



UNIVERSIDAD DE CHILE



FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS  
ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS

INFECCIÓN EX VIVO DE VELLOSIDADES CORIÓNICAS HUMANAS CON  
*TRYPANOSOMA CRUZI*: EFECTOS TERAPÉUTICOS Y TÓXICOS DE  
NIFURTIMOX Y BENZNIDAZOL

**GEMMA BEATRIZ ROJO ARAVENA**

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

**Profesor Guía: Ulrike Kemmerling, MSc, PhD.**

Financiamiento: Proyectos Bicentenario Anillo ACT 29 y ACT 112, Bicentenario Red 07,  
Fondecyt 11080166

**SANTIAGO – CHILE**



2

# UNIVERSIDAD DE CHILE



## FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS

### INFECCIÓN EX VIVO DE VELLOSIDADES CORIÓNICAS HUMANAS CON *TRYPANOSOMA CRUZI*: EFECTOS TERAPÉUTICOS Y TÓXICOS DE NIFURTIMOX Y BENZNIDAZOL

#### **GEMMA BEATRIZ ROJO ARAVENA**

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

NOTA FINAL: .....

	NOTA	FIRMA
PROFESOR GUÍA: ULRIKE KEMMERLING W.	.....	.....
PROFESOR CONSEJERO: FERNANDO FREDES M.	.....	.....
PROFESOR CONSEJERO: HÉCTOR ADARMES A.	.....	.....

**Financiamiento: Proyectos Bicentenario Anillo ACT 29 y ACT 112, Bicentenario Red 07,  
Fondecyt 11080166**

**SANTIAGO – CHILE**

# ÍNDICE

RESUMEN .....	5
SUMMARY .....	6
INTRODUCCION .....	7
REVISION BIBLIOGRAFICA.....	9
Historia.....	9
<i>Trypanosoma cruzi</i> .....	9
Manifestaciones clínicas de la enfermedad de Chagas .....	11
Fase aguda .....	11
Fase de latencia.....	12
Fase crónica.....	12
Diagnóstico .....	13
Enfermedad de Chagas congénita .....	13
Infección <i>ex vivo</i> de vellosidades coriónicas placentarias con <i>T. cruzi</i> :.....	16
Tratamiento de la enfermedad de Chagas .....	17
Mecanismo de acción de Nifurtimox y Benznidazol.....	18
Metabolismo de tioles y defensa contra radicales libres.....	20
Apoptosis.....	22
Lipoperoxidacion.....	23
HIPÓTESIS .....	25
OBJETIVOS .....	25
OBJETIVO GENERAL.....	25
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	25
MATERIALES Y MÉTODOS .....	26
Obtención de formas infectivas de <i>T. cruzi</i> : .....	26
Obtención de placentas: .....	26
Infección <i>ex vivo</i> de vellosidades coriónicas con <i>T. cruzi</i> : .....	27
Drogas: .....	27
Análisis histológico de las vellosidades coriónicas: .....	28

Identificación de antígenos en las vellosidades coriónicas: .....	28
Determinación de lipoperoxidación en las vellosidades coriónicas:.....	29
Determinación de fragmentación de DNA mediante TUNEL: .....	29
Extracción y cuantificación de DNA: .....	31
Reacción de polimerasa en cadena (PCR):.....	31
Análisis estadístico: .....	32
Bioseguridad:.....	32
Bioética:.....	32
RESULTADOS.....	33
Bz previene parcialmente el daño tisular observado en vellosidades coriónicas humanas infectadas <i>ex vivo</i> con <i>T. cruzi</i> .....	33
El daño tisular observado en vellosidades coriónicas humanas infectadas <i>ex vivo</i> con <i>T. cruzi</i> , en presencia y ausencia de Nx, se debe tanto a la presencia del parásito como a un efecto tóxico de Nx .....	35
Los tratamientos con Nx y Bz no son capaces de eliminar al parásito de las vellosidades coriónicas infectadas <i>ex vivo</i> con <i>T. cruzi</i> . .....	37
DISCUSIÓN .....	38
CONCLUSIONES.....	44
BIBLIOGRAFÍA .....	67

## FIGURAS

Ciclo biológico de <i>T. cruzi</i> : .....	45
Formas celulares de <i>T. cruzi</i> : .....	46
Estimación de la población mundial infectada con <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	47
Drogas utilizadas en el tratamiento de la enfermedad de Chagas .....	48
Probable mecanismo de acción de Benznidazol y Nifurtimox .....	49
Bz previene parcialmente el daño tisular en vellosidades coriónicas humanas inducido por la infección <i>ex vivo</i> con <i>T. cruzi</i> : Análisis histopatológico. ....	50
Bz previene parcialmente la destrucción y desprendimiento del sincitiotrofoblasto en vellosidades coriónicas infectadas <i>ex vivo</i> con <i>T. cruzi</i> .....	51
Bz previene parcialmente la desorganización del colágeno I en el tejido conectivo fetal en vellosidades coriónicas infectadas <i>ex vivo</i> con <i>T. cruzi</i> .....	52
Bz no induce fragmentación de DNA en explantes de vellosidades coriónicas: ...	53
<i>T. cruzi</i> induce fragmentación de DNA en las vellosidades coriónicas, el que no es prevenido por Bz: .....	54
Bz no induce un aumento de células TUNEL+, sin embargo no es capaz de prevenir la inducción de células TUNEL+ en vellosidades coriónicas incubadas con <i>T. cruzi</i> .....	55
Bz y <i>T. cruzi</i> no inducen lipoperoxidación en las vellosidades coriónicas humanas. ....	56
El daño tisular se debe tanto a la presencia de <i>T. cruzi</i> como al efecto tóxico de Nx: Analisis histopatológico.....	57
La destrucción y desprendimiento del sincitiotrofoblasto en vellosidades coriónicas infectadas <i>ex vivo</i> con <i>T. cruzi</i> se debe tanto a la presencia del parásito como a Nx .....	58
La desorganización de colágeno I en el tejido conectivo fetal en vellosidades coriónicas infectadas <i>ex vivo</i> con <i>T. cruzi</i> se debe tanto a la presencia del parásito como a Nx .....	59
Nx no induce fragmentación de DNA en explantes de vellosidades coriónicas: ...	60

T. cruzi induce fragmentación de DNA en las vellosidades coriónicas, el que no es prevenido por Nx: .....	61
Nx no induce un aumento de células TUNEL+, sin embargo no es capaz de prevenir la inducción de células TUNEL+ en vellosidades coriónicas incubadas con <i>T. cruzi</i> .....	62
Nx y <i>T. cruzi</i> no inducen lipoperoxidación en las vellosidades coriónicas humanas. ....	63
Ninguna de las drogas es capaz de eliminar a <i>T. cruzi</i> en vellosidades coriónicas infectadas <i>ex vivo</i> con el parásito:.....	64
Bz no elimina al parásito en las vellosidades coriónicas humanas infectadas <i>ex vivo</i> con <i>T. cruzi</i> .....	65
Nx no elimina en las vellosidades coriónicas humanas infectadas <i>ex vivo</i> con. <i>T. cruzi</i> .....	66

## RESUMEN

La enfermedad de Chagas es una parasitosis endémica en Latinoamérica. Es causada por *Trypanosoma cruzi*, protozooario hemoflagelado, que afecta al hombre como uno de los hospederos mamífero. La transmisión congénita ha adquirido cada vez más importancia epidemiológica y es parcialmente responsable de la “globalización” de esta patología.

Nifurtimox (Nx) y Benznidazol (Bz) constituyen las principales drogas disponibles para el tratamiento de esta enfermedad. Sin embargo, presentan importantes efectos secundarios.

En esta memoria de título se ha estudiado en un modelo de infección *ex vivo* de explantes de vellosidades coriónicas humanas con tripomastigotes de *T. cruzi*, los posibles efectos tóxicos y terapéuticos de Nx y Bz.

La infección placentaria se comprobó mediante detección del parásito por PCR e inmunohistoquímica (Ac anti-cruzipaína). El análisis histopatológico se efectuó mediante tinciones de hematoxilina-eosina, picro rojo sirio e inmunohistoquímica (Ac anti-lactógeno placentario humano). La apoptosis se determinó por la detección de células TUNEL+ y la inducción de lipoperoxidación mediante determinación de malondialdehído mediante HPLC.

El parásito provoca un marcado daño tisular así como inducción de apoptosis en las vellosidades coriónicas humanas. Nx muestra un efecto citotóxico sobre el tejido placentario, que no se observa con Bz. Este último además revierte parcialmente el daño tisular, causado por el parásito. Las drogas no eliminan al parásito del tejido placentario, ni con las concentraciones más altas ensayadas.

## SUMMARY

Chagas' disease, one of the major public health concerns in Latin America, is caused by the haemophagelated protozoan *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*). Mammals, including human, are one of the biological hosts. In the past few years congenital transmission of *T. cruzi* has become more important, and partly responsible for the "globalization of Chagas' disease".

Nifurtimox (Nx) and Benznidazole (Bz) are the main drugs available for treatment of this disease, however, they have several side effects

In order to determine the possible toxic and therapeutic effects of Nx and Bz we incubated chorionic villous explants from normal human placenta *ex vivo* with the parasite in presence and absence of Nx or Bz. Infection of the chorionic villi with the parasite was confirmed by immunohistochemistry (anti-cruzipain antibody) and PCR. Histopathological analysis was performed with hematoxylin-eosin and picosirius red staining and immunohistochemistry (anti-human placental lactogen antibody). Apoptosis was determined by TUNEL+ cell detection and the lipoperoxidation by malondialdehyde determination with HPLC. *T. cruzi* induces severe tissue damage and apoptosis in the human chorionic villi. Nx presents a cytotoxic effect on the placental tissue, which is not observed with Bz. The latter also prevents partially the tissue damage caused by the parasite. The drugs, even in the highest concentration used, do not eliminate the parasite from placental tissue.



## INTRODUCCION

La enfermedad de Chagas es producida por el protozoo hemoflagelado *Trypanosoma cruzi*. Este parásito presenta un ciclo de vida indirecto, que comprende insectos hematófagos como hospederos intermediarios (en Chile *Triatoma infestans*, *Mepraia spinolai* y *M. gajardoi*) y mamíferos, incluido el hombre, como hospederos definitivos. Este agente patógeno adopta tres formas morfológicas durante su ciclo biológico, las que se caracterizan por tamaño y por las posiciones relativas del flagelo, kinetoplasto y núcleo. Dentro de estas formas celulares encontramos al amastigote como la forma reproductiva en el interior de las células mamíferas, el epimastigote, la forma reproductiva en el tracto digestivo de los invertebrados y en medios de cultivo, y finalmente al tripomastigote, que es la forma infectiva para el mamífero.

La transmisión de la enfermedad se produce, principalmente, por los parásitos presentes en las deyecciones del insecto parasitado por *T. cruzi*, que éste deposita sobre la piel del mamífero cuando se alimenta de sangre. Otras formas de transmisión incluyen las transfusiones de sangre y órganos así como la transmisión congénita. Esta última ha adquirido mayor relevancia epidemiológica, siendo responsable de globalización de la enfermedad de Chagas.

La infección congénita por *T. cruzi* se asocia a partos prematuros, bajo peso al nacer, abortos y nacidos muertos. La fisiopatología de la infección congénita se desconoce. Se ha sugerido que el parásito alcanza al feto vía sanguínea atravesando la placenta. La barrera placentaria, a nivel de las vellosidades coriónicas, actúa solamente como tal cuando las moléculas tienen cierto tamaño, configuración y carga. *T. cruzi* es capaz de atravesar a sincitiotrofoblasto, citotrofoblasto, tejido conectivo fetal y endotelio fetal. La mayor parte de los fármacos y otras sustancias presentes en el plasma sanguíneo materno también atraviesan esta barrera y pasan a la sangre fetal.

Las drogas Nifurtimox (Nx) y Benznidazol (Bz) se usan actualmente como tratamiento de la enfermedad de Chagas. Sin embargo, se han descrito diversos

efectos secundarios adversos, que van desde las náuseas hasta las convulsiones o neuropatías.

El mecanismo de acción actualmente propuesto para ambas drogas es la formación de radicales libres y/o metabolitos electrofílicos. Sin embargo, últimamente se ha cuestionado la capacidad de generar especies reactivas del oxígeno y nitrógeno de Nx, por lo que su mecanismo de acción no está claro.

En esta memoria de título se propone el uso de un modelo tisular placentario de infección *ex vivo* con *T. cruzi* para estudiar los efectos de Nx y Bz como fármacos antichagásicos, en cuanto a su efectividad como agentes antiparasitarios y sus posibles efectos citotóxicos sobre la placenta humana.

## REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

### Historia

La enfermedad de Chagas es causada por el parásito *Trypanosoma cruzi*. Esta patología fue descrita por primera vez, en el trabajo pionero por el Doctor Carlos Chagas (Chagas, 1909). Este médico brasileño describió las manifestaciones clínicas de la patología, al agente patógeno en sus tres formas morfológicas, al vector y la forma de transmisión (Teixeira *et al.*, 2006).

