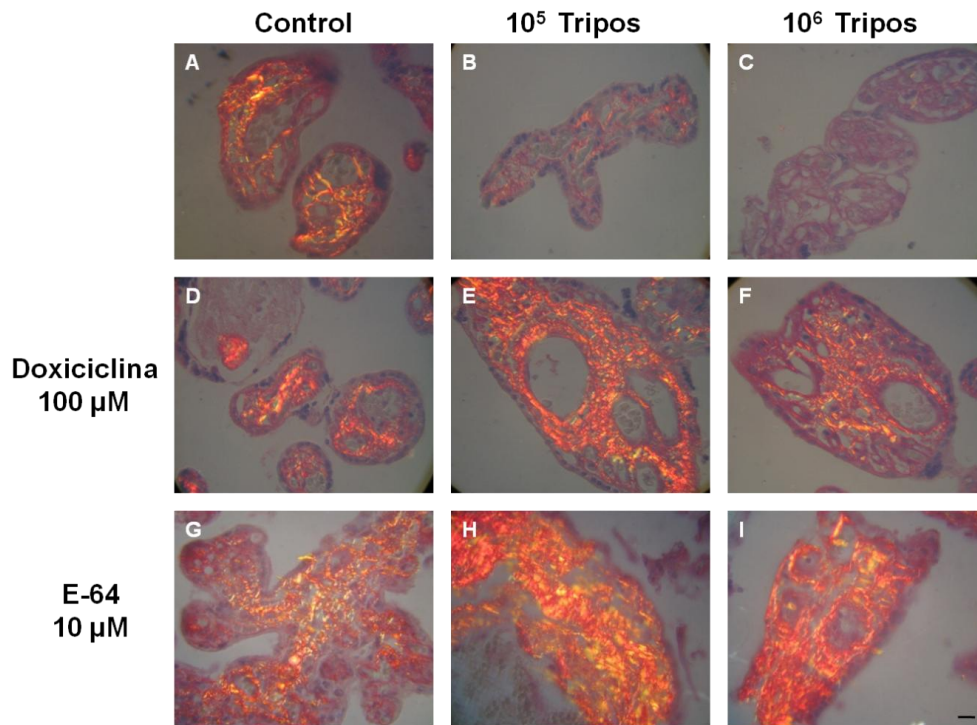
9: DNA de vellosidades coriónicas infectadas *ex vivo* con 10^6 tripomastigotes y E64 $10\mu\text{M}$

FIGURA 12



La inhibición de las metaloproteínas previene la destrucción de moléculas glicosiladas de la matriz extracelular: Vellosidades coriónicas fueron incubadas en ausencia (**A, D**) y presencia de 10⁵ (**B, E**) y 10⁶ (**C, F**) tripomastigotes de la cepa DM28c durante 24 horas a 37°C y en presencia (**D-F**) y ausencia (**A-C**) de doxiciclina (100µM). Se observa una menor tinción para moléculas glicosiladas (PAS) en las muestras incubadas sólo con el parásito (**B, C**) que las vellosidades controles (**A y D**). Las vellosidades coriónicas incubadas en presencia de doxiciclina y del parásito (**E-F**) no presentan mayores alteraciones en la reactividad para PAS. Las vellosidades coriónicas fueron procesadas mediante técnicas histológicas convencionales; las moléculas glicosiladas fueron analizadas histoquímicamente con PAS. Barra: 25 µm.

FIGURA 13



La inhibición de la actividad de la Cruzipaina y las Metaloproteinasas previene parcialmente la destrucción de la Matriz extracelular vellositaria.: Vellosidades coriónicas fueron incubadas en ausencia (**A, D, G**) y presencia de 10^5 (**B, E**) y 10^6 (**C, F**) tripomastigotes de la cepa DM28c durante 24 horas a 37°C en ausencia (**A-C**) o presencia de doxiciclina ($100\mu\text{M}$) (**D-E**) o E64 ($10\mu\text{M}$) (**G-H**). Se observa un severo daño al colágeno I en las vellosidades incubadas solo con el parásito (**B-C**) respecto a las vellosidades coriónicas controles (**A, D, G**). Las vellosidades coriónicas incubadas en presencia de doxiciclina y del parásito (**E-F**) o E64 y del parásito (**H-I**) no presentan mayores alteraciones en las fibras de colágeno I. Las vellosidades coriónicas fueron procesadas mediante técnicas histológicas convencionales; el colágeno I se identificó con la técnica histoquímica de picro rojo sirio. Barra $25\mu\text{m}$.