### Trypanosoma cruzi

*Trypanosoma cruzi* es un protozoo hemoflagelado con un ciclo de vida indirecto, que comprende a insectos hematófagos (triatominos), como vectores biológicos, y a mamíferos, incluido el hombre, como hospederos mamíferos. Los principales triatominos vectores de *T. cruzi* en Sudamérica son *Triatoma infestans* (vinchuca), *Rhodnius prolixus* y *Panstrongylus megistus*. Además de *T. infestans* (ciclo domiciliario), en Chile se encuentran *Mepraia spinolai* y *M. gajardoi* (ciclo silvestre) (World Health Organization, 2002).

Se han descrito tres ciclos de transmisión vectorial de la enfermedad: doméstico, peridoméstico y silvestre, siendo el ciclo doméstico el de mayor relevancia para el hombre. Este último se presenta en áreas rurales y periurbanas, generalmente por los hábitos de alimentación de un insecto parasitado por *T. cruzi*. Este insecto inmediatamente después de alimentarse, deposita sobre la piel del individuo sus deyecciones contaminadas con tripomastigotes metacíclicos (infectivos). Estos ingresan al individuo a través de piel y mucosas, facilitado por rasquido de la zona de la picadura y por enzimas proteolíticas de la saliva del insecto. En el hospedero mamífero son fagocitados por células presentadoras de antígeno, diferenciándose a amastigotes, forma de replicación citoplasmática obligada (Amino *et al.*, 2002). Tras varias divisiones, los amastigotes se diferencian a tripomastigotes, lisan las células infectadas, ingresan a la circulación e infectan a nuevas células de los tejidos blanco, como miocardio, músculo esquelético, músculo liso visceral, células de la glía del sistema nervioso y

placenta. Cuando un mamífero infectado es picado por un insecto vector, los tripomastigotes sanguíneos ingresan al tracto digestivo del insecto y en su intestino medio se diferencian a epimastigotes, estadio replicativo extracelular. Estos epimastigotes, a medida que avanzan en el medio intestinal se diferencian a tripomastigotes metacíclicos, que pueden nuevamente infectar a un mamífero, completando así el ciclo de vida de *T. cruzi* (**Fig. 1**) (Tyler y Engman, 2001). En la transmisión vectorial tipo doméstica, perros y gatos son los principales reservorios que contribuyen a la mantención de la infección. En el ciclo peridoméstico de la infección, los principales reservorios son roedores domésticos junto con ganado caprino, bovino y ovino. En el ciclo selvático los principales reservorios son mamíferos del hábitat silvestre. Estos animales, aunque de escaso acceso al ser humano, son los que permiten la mantención del *T. cruzi* e impiden la completa erradicación del parásito (Andrade y Andrews, 2005).

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

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

celulares). Antes de su liberación de las células del hospedero, los amastigotes se diferencian a tripomastigotes que invaden la sangre, desde la que pueden ingresar nuevamente a cualquier otra célula nucleada (**Fig. 3C**).

Los amastigotes pueden cultivarse dentro de células musculares, fibroblastos y macrófagos, de las que se pueden obtener formas tripomastigotes infectivas (Morello *et al.*, 1987).

Además de la forma vectorial de transmisión existen otras formas de contagio como las transfusiones sanguíneas, responsable del 10% de los casos (Andrade *et al.*, 2005). El contagio también puede producirse por ingesta de alimentos y bebidas contaminadas con deyecciones de triatomíneos (Jamison *et al.*, 2006), trasplante de órganos y transmisión placentaria en madres chagásicas (Prata, 2001).

Las probabilidades de contraer la enfermedad de Chagas están directamente relacionadas con las condiciones de pobreza de la vivienda. Los triatomíneos, vectores del parásito) se guarecen en grietas y tejados, por lo cual viviendas construidas en forma precaria resultan ideales para este insecto. La constante migración campo ciudad observada desde hace 40 años, ha cambiado el modelo epidemiológico clásico de la Trypanosomiasis americana que lo asociaba a viviendas rurales principalmente, acercándola a la ciudad, convirtiéndola en una enfermedad rural y urbana (World Health Organization, 2002).

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

La enfermedad de Chagas presenta tres fases clínicas, con diferentes signos y síntomas clínicos.

#### Fase aguda

Esta fase comienza inmediatamente después de la inoculación del parásito. Se caracteriza por una elevada parasitemia, debido a la intensa multiplicación

parasitaria en células presentadora de antígenos y la posterior liberación de tripomastigotes a la circulación periférica. Esta fase es generalmente asintomática. Sin embargo, un porcentaje menor de los pacientes pueden presentar manifestaciones de infección generalizada tales como fiebre, anorexia, linfadenopatías regionales, hepato y esplenomegalia moderada, edema bipalpebral unilateral o signo de Romaña y miocarditis. Esta sintomatología es más frecuente en niños.

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

### Fase de latencia

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

### Fase crónica

La aparición del estado crónico puede tardar años o décadas después de la infección inicial. En áreas endémicas, entre el 15 y 20% de los pacientes manifiestan la fase crónica, la que se asocia a la presencia de megacolon y megaesófago debido a una denervación del sistema nervioso autónomo, arritmia cardíaca y crecimiento anómalo del corazón con insuficiencia progresiva (Prata, 2001). Estas alteraciones cardíacas y digestivas causan gran impacto negativo en la capacidad laboral del individuo. En esta etapa, la enfermedad puede ser inhabilitante y causa directa o concurrente de mortalidad. El curso de la enfermedad depende de diferentes factores: carga parasitaria en el sitio de la inoculación, grupo genético y cepa del parásito, primoinfección o reinfección, estado inmunológico del hospedero y tipo de vector (Coura, 2007).

## Diagnóstico

El diagnóstico de la enfermedad de Chagas en la fase aguda se puede realizar mediante observación microscópica de sangre fresca. Infecciones crónicas requieren de procedimientos diagnósticos más sensibles como es la amplificación de DNA parasitario mediante técnicas de reacción de polimerasa en cadena (PCR). Otra forma de detección de la infección con *T. cruzi* es el xenodiagnóstico que consiste en tener triatomíneos libres de parásitos y dejar que succionen sangre desde el candidato clínicamente sospechoso y examinar las deyecciones de las vinchucas 30 y 60 días después para ver la presencia de parásitos. La detección inmediata de enfermedad de Chagas crónica requiere de la demostración de anticuerpos específicos anti-*T. cruzi* en suero de pacientes o en test basados en la detección de ácidos nucleicos mediante PCR (Teixeira *et al.*, 2006).

## Enfermedad de Chagas congénita

En los últimos años la transmisión congénita de *T. cruzi* ha adquirido una mayor importancia epidemiológica, siendo parcialmente responsable de la “globalización de la enfermedad de Chagas” (Schmunis, 2007), constituyéndose en un problema de salud pública cada vez más relevante (Carlier, 2005; Torrico *et al.*, 2005; Lescoure *et al.*, 2008) (**Fig 3**). Debido al control de vectores (triatomíneos), los casos nuevos por año han disminuido enormemente, desde 700.000 en el 1990 a 41.000 en el 2006. Por otra parte, los casos de Chagas congénito en el 2006 fueron 14.385, lo que representa el 35% de los casos nuevos anuales, por lo que esta forma de transmisión adquiere cada vez más importancia (World Health Organization, 2002).

La seroprevalencia en mujeres embarazadas puede llegar hasta un 80% y las tasas de infección congénita varían entre un 1-21% (Kirchhoff, 1993; Blanco *et al.*, 2000; Shippey *et al.*, 2005; Torrico *et al.*, 2005; Burgos *et al.*, 2007; World Health Organization, 2002). La tasa de transmisión congénita varía desde 1% en Brasil hasta 4-12% en Argentina, Bolivia, Chile y Paraguay. En Chile se reportan

anualmente 800-1.000 casos de enfermedad de Chagas congénita (Lorca *et al.*, 2006). La transmisión vertical no puede ser prevenida debido a que los drogas disponibles para el tratamiento de la enfermedad de Chagas son teratogénicas (Castro *et al.*, 2006).

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

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

La infección congénita por *T. cruzi* se asocia a partos prematuros, bajo peso al nacer, abortos y nacidos muertos (Bittencourt, 1976; Altemani *et al.*, 2000; Shippey *et al.*, 2005). Se estima que el 50% de los recién nacidos prematuros de madres con enfermedad de Chagas mueren (Shippey *et al.*, 2005). La fisiopatología de la infección congénita no se conoce (World Health Organization, 2002; Shippey *et al.*, 2005). Se ha sugerido que el parásito alcanza al feto vía sanguínea atravesando la barrera placentaria (Bittencourt, 1976; Andrade, 1982; Nisida, 1999; Carlier, 2005). Así también, el conocimiento sobre los mecanismos de infección transplacentaria es escaso (World Health Organization, 2002; Shippey *et al.*, 2005; Burgos *et al.*, 2007). 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; Burgos *et al.*, 2007).

La placenta es el lugar principal de intercambio de nutrientes y gases entre la madre y el feto (Syme *et al.*, 2004; Moore y Persaud, 2004). Adicionalmente, juega un rol importante en la síntesis de hormonas, péptidos y esteroides fundamentales para un embarazo exitoso (Syme *et al.*, 2004). La placenta se compone de una porción fetal desarrollada a partir del corión frondoso y una



porción materna o decidua basal que procede del endometrio (Moore y Persaud, 2004; Cross, 2006). La membrana o barrera placentaria está formada por tejidos extrafetales que separan la sangre materna de la fetal. Esta barrera se compone hasta las 20 semanas de sincitiotrofoblasto, citotrofoblasto, tejido conectivo de las vellosidades coriónicas libres y endotelio de los capilares fetales. Posterior a las 20 semanas la placenta sufre adaptaciones que mejoran el intercambio metabólico, las células del citotrofoblasto disminuyen, los núcleos del sincitiotrofoblasto se acumulan formando nodos. Esta re-estructuración favorece el intercambio metabólico por la formación de delgadas zonas citoplasmáticas sin núcleo; además los capilares fetales se acercan al sincitiotrofoblasto y de esta manera la membrana placentaria se transforma en una barrera de menor grosor (Moore y Persaud 2004; Kemmerling *et al.*, 2010). La membrana placentaria actúa solamente como barrera cuando las moléculas tienen cierto tamaño, configuración y carga. La mayor parte de los fármacos y otras sustancias presentes en el plasma sanguíneo materno atraviesan esta barrera y pasan a la sangre fetal (Shiverick *et al.*, 2003; Moore y Persaud 2004; Syme *et al.*, 2004).

Se han descrito diversos agentes patógenos que son capaces de atravesar la barrera placentaria e infectar tanto a la placenta como al feto. Entre estos se cuentan los virus de la inmunodeficiencia adquirida humana (HIV), hepatitis B y C, varicella zoster, rubéola, parvovirus B19 (Koi *et al.*, 2001) y citomegalovirus (Koi *et al.*, 2001; Halwachs-Baumann, 2006) así como mycoplasma (Dische *et al.*, 1979). Entre las enfermedades parasitarias se destacan, además de *T. cruzi*, las infecciones por *Plasmodium falciparum*, agente causal de la malaria (Rogerson *et al.*, 2007; Desai *et al.*, 2007), *Schistosoma* (Friedman *et al.*, 2007), *Toxoplasma gondii* (Biedermann, 1995; Correa *et al.*, 2007) y *Trypanosoma brucei* (Rocha *et al.*, 2004).

Durante el embarazo existe en la respuesta inmune celular un predominio Th2 sobre Th1, lo que favorece la tolerancia inmunológica hacia el feto (Raghupathy, 2001; Lin *et al.*, 2005; Raghupathy y Kalinka, 2008), pero también aumenta la susceptibilidad hacia algunas enfermedades autoinmunes e infecciones intracelulares (Guilbert *et al.*, 1993; Lin *et al.*, 2005). Entre las

infecciones intracelulares que muestran una exacerbación durante el embarazo se cuentan el síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA) (Derrien *et al.*, 2005), infecciones asociadas al SIDA (Margono *et al.*, 1994), malaria (Gamain *et al.*, 2007) y toxoplasmosis (Biedermann, 1995).

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

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

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

No obstante, se ha iniciado el estudio de la invasión parasitaria no sólo a nivel celular sino también tisular. Así, se ha utilizado el tejido placentario humano como modelo de estudio de la infección tisular *ex vivo* del parásito (Sartori *et al.*,

2003 ; Lin *et al.*, 2004; Lujan *et al.*, 2004; Sartori *et al.*, 2005; Mezzano *et al.*, 2005; Duaso *et al.*, 2010). La posibilidad de contar con un tejido para el estudio de la invasión parasitaria permite trabajar en condiciones que se asemejan más a los procesos que ocurren *in vivo*. Otra ventaja de este modelo es la posibilidad de usar un tejido de origen humano. La placenta, que es expulsada del cuerpo materno durante el alumbramiento, no vuelve a cumplir funciones en los organismos que le dieron origen. Es un tejido de fácil obtención después del parto y su uso no compromete la salud de madre ni del recién nacido.

En nuestro laboratorio hemos establecido las condiciones óptimas de cultivo e infección *ex vivo* con *T. cruzi* de vellosidades coriónicas humanas. Asimismo hemos descrito las alteraciones histopatológicas en los distintos compartimientos tisulares de las vellosidades coriónicas de intercambio con especial énfasis en el sinciciotrofoblasto, las láminas basales y matriz extracelular del tejido conectivo fetal (Duaso *et al.*, 2010).