BIBLIOGRAFÍA

- **AMĂLINEI C.; CĂRUNTU I.; GIUȘCĂ S. E.; BĂLAN R.** 2010. Matrix metalloproteinases involvement in pathologic conditions. *Rom J Morphol Embryol* 51(2): 215-28
- **BASTOS I.; GRELLIER P.; MARTINS NF.; CADAVID-RESTREPO NF.; SOUZA MR.; AGUSTYNS K.; TEIXEIRA A.; SCHREVÉL J.; MIGRET B.; SLVEIRA J.; SANTANA J.** 2005. "Molecular, functional and structural properties of the prolyl oligopeptidase of *Trypanosoma cruzi* (POP Tc80), which is required for parasite entry into mammalian cells." *Biochem J* 388(1): 29-38.
- **BANCROFT J.; GAMBLE M.** 2008. *Theory and Practice of Histological Techniques*, 6ta edición, Elsevier Pub. Nueva York, EE.UU. 766p.
- **BELKACEMI C.; CHEN C.H.; ROSS M.G.; DESAI M.** 2009. Increased Placental Apoptosis in Maternal Food Restricted Gestations: Role of the Fas Pathway. *Placenta* 30: 739–751
- **BERASAIN P.; CARMONA C. ; FRANGIONE B. ;CAZZULO JJ.; GOÑO F.** 2003. Specific cleavage sites on human IgG subclasses by cruzipain, the major cysteine proteinase from *Trypanosoma cruzi*. *Mol Biochem Parasit* 130: 23–29.
- **CARDENAS T.; JOHNSON, C.; PRATAP, S.; NDE, P.; KLESHCHENKO, Y.; LIMA, M.; VILLALTA, F.** 2010. Regulation on extracellular matrix interactome by *Trypanosoma cruzi*. *Open Parasitol J* 4.: 72-76.
- **CARLIER Y.** 2005. Factors and mechanisms involved in the transmission and development of congenital infection with *Trypanosoma cruzi* *Rev Soc Bras Med Trop.* 38(2):105-7.
- **CARLIER Y.; TRUYENS C.** 2010. Maternal-fetal transmission of *Trypanosoma cruzi* to congenital chagas disease: definitions and limits. In: *American trypanosomiasis Chagas disease: One hundred years of research.* Elsevier Insights. Londres, Inglaterra. pp. 539-582.
- **CASTELLUCCI M.; KAUFMANN P.** 2006. Basic structure of the Villous Trees In: Benirschke K., Kaufmann P., Baergen R. *Pathology of the Human Placenta.* Quinta Edición. Springer Ed. NY, EE.UU. pp. 380-381.

- **CAZZULO JJ.** 1999. La cruzipaína, cisteína proteinasa principal del *Trypanosoma cruzi*: secuencia y organización genómica de los genes que la codifican. *MEDICINA* 59 (2): 7-10.
- **COOPER W.; HERNANDEZ-DÍAZ S.; ARBOGAST P.; DYER S.; GIDEON P.; HALL K.; KALETNBACH L.; RAY W.** 2009. Antibiotics potentially used in response to bioterrorism and the risk of major congenital malformations. *Paediatr Perinat Epidemiol* 23(1): 18-28
- **CORTHORN J.; REY S.; CHACÓN C.; VALDÉS G.** 2007. Spatio-temporal expression of MMP-2, MMP-9 and tissue kallikrein in uteroplacental units of the pregnant guinea-pig (*Cavia porcellus*). *Reprod Biol Endocrinol*:5-27.
- **COURA JR.** 2007. Chagas disease: what is known and what is needed: a background article. *Mem Inst Oswaldo Cruz*.102 (1):113-22.
- **CROSS JC.** 2006. Placental function in development and disease. *Reprod Fertil Dev.* 18(1-2):71-6.
- **DEMIR-WEUSTEN A.; SEVAL Y.; KAUFMANN P.; DEMIR R.; YUCELV G.; HUPPERTZ B.** 2007. Matrix metalloproteinases-2, -3 and -9 in human term placenta. *Acta histochemica* 109: 403-412.
- **DUASO J.; ROJO G.; CABRERA G.; GALANTI N.; BOSCO C.; MAYA JD.; 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: 705-711.
- **DUASO J.; ROJO G.; JAÑA F.; GALANTI N.; CABRERA J.; BOSCO C.; LÓPEZ-MUÑOZ R.; MAYA J.D.; FERRERIRA J.; KEMMERLING U.** 2011a. *Trypanosoma cruzi* induces apoptosis in *ex vivo* infected human chorionic villi. *Placenta* 32 (2011): 356-361
- **DUASO J.; YANEZ E.; CASTILLO C.; GALANTI N.; CABRERA G.; CORRAL G.; MAYA J.D.; ZULANTAY I.; APT W.; KEMMERLING U.** 2011b. Reorganization of extracellular matrix in placentas from women with asymptomatic Chagas disease: Mechanism of parasite invasion, or local placental defense? . *J Trop Med* . doi:10.1155/2012/758357.