### **Tratamiento de la enfermedad de Chagas**

A fines de 1960 se comenzó a utilizar dos drogas nitroheterocíclicas para el tratamiento de la enfermedad de Chagas: un nitrofurano, nifurtimox (Nx) [3-metil-4(nitrofurfurilideneamino) tetrahidro-4H-1,4-tiozina-1,1-dióxido] y un nitroimidazol, benznidazol (Bz) [N-benzil-2-nitroimidazol acetamida] (Castro *et al.*, 2006). El Nifurtimox (**Fig. 4a**) ha sido el derivado 5-nitrofurfurilideno más activo experimentalmente ensayado (Bock *et al.*, 1969) y el Benznidazol (**Fig.4b**), por su parte, demostró una alta actividad tripanocida tanto en ensayos *in vitro*, como en ensayos *in vivo* (Polak y Richle, 1978). Las dosis terapéuticas recomendadas en la fase aguda son de 8-10 mg/kg/día para Nx y 5 mg/kg/día para Bz. La duración del tratamiento es alrededor de 60-90 días. Sin embargo, cuando la fase crónica se reactiva, como en pacientes inmunocomprometidos, el tratamiento puede llegar a 5 meses o más. Sólo en infecciones accidentales, como por ejemplo por contaminación en el laboratorio, la duración del tratamiento profiláctico se limita a 10 días (Maya *et al.*, 2006).

Nx y Bz tienen acción tripanocida contra todas las formas del parásito (Stopani, 1999). Se ha descrito que existe una mejor respuesta al tratamiento si este se realiza en la fase aguda o en la crónica temprana y en niños (Rodrigues-Coura y de Castro, 2002). El uso de estas drogas para el tratamiento durante la fase aguda de la enfermedad es ampliamente aceptado. El paciente es tratado independientemente de la forma de infección, y cerca del 60% de ellos puede ser curado durante esta etapa (Urbina, 2003). Sin embargo, su uso durante la fase crónica de la enfermedad permanece controversial (Castro *et al.*, 2006). La efectividad de ambos nitroderivados es mejor sobre la forma infectante extracelular de *T. cruzi* que sobre la forma intracelular replicativa característica de la fase crónica de la patología (Urbina, 2003; Castro *et al.*, 2006).

Se han descrito para ambas drogas efectos secundarios adversos. Así, el Nx puede producir anorexia, náuseas, vómitos, depresión o excitación nerviosa, convulsiones, vértigo, cefalea, parestesias, neuropatías periféricas y dermatitis. Por su parte, el Bz puede inducir náuseas, vómitos, amnesia, cefalea, polineuropatía, prurito y fiebre (Castro *et al.*, 2006). Se ha demostrado además, que estas dos drogas producen mutagénesis y daño al DNA, por lo que hay dudas acerca del beneficio de su uso (Zahoor *et al.*, 1987; Gorla *et al.*, 1989). Sin embargo, en grandes series de pacientes tratados con estos fármacos, no se ha encontrado mayores efectos adversos, por lo que el riesgo sería más teórico que real (Apt, 1999). Por otro lado, se ha reportado que el efecto terapéutico de estos dos fármacos varía en pacientes provenientes de distintas áreas geográficas. Esta situación estaría dada probablemente a infecciones con distintas cepas de *T. cruzi* que presentan respuesta diferencial a estos fármacos (Castro *et al.*, 2006).

### **Mecanismo de acción de Nifurtimox y Benznidazol**

Se ha planteado que el mecanismo de acción de las drogas Nx y Bz es a través de la formación de radicales libres y/o metabolitos electrofílicos. Sin embargo, últimamente se ha cuestionado la capacidad de Nx para generar

especies reactivas del oxígeno y nitrógeno (Boiani *et al.*, 2010), por lo que su mecanismo de acción no está claro.

El grupo nitro de ambas drogas, por acción de nitroreductasas, requiere de seis electrones para reducirse a grupo amino, lo cual genera varios radicales libres y metabolitos electrófilos (Moreno *et al.*, 1982). El proceso mediante el cual se forman los radicales libres se inicia por una reacción catalizada por flavoproteínas, incluyendo la NADPH-citocromo P450 reductasa, que actúa directamente sobre el grupo nitro de las moléculas R-NO<sub>2</sub>, produciendo un radical intermediario anión nitro (R-NO<sub>2</sub><sup>-</sup>) (Moreno *et al.*, 1982). Este radical intermediario entra en reciclaje redox con el oxígeno molecular produciendo una reducción parcial del oxígeno y regenerando la droga (Mason y Holtzman, 1975). El anión superóxido (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) es dismutado a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> por la enzima superóxido dismutasa (SOD) (Temperton *et al.*, 1998). El anión superóxido (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) y el peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), en presencia de Fe<sup>3+</sup> forman el radical libre hidroxilo (OH·) (Reacción de Haber-Weiss Fenton). Estos radicales libres, fundamentalmente el OH·, alteran la estructura de macromoléculas biológicas: lípidos, proteínas y DNA y por lo tanto, podrían producir mutagénesis y carcinogénesis. Del mismo modo se ha descrito el daño oxidativo de estos radicales en presencia de cobre sobre membranas celulares y sobre ciertas proteínas relacionadas con la detoxificación de especies reactivas (Letelier *et al.*, 2004, 2006).

Sin embargo, existen evidencias recientes que el mecanismo tripanocida de Nx no se debe a la generación de estrés oxidativo. Nx es capaz de depletar de tioles a *T.cruzi*, pero sin generar especies reactivas de oxígeno (Boiani *et al.*, 2010). Por otro lado, el efecto tripanocida de Bz no se ha relacionado con la formación de los radicales libres derivados del oxígeno. Existe evidencia que Bz es nitroreducido por nitroreductasas tipo I con la consecuente formación de metabolitos electrofílicos como por ejemplo la hidroxilamina. Este compuesto se puede conjugar con grupos tiolicos de proteínas, ácidos nucleicos y lípidos. Se ha propuesto que los metabolitos electrofílicos reducidos del Bz formados *in vivo* estén implicados en los efectos tripanocidas por unión covalente a macromoléculas del parásito (Castro *et al.*, 2006).

Existen investigaciones experimentales que demuestran diferencias en la respuesta a Nx y a Bz, por parte de diferentes cepas de *T. cruzi* al (Urbina y Docampo, 2003; Castro *et al.*, 2006). La explicación a este fenómeno es desconocida, aunque se ha propuesto un incremento en la concentración de las enzimas de detoxificación o a través de modificaciones en el contenido de tioles intracelulares (Morello *et al.*, 1994; Maya *et al.*, 1997).

### **Metabolismo de tioles y defensa contra radicales libres**

Las células de mamíferos poseen mecanismos de defensa anti-radicalarios enzimáticos y no-enzimáticos (Halliwell, 1999; Gutteridge y Halliwell, 2000). Entre los enzimáticos se encuentran la superóxido dismutasa (SOD), la catalasa, la Glutación peroxidasa y la Glutación-S-transferasa y entre los no-enzimáticos, los compuestos reductores glutación (GSH),  $\alpha$ -tocoferol, ácido ascórbico y  $\beta$ -caroteno. En cambio, los mecanismos de defensa del parásito frente al estrés oxidativo serían deficientes (Krauth-Siegel y Coombs, 1999). No se ha detectado actividad de las enzimas catalasa y Glutación peroxidasa selenio dependiente (Mehlotra, 1996) y la actividad de la SOD se encuentra muy reducida (Ismail *et al.*, 1997; Temperton *et al.*, 1998). Sin embargo, la SOD puede ser inducida en condiciones de estrés oxidativo confiriendo protección al parásito contra radicales libres y agentes electrofílicos (Nogueira *et al.*, 2006; Piacenza *et al.*, 2007). Por otra parte, no se ha detectado la existencia de  $\beta$ -caroteno y  $\alpha$ -tocoferol, compuestos reductores presentes en células de mamíferos. Sin embargo, se ha descrito la presencia de actividad de las enzimas ascorbato reductasa y deshidroascorbato reductasa en epimastigotes y tripomastigotes, lo cual sugiere la presencia de un ciclo redox del ácido ascórbico, semejante al de las células de mamífero (Clark *et al.*, 1994). Por otra parte se ha demostrado que el tripomastigote presenta en el glicosoma la capacidad de sintetizar ascorbato así como la de incorporarlo activamente (Wilkinson *et al.*, 2005). Esto último sugiere que los mecanismos antioxidantes de *T. cruzi* son más efectivos de lo pensado previamente y concuerda con las dudas respecto al mecanismo de acción de Nx (Boiani *et al.*, 2010).

Los principales mecanismos antioxidantes de *T. cruzi* son el GSH reducido y un conjugado de dos moléculas de GSH con espermidina denominado Tripanotión. Este compuesto es característico de todos los tripanosomátidos y es indispensable para la reducción de especies reactivas del oxígeno y nitrógeno (Krauth-Siegel y Coombs, 1999).

El GSH ( $\gamma$ -L-glutamil-L-cisteinil-glicina) es el tiol de bajo peso molecular más abundante en las células de mamíferos. Ha sido encontrado en casi todos los seres vivos en concentraciones que fluctúan entre 0,5 y 10 mM, dependiendo de la especie, órgano u organelo estudiados. El GSH protege a las células del efecto deletéreo que presentan los compuestos altamente electrofílicos como son ciertos xenobióticos, metabolitos de xenobióticos y los radicales libres (Sies, 1999).

Así, el GSH desempeña un rol fundamental en la desintoxicación de metales pesados, herbicidas e insecticidas (Keppler, 1999; Eaton, 2000; Pourahmad y O'Brien, 2000). Los mecanismos de acción son los siguientes: a) actúa como cofactor en reacciones catalizadas por las Glutación-S-transferasas, enzimas que conjugan GSH con una variedad de xenobióticos de carácter lipofílico-electrofílico (Griffith y Mulcahy, 1999); b) juega un papel importante en la protección del DNA (Mazur, 2000) y de la membrana lipídica del daño producido por radicales libres (Hayes y Mclellan, 1999); c) actúa efectivamente atrapando radicales libres y participa como un cofactor del ciclo Glutación peroxidasa/Glutación reductasa d) actuaría en forma no enzimática frente al peróxido de hidrógeno, radicales libres (Sies, 1999) y en la reacción con metales pesados y agentes electrofílicos. (Estrela *et al.*, 2006).

La Glutación reductasa, enzima encargada de reducir el glutación oxidado (GSSG) en mamíferos tiene una actividad prácticamente irreversible con el GSSG, manteniendo la razón GSH/GSSG muy alta (Estrela *et al.*, 2006). Hay estudios que sugieren que esta enzima puede catalizar la reducción de disulfuros mixtos entre el GSH y otros compuestos, como por ejemplo, GSH y  $\gamma$ -glutamil cisteína o entre GSH y coenzima A. A diferencia de lo que ocurre en mamíferos, en *T. cruzi* la reducción de GSSG se efectúa por intermedio del Tripanotión; no se ha encontrado la enzima Glutación reductasa (Fairlamb y Cerami, 1985).

## Apoptosis

La muerte celular programada es un proceso regulado que permite a los organismos eliminar células dañadas, controlar el desarrollo y la organogénesis, así como la remodelación tisular, sin provocar una respuesta inflamatoria asociada a la eliminación de dichas células (Hengartner, 2000). Es, por lo tanto, fundamental en la mantención de la homeostasis, proceso que depende de la coordinación entre los ciclos de proliferación y muerte celular (Razik y Cidlowski, 2002). Los mecanismos a través de los cuales estas células son eliminadas dependen tanto del tipo celular analizado como del estímulo que desencadena el proceso de muerte celular. La apoptosis corresponde a un tipo de muerte celular programada, específicamente al tipo 1 (Kroemer *et al.*, 2009). La apoptosis se desencadena, por ejemplo, cuando no se pueden reparar macromoléculas (como el DNA) dañadas por especies reactivas del oxígeno o nitrógeno (Alberts *et al.*, 2008).

El fenómeno de apoptosis presenta características morfológicas y bioquímicas que la definen como tal, incluyendo la pérdida de contacto con la matriz extracelular (Frisch y Francis, 1994), la exposición de fosfatidilserina en la cara externa de la membrana plasmática (Naito *et al.*, 1997), la disminución del volumen celular (Okada y Maeno, 2001), la condensación de la cromatina, la fragmentación del DNA, la formación de cuerpos apoptóticos y la activación de cisteína-proteasas de la familia de las caspasas (Sperandio *et al.*, 2000; Gupta, 2001; Zimmermann *et al.*, 2001a, 2001b; Kroemer *et al.*, 2009). Este conjunto de procesos converge en la activación de proteasas y nucleasas que actúan sobre una amplia gama de substratos, conduciendo finalmente a la muerte celular.