- **DUASO J.; CASTILLO C.; KEMMERLING U.** 2011c. 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. In: The human Placenta, InTech, Rijeka, Croatia. ISBN 978-953-307-754-3.
- **ESTRADA-GUTIERREZ G.; GOMEZ-LOPEZ N.; ZAGA-CLAVELLINA V.; GIONO-CEREZO S.; ESPEJEL-NUÑEZ A.; GONZALEZ-JIMENEZ M.; ESPINO Y SOSA S.; OLSON .; VADILLO-ORTEGA F.** 2010. Interaction between pathogenic bacteria and intrauterine leukocytes triggers alternative molecular signaling cascades leading to labor in women. *Infect Immun*: 4792–4799.
- **FREDERIKS W.; MOOK O.** 2004. Metabolic Mapping of Proteinase Activity with Emphasis on In Situ Zymography of Gelatinases: Review and Protocols. *J Histochem Cytochem* 52(6): 711–722,
- **GEA S.; GUIÑAZU N.; PELLEGRINI A.; CARRERA SILVA E.A.; GIORDANENGO L.; CANO R.; AOKI M.P.** 2006. Cruzipaina, la principal cisteín proteasa de *Trypanosoma cruzi* en la interrelación huésped-parásito. *Inmunología*. 25 (4): 225-238.
- **GRAYSON, M.** 2010. Chagas disease. *Nature* 465 (7301): 3-22.
- **GUTIERREZ FR.; LALU MM.; MARIANO FS.; MILANEZI CM.; CENA J.; GERLACH RF.; SANTOS JE.; TORRES-DUEÑAS D.; CUNHA FQ; SCHULZ R.; SILVA JS.** 2008. Increased Activities of Cardiac Matrix Metalloproteinases Matrix Metalloproteinase (MMP)-2 and MMP-9 Are Associated with Mortality during the Acute Phase of Experimental *Trypanosoma cruzi* Infection. *J Infect Dis* 197(10): 1468-1476.
- **HUISMAN M.; TIMMER A.; ZEINSTR A.; SERLIER E.; HANEMAAIJER R.; GOOR H.; ERWICHA J.** 2004. Matrix-metalloproteinase Activity in First Trimester Placental Bed Biopsies in Further Complicated and Uncomplicated Pregnancies. *Placenta* 25: 253–258.
- **HUPPERTZ B.; BORGES M.** 2008. Placenta trophoblast fusion. *Methods Mol Biol* 475: 135—147

- **JERZAK M.; BISCHOF P.** 2002. Apoptosis en la placenta humana durante el primer trimestre: papel para mantener el privilegio inmune en la superficie materno-fetal y en el remodelado del trofoblasto. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2 (Edición Española): 142-146.
- **JUNQUEIRA L.; BIGNOLAS G.; BRETANI RR.** 1979. Picrosirius staining plus polarization microscopy, a specific method for collagen detection in tissue sections. *Histochem J.*(11): 447-455.
- **JUNQUEIRA L.; CARNEIRO J.** 2005. *Basic Histology: Text and Atlas.* 11 edition McGraw-Hill Company. NY, EE.UU. 226pp.
- **KEMMERLING U, MUÑOZ P, MÜLLER M, SÁNCHEZ G, AYLWIN ML, KLANN E, CARRASCO MA, HIDALGO C.** 2007. Calcium release by ryanodine receptors mediates hydrogen peroxide-induced activation of ERK and CREB phosphorylation in N2a cells and hippocampal neurons". *Cell Calcium.* 41(5):491-502.
- **KEMMERLING U.; BOSCO C.; GALANTI, N.** 2010. Infection and invasion mechanism of *Trypanosoma cruzi* in the congenital transmission of Chagas' disease: A proposal. *Biol Res* 46(3): 307-316.
- **KIERNAN, J.A,** 2008. *Histological and histochemical methods : theory and practice,* 4th. Scion publishing Ltd. Oxfordshire, U.K.
- **LAUER-FIELDS J.; SRITHARAN T.; SHARON STACK M.;NAGASE H.; FIELDS G.** 2003. Selective Hydrolysis of Triple-helical Substrates by Matrix Metalloproteinase-2 and -9. *J. Biol. Chem.* 278(20):18140-18145.
- **MALLIMACI M.C.; SOSA-ESTANI S.; RUSSOMANDO G.; SANCHEZ Z.; SIJVARGER C.; ALVAREZ I. M.; BARRIONUEVO L.; LOPEZ C.; SEGURA E.** 2010. Early diagnosis of congenital *Trypanosoma cruzi* infection, using shed acute phase antigen, in Ushuaia, Tierra del Fuego, Argentina. *Am J Trop Med Hyg* 82(1): 55-9.
- **MARBAIX E.; DONNEZ J.; COURTOY P.J.; EECKHOUY Y.** 1992. Progesterone regulates the activity of collagenase and related gelatinases A and B in human endometrial explants. *Proc Nat Acad Sci USA* 89: **11789-11793.**

- **MARINO AP, SILVA AA, PINHO RT, LANNES-VIEIRA J.** 2003. *Trypanosoma cruzi* infection: a continuous invader-host cell cross talk with participation of extracellular matrix and adhesion and chemoattractant molecules. *Braz J Med Biol Res.* 36(8):1121-33.
- **MENDES DA CRUZ D.; SILVA J.; COTTA-DE-ALMEIDA V.; SAVINO W.** 2006. Thymocyte migration during experimental acute *Trypanosoma cruzi* infection: combined role of fibronectin and the chemokines CXCL12 and CCL4. *Eur J Immunol.* 36(6):1486-93.
- **MOORE KL.; PERSEAUD T.** 2004. *The Developing Human, Clinically Oriented Embryology* 7° edition Elsevier. Pp. 215.
- **MUÑOZ-SARAVIA S.; HABERLAND A.; WALLUKAT G.; SCHIMKE, I.** 2010. Chronic Chagas heart disease: a disease on its way to becoming a worldwide health problem: epidemiology, etiopathology, treatment, pathogenesis and laboratory medicine. *Heart fail Rev.* (1):1-4.
- **NOGUEIRA DE MELO AC.; PARAGUAI E.; RAMALHO C.; SOUZA A.; BRANQUINHA M.; MASINI C.; GARCIA F.; FERREIRA T.; DE SOUZA M.; LEAL M.; MEIRELLES M.; VERMELHO A.** 2010. Detection of matrix metalloproteinase-9-like proteins in *Trypanosoma cruzi*. *Exp Par* 125 (2010): 256–263.
- **OHA K.; PARK K.; KIM S.; LEE S.; YOON.; H.** 2011. Predictive value of intra-amniotic and serum markers for inflammatory lesions of preterm placenta. *Placenta* 32: 732-736.
- **PARKER, E.; SETHI, A.** 2011. Chagas disease: coming to a place near you. *Derm clin,* 29(1): 53-62.
- **PRATA A.** 2001 Clinical and epidemiological aspects of Chagas disease. *Lancet Infect Dis.* (2):92-100.
- **RASSI JR, A.; RASSI, A.; MARIN-NETO, J. A.** 2010. Chagas disease. *The Lancet,* 375(9723):1388-1402.
- **SANTOS CC.; SANTANNA C.; TERRES A.; CUNHA-E-SILVA NL.; SCHARFSTEIN J.; DE LIMA A.** 2005. Chagasin, the endogenous cysteine-

proteaseinhibitor of *Trypanosoma cruzi*, modulates parasite differentiation and invasion of mammalian cells. J Cell Sci(118): 901-915.