## Lipoperoxidacion

La peroxidación lipídica es el resultado de daño celular en los sistemas de membrana celulares inducido por estrés oxidativo (Muriel, 1997). Este proceso de peroxidación lipídica consta de una serie de reacciones en cadena, que demuestran la capacidad de las especies reactivas de oxígeno para producir reacciones bioquímicas dañinas para la célula (Alberts *et al.*, 2008)

Tras la descomposición de los ácidos grasos poliinsaturados (PUFA) de las membranas biológicas se generan, entre otros, malondialdehído (MDA) y 4-hidroxiacetalqueno (4-HNE), como productos finales de reacción. Gracias a la determinación de estos productos es que se puede cuantificar la peroxidación lipídica y por tanto el estrés oxidativo en un organismo o tejido.

Los PUFA son fundamentales para la célula, ya que forman parte de los fosfolípidos que son los constituyentes principales de las membranas biológicas y son los responsables, en buena medida, de la fluidez de éstas (Muriel, 1997). Las membranas celulares con más alto contenido de PUFA son la membrana plasmática y las endomembranas de retículo endoplasmico y de la mitocondria.

Los PUFA son las moléculas biológicas más susceptibles al estrés oxidativo y su degradación se denomina peroxidación lipídica. La peroxidación de las membranas celulares provoca destrucción de la membrana, aumento de la permeabilidad de la membrana y puede llevar a la muerte celular ya sea por apoptosis o necrosis. La susceptibilidad de las membranas biológicas a la peroxidación depende, en gran medida, del grado de insaturación y de la posición de los dobles enlaces de los PUFA en la membrana, así como de la existencia de iones hierro (Ursini *et al.*, 1991) ya que estos son los que catalizan en su mayoría las reacciones de oxidación, además de activar el oxígeno en la formación de las especies reactivas de oxígeno (Alberts *et al.*, 2008).

La terapia de la enfermedad de Chagas apunta a producir la formación de radicales libres y/o metabolitos electrofílicos con drogas como Nx y Bz, aunque existan nuevas evidencias que por lo menos para el Nx los mecanismos puedan ser otros.

Estas drogas han sido usadas ampliamente y con buenos resultados en la fase aguda de la enfermedad. Las evidencias sobre los efectos adversos son controversiales. Es por esto que nos hemos propuesto evaluar el efecto terapéutico y tóxico de ambas drogas en un modelo de infección *ex vivo* de vellosidades coriónicas humanas con *T. cruzi*.

## HIPÓTESIS

Nifurtimox y Benznidazol disminuyen la infección de *T. cruzi* de vellosidades coriónicas humanas, pero inducen liperoxidación, desorganización del sinciciotrofoblasto, colágeno I del tejido conectivo fetal y apoptosis.

## OBJETIVOS

### OBJETIVO GENERAL

Estudiar el efecto de Nifurtimox y Benznidazol sobre la infección con tripomastigotes de *T. cruzi* en explantes de vellosidades coriónicas de placentas humanas y sus posibles efectos citotóxicos.

### OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Determinar el efecto de Nx y Bz en relación a:

- 1) La infección de tripomastigotes de *T. cruzi* en explantes de vellosidades coriónicas humanas
- 2) Al posible efecto citotóxico sobre las vellosidades coriónicas placentarias humanas, específicamente se analizará
  - a) Daño histopatológico
  - b) Destrucción y desorganización del sinciciotrofoblasto
  - c) Destrucción y desorganización del colágeno I del tejido conectivo fetal
  - d) Inducción de apoptosis
  - e) Lipoperoxidación

## MATERIALES Y MÉTODOS

### **Obtención de formas infectivas de *T. cruzi*:**

Se cultivaron células VERO® en medio RPMI suplementado con suero fetal bovino (SFB) no inactivado al 5% y antibióticos (penicilina-estreptomicina). Las células fueron cultivadas a 37°C en una atmósfera húmeda con 5% CO<sub>2</sub>, sustituyendo el medio cada 24 horas. Las células VERO en semi-confluencia fueron inoculadas con un cultivo de epimastigotes envejecido (fase estacionaria) el cual presenta aproximadamente un 5% de la forma infectiva tripomastigote. Los tripomastigotes invadieron a las células VERO, se diferenciaron intracelularmente en amastigotes y como tales proliferaron; después de 4 o 5 días se diferenciaron nuevamente a tripomastigotes. Los tripomastigotes lisaron las células VERO y se recolectaron desde el sobrenadante. El sobrenadante se centrifugó a 500 x g por 5 minutos para separar las células en suspensión. El centrifugado se dejó en reposo durante 30 minutos a 37°C de modo que los tripomastigotes ascendieran hacia el sobrenadante. Este sobrenadante fue recolectado y centrifugado a 3.000 x g durante 10 minutos a fin de obtener en el sedimento las formas infectivas de *T. cruzi*. Los tripomastigotes se re-suspendieron en medio RPMI y el número de células fue determinado en una cámara de Neubauer (Duaso *et al.*, 2010).

### **Obtención de placentas:**

Placentas humanas de término se obtuvieron durante el alumbramiento en partos por cesárea para asegurar la asepsia y preservación de la muestra. Las placentas provinieron de madres sanas con embarazos monogestacionales y fetos con crecimiento normal. Los criterios de exclusión para el uso de las placentas fueron cualquier patología materna, fetal o placentaria. Los órganos se recogieron en tampón fosfato salino pH 7,2 (PBS: NaCl 135 mM, KCl 2,7 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 10 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,8 mM) estéril a 4°C y se procesaron inmediatamente. Las vellosidades coriónicas fueron obtenidas de la parte central de los cotiledones, desechando las caras maternas y fetales, y a 5 cm de la inserción del cordón umbilical. Se obtuvieron trozos de tejido de vellosidades coriónicas de

aproximadamente 0,5 cm<sup>3</sup>, los cuales fueron lavadas al menos 5 veces con PBS a fin de eliminar los restos de sangre e incubadas en medio RPMI suplementado con antibióticos y 10% suero fetal bovino inactivado (Duaso *et al.*, 2010). Los procedimientos de obtención de placentas, manejo de las mismas y formulario de consentimiento informado fueron aprobados por el Comité de Ética Humana de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile (**anexo 1**).

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

Las vellosidades coriónicas fueron cultivadas con 10<sup>6</sup> tripomastigotes/ml de la cepa DM28c (ciclo selvático) durante 24 horas en medio de cultivo RPMI 1640 suplementado con SFB inactivado y antibióticos. Las vellosidades coriónicas controles se mantuvieron en las mismas condiciones, sin parásitos o drogas. Después de las diferentes condiciones experimentales, las vellosidades coriónicas fueron procesadas para los estudios histológicos, bioquímicos y de biología molecular (Duaso *et al.*, 2010)

### **Drogas:**

Las vellosidades coriónicas incubadas en presencia y ausencia de tripomastigotes fueron adicionalmente incubadas en presencia y ausencia de las drogas Nifurtimox y Benznidazol. Se utilizaron las siguientes concentraciones: Nifurtimox 1, 10 y 100 µM; Benznidazol 2, 20 y 200 µM. Las concentraciones 10 µM y 20 µM corresponden al IC50 (inhibitor concentration 50) (concentración de una droga para obtener el 50% del efecto que se mide, por ejemplo citotoxicidad o proliferación celular), obtenido *in vitro*, de Nifurtimox y Benznidazol, respectivamente. Ambas drogas se solubilizaron en un volumen pequeño de DMSO (dimetilsulfóxido), diluyendo luego esta solución en medio RPMI sin rojo fenol estéril hasta una concentración adecuada para cada experimento. La concentración final de DMSO en el medio de cultivo no fue superior a 0.1%.

### **Análisis histológico de las vellosidades coriónicas:**

Las vellosidades coriónicas fueron fijadas durante 24 horas en formaldehído 4% preparada en un tampón fosfato pH 7,4. Posteriormente fueron lavadas en agua corriente durante 2 horas, deshidratados mediante inmersión en concentraciones crecientes de etanol (80%, 90%, 95%, 100%, 100%, 100%) por 10 minutos cada vez, aclaradas en xilol 100% 3 veces durante 15 minutos e incluidas en parafina fundida a 60°C. Posteriormente se obtuvieron cortes de 5µm de espesor para técnicas histológicas de rutina, histoquímicas e inmunohistoquímicas. La inmunodetección del neo-epitopo de citoqueratina 18 requirió cortes de 8µm de espesor. Los cortes fueron colocados en portaobjetos tratados con poli-L-lisina y teñidos con las diferentes técnicas descritas a continuación. Posteriormente los cortes teñidos fueron desparafinados en xilol 100% 3 veces por 15 minutos, e hidratados en concentraciones decrecientes de etanol (100%, 100%, 100%, 95%, 80%, 70% y agua destilada) por 10 minutos cada vez. Los preparados fueron montados con Entellan (Merck®), observados en un microscopio (Nikon, Optiphot-2 o Leitz Wetzlar) y las imágenes fueron capturadas con un equipo de digitalización (Canon Powershot SX100 15) acoplado al microscopio y procesadas empleando el programa computacional Adobe Photoshop (Duaso *et al.*, 2010).

### **Identificación de antígenos en las vellosidades coriónicas:**

Se estudió la distribución de los siguientes antígenos en los cortes de las vellosidades coriónicas incubadas en presencia o ausencia del parásito: neo-epitopo de citoqueratina 18 (detección de apoptosis, anticuerpo Cytodeath Roche®, M-30 Catalog N°: 2140322 , dilución 1:50), lactógeno placentario (marcador de sinciciotrofoblasto, anticuerpo Novocastra® NCL-PLp ) y cruzipaína para detección de parásitos<sup>1</sup>. Los anticuerpos fueron utilizados siguiendo las instrucciones del fabricante; la titulación se realizó en los cortes de tejido. Los cortes desparafinados fueron tratados con bloqueador de peroxidasas endógenas

---

<sup>1</sup> gentileza Dr. Juan José Cazzulo, Instituto de Investigaciones Biotecnológicas, Universidad Nacional de General San Martín, Buenos Aires, Argentina

(ScyTek, ACA) y suero normal equino R.T.U al 2,5% (ScyTek, ACA). Después de lavados en PBS, las muestras fueron incubadas con un anticuerpo secundario biotinilado (Kit RTU Vectastain anticuerpo anti-conejo/raton IgG H+L hecho en equino) y el complejo antígeno-anticuerpo fue revelado con el cromógeno diamino bencidina (DAB). El contraste nuclear se realizó con Hematoxilina de Mayer. Los controles de inmunohistoquímica fueron realizados mediante la sustitución de los anticuerpos primarios con PBS (Duaso *et al.*, 2010)

### **Determinación de lipoperoxidación en las vellosidades coriónicas:**

Se determinó la presencia de MDA como marcador de lipoperoxidación. Las muestras de vellosidades coriónicas fueron homogenizadas en 1,5 mL de buffer de lisis (en mM: 75 Tris-HCl pH 7,4, 225 NaCl, 1,5 EDTA, 4,5 % NP-40, 5 Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, 40 NaF, 10 NaPP, 0,5 leupeptina, 0,116 pepstatina, 15,9 benzamidina, 19,5 fenilmetilsulfonil fluoruro y 200 N-etilmaleimida) en un homogenizador Potter-Elvehjem, centrifugadas a 10.000 x g. Se mezclaron 50 µL de sobrenadante mezclados con 250 µL de ácido metafosfórico 1.22 M, 250 µL de ácido tiobarbitúrico 0,44M y 450 µL de agua HPLC. Esta solución fue hervida durante 60 minutos y enfriada a 4°C. 200 µL de esta solución fueron neutralizados con metanol HPLC y NaOH 1M. El MDA fue separado en una columna C-18 con una fase móvil de 50% metanol y 50% de tampón fosfato 25 mM pH 6,5. El MDA fue evidenciado mediante un detector de fluorescencia a 553 nm. Se efectuó una curva de calibración con estándares de MDA entre 0 y 5 µM (Fukunaga *et al.*, 1998).

### **Determinación de fragmentación de DNA mediante TUNEL:**

La visualización de fragmentación de DNA se realizó mediante la técnica de TUNEL (TdT-mediated dUTP Nick-End Labeling). Esta técnica se basa en la adición catalítica de fluoresceína-12-dUTPs a los extremos OH 3' libres del DNA, por acción de una nucleotidil transferasa terminal recombinante. La fragmentación del DNA, característica de las células apoptóticas, produce una alta cantidad de

extremos 3' libres por lo que los núcleos celulares positivos a la reacción presentan fluorescencia verde (Kiernan, 2008).

Para ello, los cortes fueron montados en portaobjetos silanizados con carga positiva (Superfrost® plus, Thermo scientific), desparafinados mediante dos inmersiones sucesivas en xilol durante 5 minutos cada una, hidratadas en concentraciones decrecientes de alcohol etílico (100%, 100%, 95%, 85%, 70% y 50%) durante 3 minutos cada vez, sumergidas en solución de cloruro de sodio al 0,85% por 5 minutos y lavadas con PBS por 10 minutos, para luego someterlos a la técnica de TUNEL utilizando el kit DeadEnd™ Fluorometric TUNEL System, Promega® de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Las muestras fueron permeabilizadas en solución de proteinasa K (20 µg/mL) por 10 minutos, lavadas en PBS por 5 minutos, incubadas en tampón de equilibrio (200 mM cacodilato de potasio 25 mM, Tris-HCl pH 6,6, 0,2 mM DTT, 0,25 mg/mL, 2,5 mM cloruro de cobalto) por 10 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente cada corte de tejido fue incubado con 51 µL de la mezcla de reacción TdT (45 µL de tampón de equilibrio, 5 µL de mezcla de nucleótidos (50µM fluoresceína-12-dUTP, 100 µM d ATP, 10 mM Tris-hcl (pH 7,6), 1 mM EDTA, 1 µL de enzima rTdT), cubiertas con cubreobjetos plásticos e incubadas durante 60 minutos a 37° C; en cámara húmeda. La reacción enzimática fue detenida mediante inmersión en tampón 2 X SCC (NaCl 300 mM, citrato de sodio 29,9 mM, pH 7,2) durante 15 minutos. Las muestras fueron lavadas dos veces en PBS por 5 minutos cada vez y los núcleos fueron teñidas con DAPI (4',6- diamidino-2-fenilindol dicloridrato, PIERCE ®; 1 µg/mL) por 5 minutos, lavadas dos veces en PBS por 3 minutos cada vez, y montadas con medio para fluorescencia (VECTASHIELD® VECTOR (ScyTek, ACA)). Tanto la reacción enzimática de la nucleotidil transferasa terminal como la tinción con DAPI se realizaron en ausencia de luz. Las muestras se observaron en un microscopio de epifluorescencia como descrito anteriormente. El índice apoptótico se obtuvo por recuento de núcleos positivos a la reacción de TUNEL versus células totales, con un recuento de 200 núcleos en duplicado (Kiernan, 2008).



### **Extracción y cuantificación de DNA:**

Las muestras de placenta fueron lavadas 10 veces en PBS, posteriormente se extrajo el DNA genómico mediante el kit Wizard® Genomic DNA Purification Kit (Promega) según instrucciones del fabricante. El tejido fue homogenizado a 4° C en 600 µL de solución para lisis de núcleos. El homogenado fue incubado a 65° C por 20 minutos, posteriormente se agregó 3 µL de RNasa para ser incubado a 37° C por 20 minutos y enfriada a temperatura ambiente. Luego se precipitaron las proteínas del homogenado mediante 200 µL de solución para precipitación de proteínas y un centrifugado a 15.000 x g por cuatro minutos. Se recolectó el sobrenadante, el cual se agregó a un tubo con 600 µL de alcohol isopropílico a temperatura ambiente. El contenido del tubo fue mezclado por inversión y centrifugado a 15.000 x g por 1 minuto, el sobrenadante fue recolectado y se agregó a un tubo con 600 µL de etanol. El contenido del tubo fue mezclado por inversión, centrifugarlo a 15.000 x g por 1 minuto. El etanol fue aspirado y el precipitado (DNA) se dejó secar al aire por 15 minutos, y fue hidratado en 100 µL de solución de hidratación de DNA mediante incubación por una hora a 65° C (Duaso *et al.*, 2010).

El DNA fue cuantificado mediante el kit Quant-iT™ dsDNA BR Assay (Invitrogen®) según instrucciones del fabricante. Se preparó una solución de 200 µL (198 µL de Quant-iT™ dsDNA BR buffer, 1 µL de Quant-iT™ dsDNA BR reagent y 1 µL de DNA genómico) que fue incubada por dos minutos a temperatura ambiente, posteriormente la absorbancia de la fluorescencia fue leída en un fluorímetro (Qubit® fluorometer).

### **Reacción de polimerasa en cadena (PCR):**

Para la reacción de PCR se preparó una mezcla de 25 µL conteniendo 100 ng de DNA genómico (cuantificado mediante fluorometría en Qubit® fluorometer Invitrogen®), MgCl<sub>2</sub> 50 mM, 0,2 mM de cada dNTP, 1.5 U de Taq polimerasa y 32 pmol de cada partidor. Los ciclos termales fueron: 5 min de denaturación a 95° C, seguidos de 20 ciclos de 30 segundos a 95° C, 30 segundos a 60° C y 1 min a 72° C. La extensión final fue de 7 min a 72° C. Se amplificaron fragmentos del gen

codificante para la endonucleasa NL1Tc de *T. cruzi* amplificando un segmento de 984 pares de bases. Los partidores usados fueron: Sentido 5'-GGGGTACCATGGAGCCATTTACATGGCTG-3' y antisentido 5'-CCCAAGCTTTATAAGCGCTCTCGTGAAAGC-3'. Los amplificados de DNA se separaron en geles de agarosa al 1% preparados en tampón Tris-borato-EDTA (Tris-HCl 89 mM pH 8,0, Acido bórico 89 mM, EDTA 2 mM) y se tiñeron con bromuro de etidio (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. Las variables múltiples se analizaron mediante ANDEVA seguido por "Dunnett's post test" (compara todas las columnas respecto al control). Se utilizó el programa computacional GraphPad Software PRISM 5.0 (GraphPad Software, San Diego, EE.UU.). Se consideró un  $p < 0,05$  como estadísticamente significativo.

### **Bioseguridad:**

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

### **Bioética:**

Este estudio contó con la aprobación del "Comité de Ética Humana de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile" **(Anexo 3).**

## RESULTADOS

**Bz previene parcialmente el daño tisular observado en vellosidades coriónicas humanas infectadas *ex vivo* con *T. cruzi*.**

Vellosidades coriónicas humanas fueron incubadas durante 24 horas en presencia (**Figs 6-8 B, D, F y H**) y ausencia (**Figs 6-8 A, C, E y G**) de  $10^6$  millones de tripomastigotes cepa DM28c; así como en presencia y ausencia de Bz a concentraciones de 2 (**Figs 6-8 C-D**), 20 (**Figs 6-8 E-F**) y 200  $\mu$ M (**Figs 6-8 G-H**).

- a) *Histopatología*: Las vellosidades coriónicas incubadas con el parásito (**Fig 6 B**) muestran un daño tisular severo respecto al control (**Fig 6 A**). Se observa separación y destrucción del sinciciotrofoblasto así como disgregación del tejido conectivo fetal (**Fig 6 B**). Vellosidades coriónicas incubadas con distintas concentraciones de Bz, en ausencia del parásito, no muestran un daño histopatológico evidente (**Fig 6 C, E y G**) respecto a las vellosidades controles (**Fig 6 A**). Las vellosidades coriónicas incubadas con el parásito y distintas concentraciones de Bz (**Fig 6 D, F y H**) evidencian un daño tisular menor al descrito más arriba (**Fig 6 D, F y H**).
- b) *Sinciciotrofoblasto*: El sinciciotrofoblasto es el tejido de la vellosidad coriónica, que está en contacto con la sangre materna. Por lo tanto, durante la transmisión vertical, este tejido constituye la primera barrera que deben atravesar los diversos patógenos. Los estudios histopatológicos (descritos más arriba) evidencian destrucción y desprendimiento del sinciciotrofoblasto en presencia del parásito (**Figs 6B y 7 B**). Se analizó en forma más detallada esta estructura mediante inmunohistoquímica con un marcador de sinciciotrofoblasto (anticuerpo anti-lactógeno placentario humano). Las vellosidades coriónicas que fueron incubadas con Bz a concentraciones de 2, 20 y 200  $\mu$ M respectivamente y en ausencia de parásitos (**Fig 7 C, E y G**) no evidencian daños aparentes en el sinciciotrofoblasto, en cambio las vellosidades tratadas con Bz a distintas concentraciones e incubadas con el

parasito (**Fig 7 D, F y H**) muestran daño tisular parcial como desorganización parcial y separación del sinciciotrofoblasto.

- c) *Tejido conectivo fetal*: Durante la invasión tisular, además de atravesar sinciciotrofoblasto y láminas basales, el parásito debe avanzar a través del tejido conectivo para alcanzar los capilares fetales. El tejido conectivo fetal de la vellosidad coriónica es de tipo laxo y el colágeno I constituye el principal componente fibrilar de la MEC. Se analizó a este componente de la MEC mediante la técnica histoquímica de Picro Rojo Sirio. El daño se evidencia por la pérdida de birrefringencia de las fibras de colágeno I. Se observa desorganización parcial del tejido conectivo en las vellosidades tratadas con Bz e incubadas con el parásito (**Fig 8 D, F y H**). En las vellosidades coriónicas que fueron incubadas con Bz a concentraciones de 2, 20 y 200  $\mu\text{M}$  respectivamente y en ausencia de parásitos (**Fig. 8 C, E y G**) no se aprecian mayores alteraciones en las fibras de colágeno.
- d) *Inducción de apoptosis*: El proceso de muerte celular programada tipo apoptosis es fundamental en la mantención de la homeostasis de las vellosidades coriónicas (Belkacemi *et al.*, 2009) Se han descrito a diversos patógenos, entre ellos *T. cruzi*, capaces de inducir, retardar o inhibir la apoptosis como parte de sus estrategias de infección (Heussler *et al.*, 2001; de Souza, 2003).

Durante el proceso de apoptosis se induce fragmentación de DNA. En las vellosidades coriónicas incubadas con tripomastigotes (**Fig 10 A-C**) se observó un aumento significativo de fragmentación de DNA mediante la detección de células TUNEL+ respecto al control (**Fig 9 A-C**). Se observan imágenes correspondientes a las observaciones con contraste de fase (A, D, G, J), imágenes correspondientes a la tinción nuclear con DAPI (B, E, H, K) e imágenes correspondientes a la reacción de TUNEL (C, F, I, L).

No se observan diferencias estadísticamente significativas respecto a la presencia de células TUNEL + en las vellosidades coriónicas tratadas con las distintas concentraciones de Bz (2, 20, 200  $\mu\text{M}$ ) respecto del control (**Fig 11**). En cambio, en las vellosidades coriónicas incubadas con las distintas

concentraciones de Bz en presencia del parásito presentan un número similar de células TUNEL + respecto del control infectado (**Fig 11**). Por lo que Bz no es capaz de prevenir la inducción de apoptosis en las vellosidades coriónicas incubadas con el parásito.

- e) *Lipoperoxidación*: El mecanismo de acción de Bz es a través de la formación de radicales libres y/o metabolitos electrofílicos. La medición de la lipoperoxidación mediante detección de la generación de MDA es una manera confiable de evidenciar el daño de macromoléculas, específicamente de los fosfolípidos de las membranas biológicas. Se observa un leve aumento en la cantidad de MDA generada en presencia de las distintas concentraciones de Bz y en presencia y ausencia del parásito, sin embargo, este aumento no es estadísticamente significativo (**Fig 12**).

**El daño tisular observado en vellosidades coriónicas humanas infectadas *ex vivo* con *T. cruzi*, en presencia y ausencia de Nx, se debe tanto a la presencia del parásito como a un efecto tóxico de Nx.**

Vellosidades coriónicas humanas fueron incubadas durante 24 horas en presencia (**Figs 13-15 B, D, F y H**) y ausencia (**Figs 13-15 A, C, E y G**) de  $10^6$  millones de tripomastigotes cepa DM28c; así como en presencia y ausencia de Nx a concentraciones de 1 (**Figs 13-15 C-D**), 10 (**Figs 13-15 E-F**) y 100  $\mu\text{M}$  (**Figs 13-15 G-H**).

- a) *Histopatología*: Tanto las vellosidades incubadas con el parásito sólo (**Fig 13B**), las incubadas con 10 y 100  $\mu\text{M}$  de Nx (**Fig 13 E y G**) como las incubadas con el parásito y las distintas concentraciones de Nx (**Fig 13 D, F y H**) muestran un severo daño tisular. Las vellosidades coriónicas presentan separación y destrucción del sinciciotrofoblasto así como disgregación del tejido conectivo fetal respecto al control (**Fig 13 A**). Sólo las vellosidades coriónicas incubadas con 1  $\mu\text{M}$  de Nx no muestran un daño tisular severo. Sin embargo las muestras sometidas a inmuno-detección de

lactógeno placentario humano si evidenciaron desprendimiento del sinciotrofoblasto (**Fig 14 C**)

- b) Sinciotrofoblasto:** En las vellosidades coriónica incubadas con Nx 1, 10 y 100  $\mu$ M en presencia (**Fig. 14 D, F y H**) y ausencia del parásito (**Fig. 14 C,E y G**) se evidencia disgregación y separación del sinciotrofoblasto respecto al control (**Fig 14 A**).
- c) Tejido conectivo fetal:** En las vellosidades coriónica incubadas con Nx 1, 10 y 100  $\mu$ M en presencia (**Fig. 15 D, F y H**) y ausencia del parásito (**Fig. 15 C, E y G**) se evidencia una marcada desorganización del colágeno I del tejido conectivo fetal respecto al control (**Fig 15 A**).
- d) Inducción de apoptosis:** En las vellosidades coriónicas incubadas con tripomastigotes (**Fig 17 A-C**) se observó un aumento significativo de fragmentación de DNA mediante la detección de células TUNEL+ respecto al control (**Fig 16 A-C**). Se observan imágenes correspondientes a las observaciones con contraste de fase (A, D, G, J), imágenes correspondientes a la tinción nuclear con DAPI (B, E, H, K) e imágenes correspondientes a la reacción de TUNEL (C, F, I, L). Nx, igual que Bz, no induce la presencia de células TUNEL+ en las vellosidades coriónicas tratadas solamente con la droga (**Fig 16**). Nx tampoco previene la inducción de células TUNEL+ en las células incubadas con el parásito (Fig 17-18), ya que presentan un índice de células TUNEL+ igual que las incubadas solamente con el parásito (**Fig 18**).
- e) Lipoperoxidación:** El mecanismo de acción propuesto, pero últimamente cuestionado, de Nx es a través de la formación de radicales libres. A pesar de que se observa una tendencia al aumento de la presencia de MDA en las vellosidades incubadas con Nx en presencia y ausencia del parásito, solamente las vellosidades coriónicas tratadas, en ausencia del parásito y con la más alta concentración de Nx ensayada (100  $\mu$ M) presentan un aumento significativo en la producción de MDA ( $p \leq 0,05$ ) respecto al control (**Fig.19**).