- **SCHMUNIS, G.** 2007. Epidemiology of Chagas disease in non-endemic countries: the role of international migration. Mem Inst Oswaldo Cruz 102 Suppl (PAHO 2006): 75-85.
- **SINGH M.; KINDELBERGER D.; NAGYMANYOKI A. SHU-WING N.; QUICK C.; ELIAS K.; YAMAMOTO H.; FICHOVA R.; FULOP V.; BERKOWITZ R.** 2011. Matrix metalloproteinases and their inhibitors and inducer in gestational trophoblastic diseases and normal placenta. Gynecol Oncol 122:178-182.
- **SNOEK-VAN BEURDEN P.; VON DEN HOFF J.** 2005. Zymographic techniques for the analysis of matrix metalloproteinases and their inhibitors. BioTechniques 38: 73-83
- **SYME M.; PAXTON J.; KEELAN JA.** 2004. Drug transfer and metabolism by the human placenta. Clin Pharmacokinet. 43(8):487-514.
- **TAN K.; MAGILL A.; PARISE M.; ARGUIN P.** 2011. Doxycycline for malaria chemoprophylaxis and treatment: report from the CDC expert meeting on malaria chemoprophylaxis. Am J Trop Med Hyg. 2011 84(4):517-31.
- **TAO L.; SUHUA C.; JUANJUAN C.; ZONGZHI Y.; JUAN X.; DANDAN Z.** 2011. In vitro study on human cytomegalovirus affecting early pregnancy villous EVT's invasion function. Virol J. 8: 114-122.
- **TEIXEIRA A.; NASCIMENTO R.; STURM N.** 2006. Evolution and pathology in chagas disease, a review. Mem Inst Oswaldo Cruz 101(5): 463-91.
- **TEIXEIRA A.; HECHT M.; GUIMARO M.; SOUSA A.; NITZ N.** 2011. Pathogenesis of chagas' disease: parasite persistence and autoimmunity. Clin Microbiol Rev. 24(3):592-630.
- **THOMPSON S.** 1966. Selected histochemical and histopathological methods, CC Thomas, Springfield, EE.UU., pp 520-539
- **VERANI J.; MONTGOMERY S.; SCHULKIN J.; ANDERSON; JONES BJ.** 2010. Survey of obstetrician-gynecologists in the United States about Chagas disease. Am J Trop Med Hyg 83 (4); 891-895.

- **WORLD HEALTH ORGANIZATION.** 2007. Reporte del grupo de trabajo científico sobre la enfermedad de Chagas. Programa Especial de Investigación y enseñanza sobre enfermedades tropicales (TDR).[World Health Organ Tech Rep Series. En línea] < <http://apps.who.int/tdr/svc/publications/tdr-research-publications/reporte-enfermedad-chagas> > [consulta: 07-07-2010].
- **XU P.; ALFAIDY N.; CHALLIS J.** 2002. Expression of Matrix Metalloproteinase (MMP)-2 and MMP-9 in Human Placenta and Fetal Membranes in Relation to Preterm and Term Labor. *J Clin Endocrinol Metab.* 87(3): 1353–1361.
- **YOSHIDA N.** 2006. Molecular basis of mammalian cell invasion by *Trypanosoma cruzi*. *An Acad Bras Cienc.* 78(1):87-111.
- **ZULANTAY I.; HONORES P.; SOLARI A.; APT W.; OSUNA A.** 2004. Use of polymerase chain reaction (PCR) and hybridization assays to detect *Trypanosoma cruzi* in chronic chagasic patients treated with itraconazole or allopurinol. *Diagn Microbiol Infect Dis* 48 (4): 253–257.

ANEXOS

ANEXO 1



CONSENTIMIENTO INFORMADO

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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



25 JUN 20

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

Voluntariedad: Su participación en esta investigación es totalmente voluntaria

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

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

Investigador:

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

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

Conclusión:

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

Nombre del sujeto

Firma

Fecha

Nombre de informante

Firma

Fecha

Ulrike Kemmerling

Nombre del investigador

Ulrike Kemmerling

Firma

26/6/08

Fecha

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

ANEXO 2



UNIDAD DE BIOSEGURIDAD
FACULTAD DE MEDICINA
UNIVERSIDAD DE CHILE

Santiago, 30 de Abril 2008.-

Señores
PROGRAMA FONDECYT
PRESENTE

Estimados señores

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

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

Tomé conocimiento: Profesora  Ulrike Kemmerling Weis

Profesora  Mónica Acuña Pazke
Directora Unidad de Prevención de Riesgos y Bioseguridad



* Se adjunta anexo IX.1 Proyecto Fondecyt

c.c.

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

Av. Independencia 1027, Teléfono (56)-2 9786564, e-mail: bioseaur@med.uchile.cl upr@med.uchile.cl

ANEXO 3



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE MEDICINA

COMITÉ DE ÉTICA DE INVESTIGACIÓN EN SERES HUMANOS



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

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

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

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

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

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

Notificación oportuna de reacciones adversas: No es necesaria.

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

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

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



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE MEDICINA

COMITÉ DE ÉTICA DE INVESTIGACIÓN EN SERES HUMANOS

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

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


Marianne Gaudlitz
Sra. Marianne Gaudlitz
Vicepresidenta
Comité de Ética en Investigación
en Seres Humanos
25 JUN. 2008

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

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