**Los tratamientos con Nx y Bz no son capaces de eliminar al parásito de las vellosidades coriónicas infectadas *ex vivo* con *T. cruzi*.**

Vellosidades coriónicas humanas fueron incubadas durante 24 horas en presencia y ausencia de  $10^6$  millones de tripomastigotes cepa DM28c y en presencia y ausencia de Nx o Bz en las concentraciones anteriormente descritas. Ninguna de las drogas fue capaz de eliminar completamente al parásito en el tejido.

En la figura 20 se observa la detección del parásito mediante inmunohistoquímica con un anticuerpo anti-cruzipaína. En las vellosidades coriónicas incubadas con  $10^6$  tripomastigotes en ausencia de las drogas antichagásicas (**Fig 20 B**) y con la concentración más alta de Bz (200  $\mu$ M) (**Fig 20 C**) o con la concentración más alta de Nx (100  $\mu$ M) (**Fig 20 D**) se detecta el parásito. En las vellosidades coriónicas controles no se observa inmunoreactividad para el antígeno (**Fig 20 A**)

Adicionalmente se detectó la presencia del parásito en las vellosidades coriónicas humanas mediante PCR. Se observaron amplificados de DNA parasitario correspondiente al gen de la endonucleasa de *T. cruzi* NL1Tc en muestras de vellosidades coriónicas infectadas con  $10^6$  parásitos y no tratados (**Fig 21 carril 5**) y en las vellosidades infectadas y tratadas con las distintas concentraciones del parásito (**Fig 21 carriles 7-9**). El amplificado en las vellosidades coriónicas tratados con 200  $\mu$ M de Bz es menor, pero está presente. Por lo tanto, Bz a la concentración más alta ensayada no elimina al parásito.

El mismo resultado se obtiene en las vellosidades coriónicas humanas infectadas y tratadas con distintas concentraciones de Nx. Se observan amplificados de DNA parasitario en muestras de vellosidades coriónicas infectadas con  $10^6$  parásitos y no tratados (**Fig 22 carril 5**) y en las vellosidades infectadas y tratadas con las distintas concentraciones del parásito (**Fig 22 carriles 7-9**). Los amplificados en las vellosidades coriónicas tratados con 10 y 100  $\mu$ M de Nx son menores, pero están presentes. Por lo tanto Nx con las concentraciones más altas ensayadas tampoco eliminan al parásito.

## DISCUSIÓN

Durante la transmisión congénita, el parásito debe atravesar el sinciotrofoblasto, el citotrofoblasto, la lámina basal, el tejido conectivo fetal, la lámina basal del capilar fetal y finalmente, el endotelio fetal, es decir la barrera placentaria (Bittencourt, 1976; Andrade, 1982; Nisida, 1999; Carlier, 2005).

El modelo de infección *ex vivo* de vellosidades coriónicas humanas, ya ha sido utilizado previamente por otros autores (Sartori *et al.*, 2003; Lin, *et al.*, 2004; Mezzano, *et al.*, 2005) demostrando ser una herramienta excelente en el estudio de los mecanismos de infección parasitaria y de la transmisión congénita.

Al infectar *ex vivo* explantes de vellosidades coriónicas con tripomastigotes, la primera capa que éstos deben atravesar es el sinciotrofoblasto. Durante este proceso de infección, *T. cruzi* induce la destrucción y desprendimiento de esta capa tisular (Duaso *et al.*, 2010). No sólo *T. cruzi* causa este tipo de daño, sino que otros patógenos como citomegalovirus (Chan y Guilbert, 2006) y parásitos como *P. falciparum* (Crocker *et al.*, 2004) y el *T. gondii* (Abbasi *et al.*, 2003) también provocan lesiones a este nivel. La destrucción y el desprendimiento del sinciotrofoblasto, tejido que está en contacto con la sangre materna y en la cual diversos patógenos pueden circular, podría constituir un mecanismo de defensa tratando de evitar la infección congénita. El desprendimiento o descamación de tejidos epiteliales, forma parte de la primera barrera de defensa del organismo frente a agentes infecciosos (Junqueira y Carneiro, 2005).

Actualmente, Nx y Bz son las drogas de elección para el tratamiento de la enfermedad de Chagas. Sin embargo, para estas drogas están descritos efectos secundarios adversos de distinta magnitud, que van desde las náuseas hasta las convulsiones o neuropatías (Maya *et al.*, 2006).

El mecanismo de acción propuesto para ambas drogas es la formación de radicales libres y/o metabolitos electrofílicos. Sin embargo, últimamente se ha cuestionada la capacidad de generar especies reactivas del oxígeno y nitrógeno de Nx (Boiani *et al.*, 2010), por lo que su mecanismo de acción no está claro.



Los radicales libres y metabolitos electrofílicos alteran por distintas vías la estructura de macromoléculas biológicas como lípidos, proteínas y DNA (Maya *et al.*, 2006).

En el caso del tratamiento con Bz se pudo demostrar que en las tres concentraciones utilizadas (2, 20 y 200  $\mu\text{M}$ ), la droga no provoca daño tisular. En el caso específico de los explantes tratados con Bz, en las 3 concentraciones mencionadas anteriormente e infectados con el protozoo se obtuvo un menor daño tisular al obtenido en las vellosidades infectadas sin tratamiento (**Figs 6 - 8**).

El tejido conectivo fetal es otro obstáculo que encuentra el parásito entre el trofoblasto y capilares fetales. En la infección *ex vivo* de la vellosidad coriónica humana el parásito induce una severa desorganización del colágeno I. Este proceso se evidenció claramente con la técnica con picro rojo sirio. La degradación del colágeno I se explica probablemente por la presencia de cruzipaina (Scharfstein y Morrot, 1999) o por la secreción de metaloproteinasas tipo gelatinasas B que son capaces de degradar al colágeno I. En los explantes tratados únicamente con Bz no se observó daño del colágeno I, en cambio, en las vellosidades tratadas con la droga e infectadas con *T. cruzi* se observó un daño parcial de esta estructura (**Fig 8**).

Estas evidencias experimentales cuestionan el mecanismo de acción propuesto para Bz. Si esta droga es capaz de generar especies electrofílicas y así inducir daño en macromoléculas, este daño molecular se evidenciaría como un efecto tóxico sobre el tejido. Este efecto tóxico no se observa en las vellosidades tratadas solamente con la droga, incluso Bz previene parcialmente el daño inducido por el parásito.

En cambio, Nx si presenta efectos tóxico sobre los explantes de vellosidades coriónicas humanas dado el marcado daño tisular evidenciado bajo las concentraciones de 1, 10, 100  $\mu\text{M}$  tanto en presencia como ausencia del parásito (**Figs 13-15**). Estos daños tisulares se observan en el análisis histopatológico (**Fig 13**), en el análisis del sinciciotrofoblasto (**Fig 14**) y al analizar el colágeno I del tejido conectivo fetal (**Fig 15**). Así, se puede concluir que Nx no sólo es incapaz de prevenir el daño causado por el parásito sino que por sí sólo

induce destrucción tisular. Estos resultados complican aún más el entendimiento de los mecanismos de acción de Nx. Se ha propuesto que Nx genera compuestos electrofílicos y ROS/RNS, los que serían los responsables de los efectos tóxicos, que se han descrito para esta droga. Nuestros análisis histopatológicos, histoquímicos e inmunohistoquímicos confirman el efecto tóxico de Nx, que podría deberse al mecanismo de acción propuesto. Sin embargo, últimamente se ha descrito que Nx no es capaz de generar ROS/RNS (Boiani *et al.*, 2010).

Para confirmar el posible estrés oxidativo/nitrosativo de ambas drogas se evaluó la lipoperoxidación de las membranas biológicas presentes en las vellosidades coriónicas humanas. La lipoperoxidación es el resultado del daño celular y es inducido por estrés oxidativo (Muriel, 1997). Este proceso de peroxidación lipídica consta de una serie de reacciones en cadena, que llevan a la formación de MDA (Alberts *et al.*, 2008). Se observó una leve tendencia al aumento de MDA generado en presencia de las distintas concentraciones de Bz en presencia y ausencia del parásito. Sin embargo, este aumento no fue significativo. En las vellosidades coriónicas tratadas con Nx también se observa una tendencia al aumento de la lipoperoxidación a medida que se aumenta la concentración de la droga en presencia y ausencia del parásito (**Fig 18**). Esta tendencia al aumento de la lipoperoxidación es más notoria que con Bz. Sin embargo, sólo la concentración más alta de Nz ensayada induce un aumento significativo en la producción de MDA respecto al control. Probablemente al aumentar el número de experimentos se logren ver diferencias estadísticamente significativas (**Fig 19**). Los resultados obtenidos bajo estas condiciones en relación a la no inducción de lipoperoxidación confirman la inocuidad de Bz sobre el tejido placentario. Debido a que el parásito por sí sólo tampoco genera lipoperoxidación (**Fig 12**) la prevención del daño inducido por el parásito o por Bz se debería a mecanismos aún desconocidos. Los resultados en relación a Nx aún generan dudas respecto si la lipoperoxidación influye en su efecto tóxico, cómo descrito más arriba, hay que aumentar el número de experimentos e implementar otras determinaciones de daño oxidativo como por ejemplo ver daño oxidativo en el DNA o proteínas.

De la célula hospedera y su integridad depende en parte la supervivencia y el desarrollo de los agentes patógenos. La activación o la prevención de la muerte celular parece ser un factor decisivo en el resultado de una infección, ya que puede facilitar o dificultar el control de patógenos y la propagación de estos (de Souza *et al.*, 2003). El proceso de muerte celular tipo apoptosis puede ser modulado durante la infección con diferentes microorganismos, como bacterias, virus y protozoos (de Souza *et al.*, 2003). Diversos patógenos inducen apoptosis en células del sistema inmune y evaden de esta manera el sistema de defensa del organismo. Por otro lado, la inhibición de apoptosis de una célula huésped puede permitir la proliferación intracelular de un patógeno (Weinrauch y Zychlinsky, 1999).

*Trypanosoma cruzi*, puede inducir, retardar o inhibir la apoptosis en células del hospedero (Heussler *et al.*, 2001). Tanto los parásitos intracelulares como las células huésped sufren apoptosis durante la infección con *T. cruzi*. Estos procesos se han observado durante estudios de invasión celular *in vivo* e *in vitro* (De Souza *et al.*, 2003). Las principales células blanco, en las cuales *T. cruzi* induce apoptosis son macrófagos comparado con otras células de mamífero (de Souza *et al.*, 2003; de Souza *et al.*, 2008), por lo que la inducción de apoptosis sería un mecanismo de evadir la respuesta inmune. La apoptosis también se desencadena, por ejemplo, cuando no se pueden reparar macromoléculas (como el DNA) dañadas, entre otros, por especies reactivas del oxígeno o nitrógeno (Alberts *et al.*, 2008), por lo que la inducción de apoptosis en el tejido placentario podría ser un mecanismo de defensa placentario local.

Se han descrito otros parásitos que inducen la apoptosis en la placenta humana como *T. gondii* (Abbasi, 2003) y *P. falciparum* (Crocker, 2004). En nuestro laboratorio describimos la inducción de apoptosis en placenta humana por *T. cruzi* (Duaso, 2010).

Las vellosidades coriónicas tratadas con Bz (**Figs 9-11**) o Nx (**Figs 16-18**) no presentan aumento de la fragmentación del DNA. Por otra parte, en las vellosidades infectadas con *T. cruzi* y tratadas con las drogas se demuestra que

ninguna de las drogas es capaz de inhibir los procesos apoptóticos desencadenados por la infección parasitaria.

El hecho que Bz no induzca fragmentación de DNA concuerda con los resultados anteriores, ya que Bz no ejerce un efecto tóxico sobre el tejido placentario. Sin embargo, llama la atención que no previene el daño inducido a nivel de DNA por el parásito. Por el contrario, se encontró que Nx no induce aumento de la fragmentación del DNA, en las vellosidades coriónicas incubadas con las distintas concentraciones de la droga. Sería esperable encontrar células TUNEL+ en presencia de Nx, si esta droga indujera un daño oxidativo. La no prevención del daño en el DNA inducido por el parásito si concuerda con los resultados obtenidos con los estudios histopatológicos, histoquímicos, inmunohistoquímicos y la determinación de lipoperoxidación.

Por otra parte es probable que la inducción de apoptosis por el parásito refleje una aceleración del proceso apoptótico en el trofoblasto, que forma parte del proceso de diferenciación de este tejido epitelial. Esta aceleración del recambio del sinciotrofoblasto (capa más diferenciada y superficial del trofoblasto) puede formar parte de los mecanismos de defensa local de la placenta (Duaso., 2010).

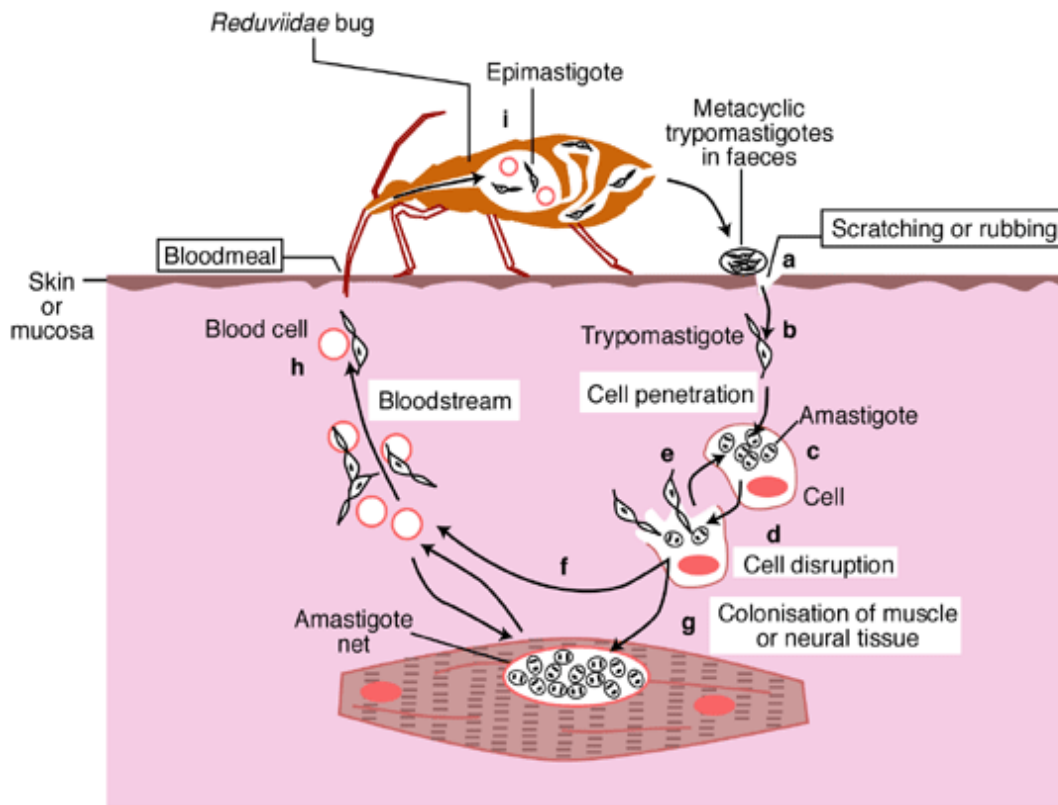
Ninguna de las drogas, ni con la concentración más alta ensayada, es capaz de eliminar el parásito del tejido placentario. La presencia del parásito fue determinada mediante PCR y mediante técnicas inmunohistoquímicas. La presencia de DNA parasitario detectado mediante PCR no permite diferenciar entre la presencia de parásitos vivos o muertos y podría ser que el DNA detectado corresponda a DNA de parásitos lisados por la droga o por mecanismos de defensa locales de la placenta. Lo mismo se puede afirmar con la detección inmunohistoquímica, se detectan antígenos parasitarios, pero no al parásito completo ni nidos de amastigotes que se esperarían encontrar en una infección efectiva.

Los resultados de esta memoria demuestran que Bz es capaz de prevenir parcialmente el daño tisular provocado por *T. cruzi* en las vellosidades coriónicas infectadas *ex vivo*, en cambio, en las vellosidades tratadas con Nx se observó que

el daño tisular no sólo corresponde a la infección parasitaria sino que también tiene relación con el efecto tóxico de Nx sobre los tejidos. Además se puede afirmar que tanto Bz como Nx son incapaces de eliminar al parásito de las vellosidades coriónicas humanas aún con las concentraciones más altas ensayadas.

## CONCLUSIONES

- Benznidazol no presenta efectos tóxicos sobre los explantes vellosidades coriónicas humanas.
- Benznidazol previene parcialmente el daño inducido en explantes de vellosidades coriónicas infectadas *ex vivo* con tripomastigotes de *T. cruzi*.
- Nifurtimox presenta efectos tóxicos sobre los explantes vellosidades coriónicas humanas y por ende, no puede prevenir el daño inducido en explantes de vellosidades coriónicas infectadas *ex vivo* con tripomastigotes de *T. cruzi*.
- La infección *ex vivo* de explantes de vellosidades coriónicas humanas con *T. cruzi* es una excelente herramienta para determinar el efecto tóxico y terapéutico de drogas antichagásicas.



**Figura 1: Ciclo biológico de *Trypanosoma cruzi*:**

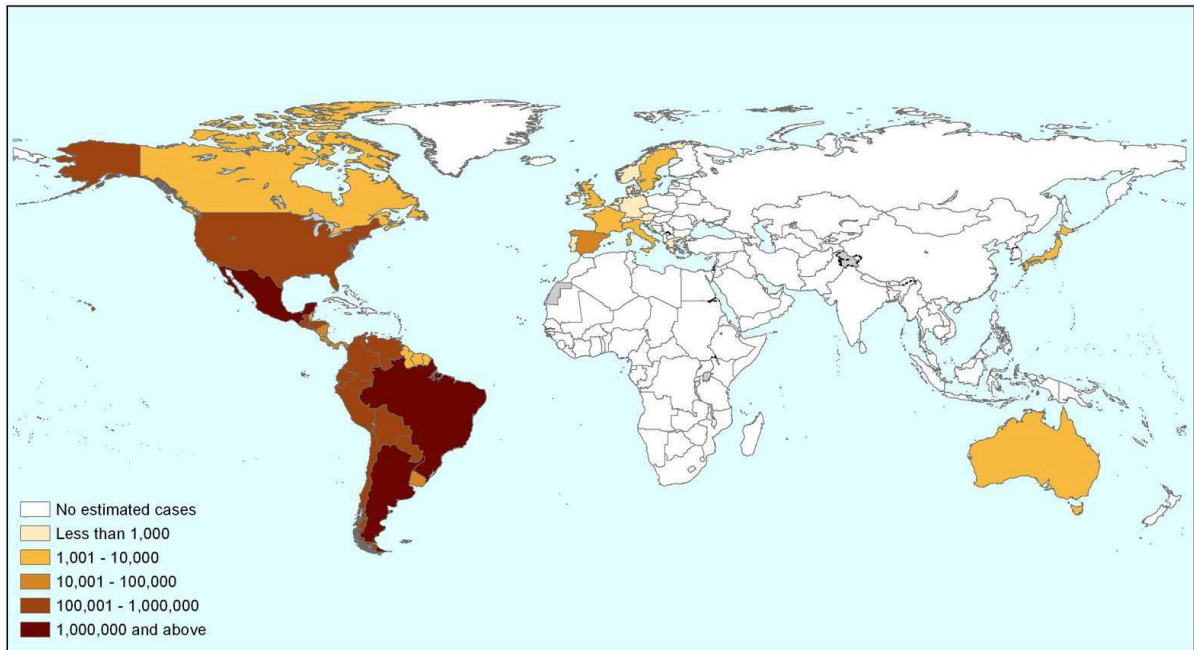
El insecto vector (triatomino) al alimentarse de sangre de un individuo infectado con el parásito ingiere los tripomastigotes. Los parásitos, a medida que avanzan por el tracto digestivo del insecto vector, se diferencian a epimastigotes, los cuales se multiplican quince a treinta veces. Cuando los epimastigotes alcanzan al intestino posterior del insecto vector 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, se diferencian a tripomastigotes, lisan la célula, alcanzan la circulación y se diseminan por todo el organismo, quedando expuestos para que nuevamente sean ingeridos por un triatomino, cerrando así el ciclo biológico. Fuente: Universidad de Cambridge, <http://www-ermm.cbcu.cam.ac.uk>



**Figura 2: Formas celulares de *Trypanosoma cruzi*:**

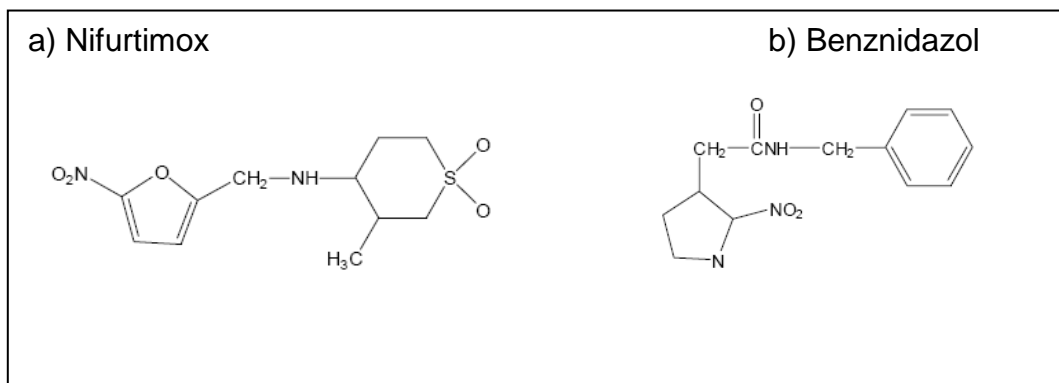
El parásito presenta tres formas celulares: **(A) tripomastigote**, forma infectante, no proliferativa; **(B) epimastigote**, forma replicativa que se encuentra en el tubo digestivo del agente vector y **(C) amastigote**, que es la forma replicativa intracelular en los mamíferos. Fuente: Universidad de Texas Arlington, <http://www.uta.edu/chagas/html/biolTcru.html>





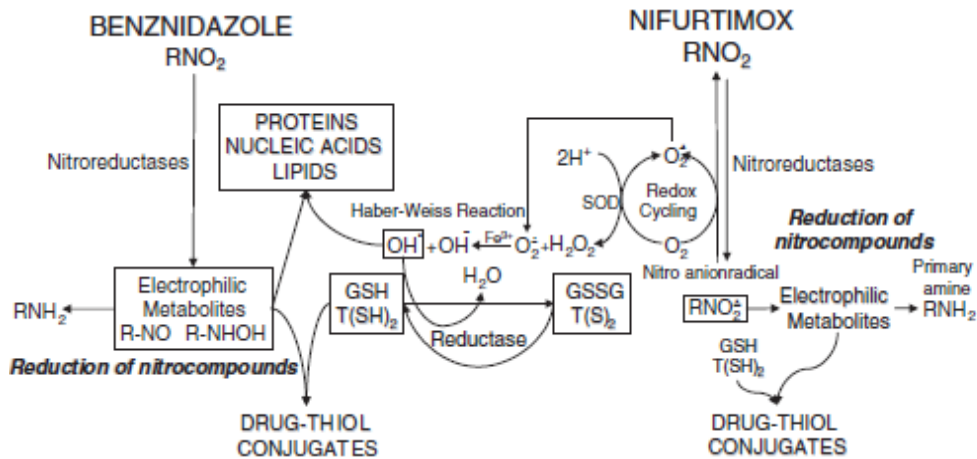
**Figura 3: Estimación de la población mundial infectada con *Trypanosoma cruzi***

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 desde países endémicos. Fuente: [http://www.treatchagas.org/imagenes/MapChagasJun09\\_large.jpg](http://www.treatchagas.org/imagenes/MapChagasJun09_large.jpg)



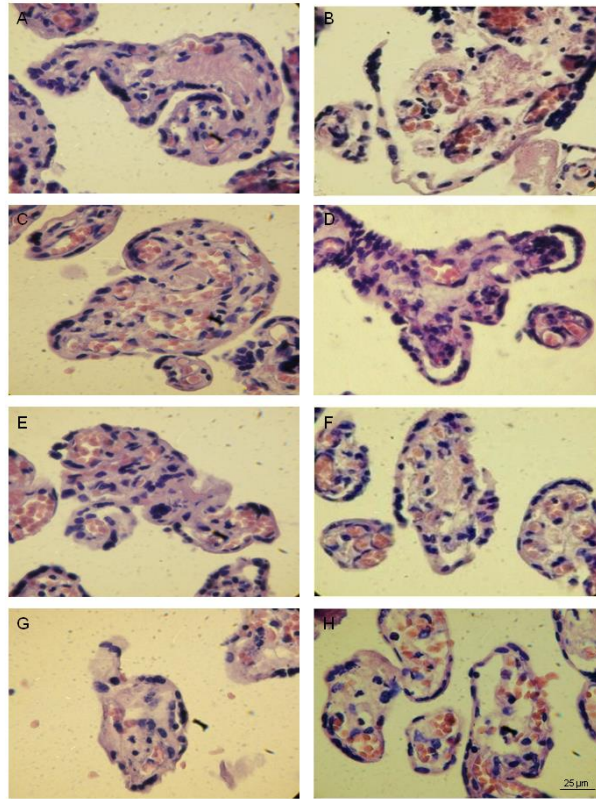
**Figura 4: Drogas utilizadas en el tratamiento de la enfermedad de Chagas**

Se usan dos compuestos nitroheterocíclicos para el tratamiento de la enfermedad de Chagas: **a) Nifurtimox (Nx)** [3-metil-4(nitrofurfurilideneamino)tetrahidro-4H-1,4-tiozina-1,1-dióxido] y **b) Benznidazol (Bz)** [N-benzil-2-nitroimidazol acetamida]. Fuente: American Society for Microbiology. 2005. ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY, VOL.49.



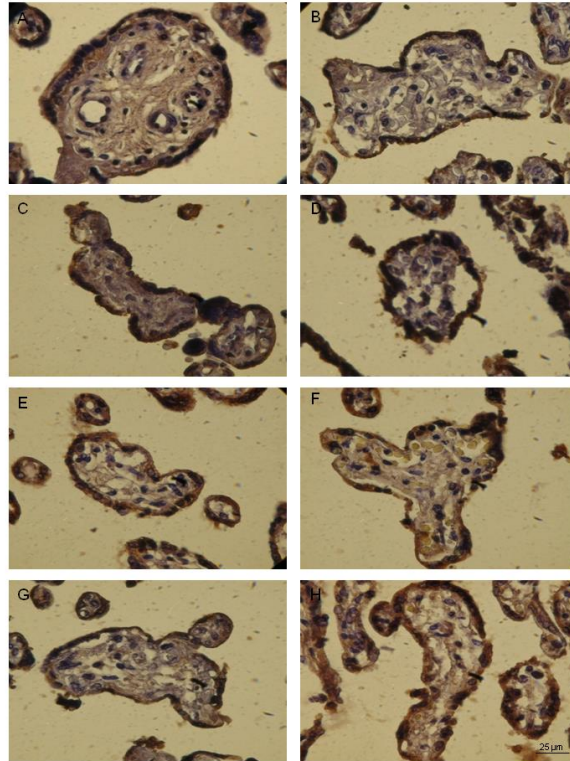
**Figura 5: Mecanismo de acción de Benznidazol (Bz) y Nifurtimox (Nx)**

El probable mecanismo de acción de las drogas Nifurtimox y Benznidazol es a través de la formación de radicales libres y/o metabolitos electrofílicos. El grupo nitro de ambas drogas, por acción de nitroreductasas, requiere de seis electrones para reducirse a grupo amino, lo cual genera varios radicales libres y metabolitos electrofílicos. El proceso mediante el cual se forman los radicales libres se inicia por una reacción catalizada por flavoproteínas, incluyendo la NADPH-citocromo P450 reductasa, que actúa directamente sobre el grupo nitro de las moléculas  $R-NO_2$ , produciendo un radical intermediario anión nitro ( $R-NO_2\cdot^-$ ). Este radical intermediario entra en reciclaje redox con el oxígeno molecular produciendo una reducción parcial del oxígeno y regenerando la droga. El anión superóxido ( $O_2\cdot^-$ ) es dismutado a  $H_2O_2$  por la enzima superóxido dismutasa (SOD). El anión superóxido ( $O_2\cdot^-$ ) y el peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ), en presencia de  $Fe^{3+}$  forman el radical libre hidroxilo ( $OH\cdot$ ) (Reacción de Haber-Weiss Fenton). Estos radicales libres, fundamentalmente el  $OH\cdot$ , alteran la estructura de macromoléculas biológicas: lípidos, proteínas y DNA. Fuente: Maya, J. 2006. COMPARATIVE BIOCHEMISTRY AND PHYSIOLOGY, PART A 146



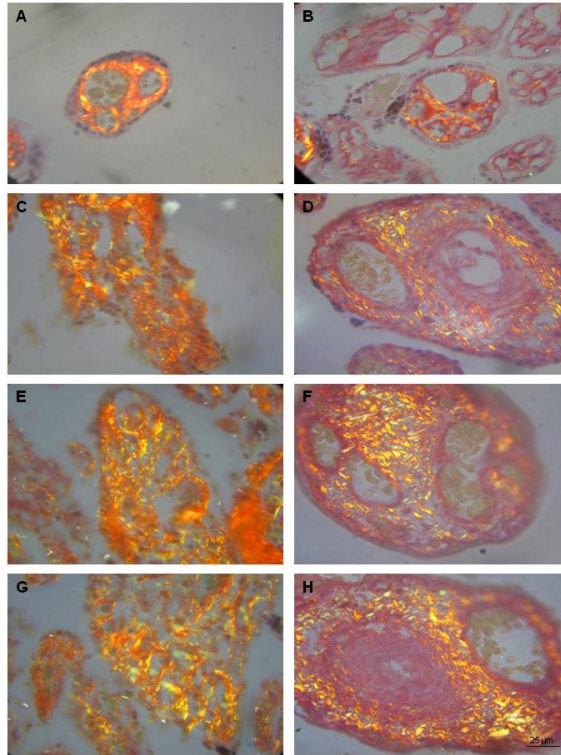
**Figura 6: Benznidazol previene parcialmente el daño tisular en vellosidades coriónicas humanas inducido por la infección ex vivo con *Trypanosoma cruzi*: Análisis histopatológico.**

Vellosidades coriónicas fueron incubadas durante 24 horas en ausencia (A, C, E, G) y presencia (B, D, F, H) de  $10^6$  tripomastigotes de la cepa DM28c y en ausencia y presencia de 2 (C-D), 20 (E-F) y 200 (G-H)  $\mu\text{M}$  de Bz. Se observa un severo daño tisular en las vellosidades coriónicas incubadas sólo con el parásito (B) respecto al control (A). Se observa destrucción y separación del sinciciotrofoblasto del tejido conectivo fetal vecino. El tejido conectivo fetal también muestra un marcado daño. Las vellosidades coriónicas que fueron incubadas con las distintas concentraciones de Bz en ausencia del parásito no muestran un daño tisular evidente (C, E, G). Las vellosidades coriónicas incubadas en presencia de las distintas concentraciones de las drogas y el parásito (D, F, H) evidencian un daño tisular menor que el descrito más arriba. Las vellosidades coriónicas fueron procesadas mediante técnicas histológicas convencionales y teñidas con hematoxilina eosina.



**Figura 7: Benznidazol previene parcialmente la destrucción y desprendimiento del sinciotrofoblasto en vellosidades coriónicas infectadas *ex vivo* con *Trypanosoma cruzi***

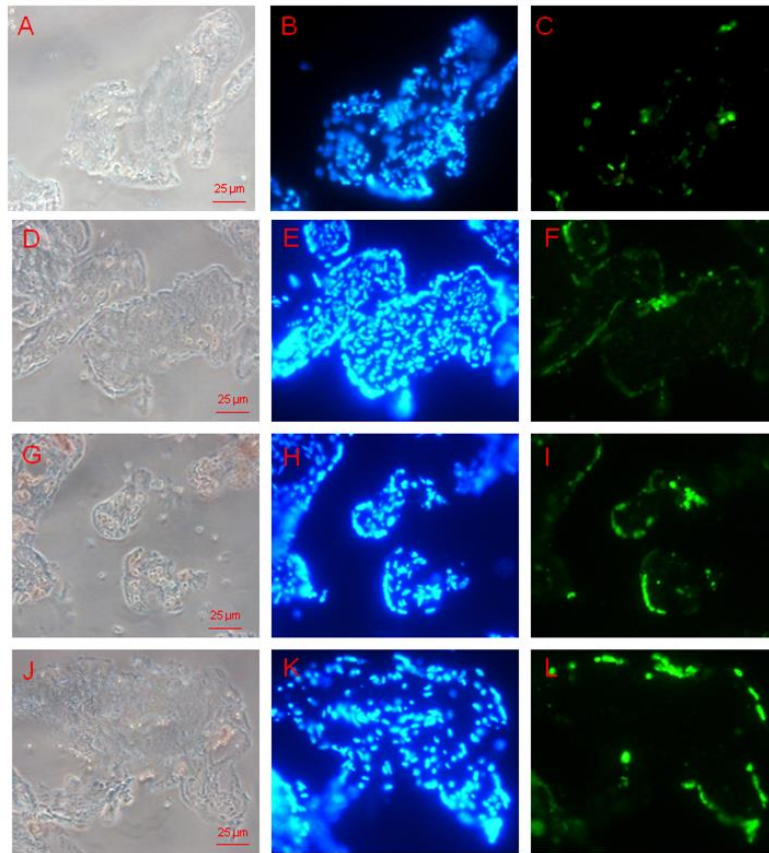
Vellosidades coriónicas fueron incubadas durante 24 horas en ausencia (A, C, E, G) y presencia (B, D, F, H) de  $10^6$  tripomastigotes de la cepa DM28c y en ausencia y presencia de 2 (C-D), 20 (E-F) y 200 (G-H)  $\mu\text{M}$  de Bz. Las vellosidades coriónicas incubadas con  $10^6$  tripomastigotes cepa DM28c durante 24 horas y en ausencia de tratamiento (B) muestran desprendimiento y destrucción del sinciotrofoblasto respecto a las vellosidades coriónicas controles (A). Las vellosidades coriónicas que fueron incubadas con Bz a concentraciones de 2, 20 y 200  $\mu\text{M}$  respectivamente y en ausencia de parásitos (C, E, F) no evidencian daños aparentes en los tejidos a este nivel, en cambio las vellosidades tratadas con Bz e incubadas con el parásito (D, F, H) muestran daño tisular parcial como desorganización parcial y separación del sinciotrofoblasto. Esto evidenciado mediante la inmunodetección de lactógeno placentario humano (marcador de sinciotrofoblasto). Las vellosidades coriónicas fueron procesadas mediante técnicas inmunohistoquímicas convencionales y la reacción antígeno anticuerpo fue revelado con DAB.



**Figura 8: Bz previene parcialmente la desorganización del colágeno I en el tejido conectivo fetal en vellosidades coriónicas infectadas *ex vivo* con *Trypanosoma cruzi***

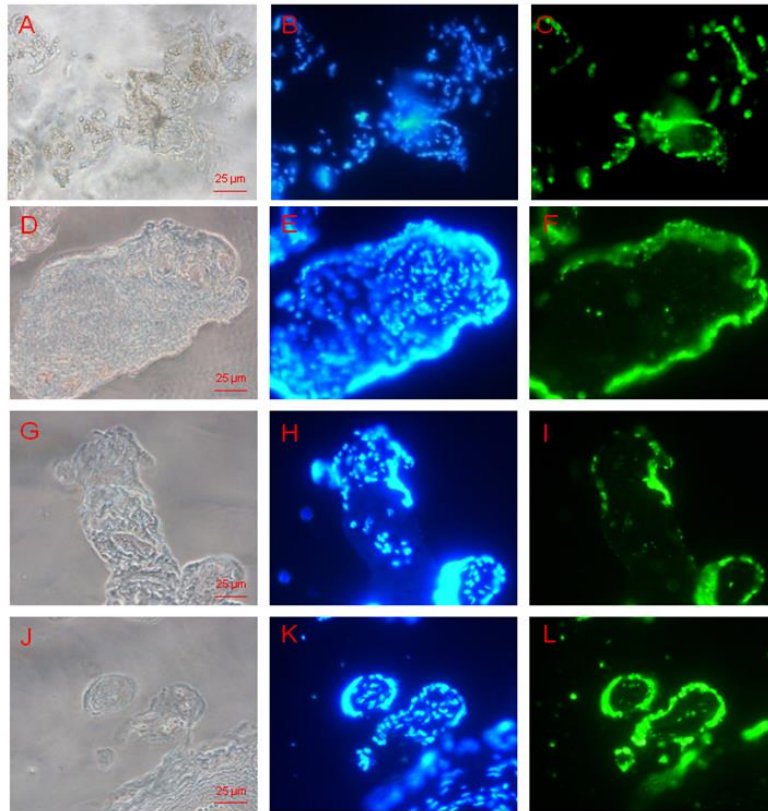
Vellosidades coriónicas fueron incubadas durante 24 horas en ausencia (A, C, E, G) y presencia (B, D, F, H) de  $10^6$  tripomastigotes de la cepa DM28c y en ausencia y presencia de 2 (C-D), 20 (E-F) y 200 (G-H)  $\mu\text{M}$  de Bz. Se observa severo daño al colágeno I en las vellosidades incubadas solo con el parásito (B) respecto a las vellosidades coriónicas controles (A). Las vellosidades coriónicas incubadas en presencia de las distintas concentraciones de drogas, en ausencia de parásitos (C, E, G) no se presentan mayores alteraciones en las fibras de colágeno, en cambio las vellosidades tratadas con Bz e incubadas con  $10^6$  tripomastigotes de la cepa DM28c durante 24 horas (D, F, G) muestran sólo una destrucción y desorganización parcial de colágeno I en el tejido conectivo fetal. Las vellosidades coriónicas fueron procesadas mediante técnicas histológicas convencionales; el colágeno I se identificó con la técnica histoquímica de picro rojo sirio.





**Figura 9: Benznidazol no induce fragmentación de DNA en explantes de vellosidades coriónicas**

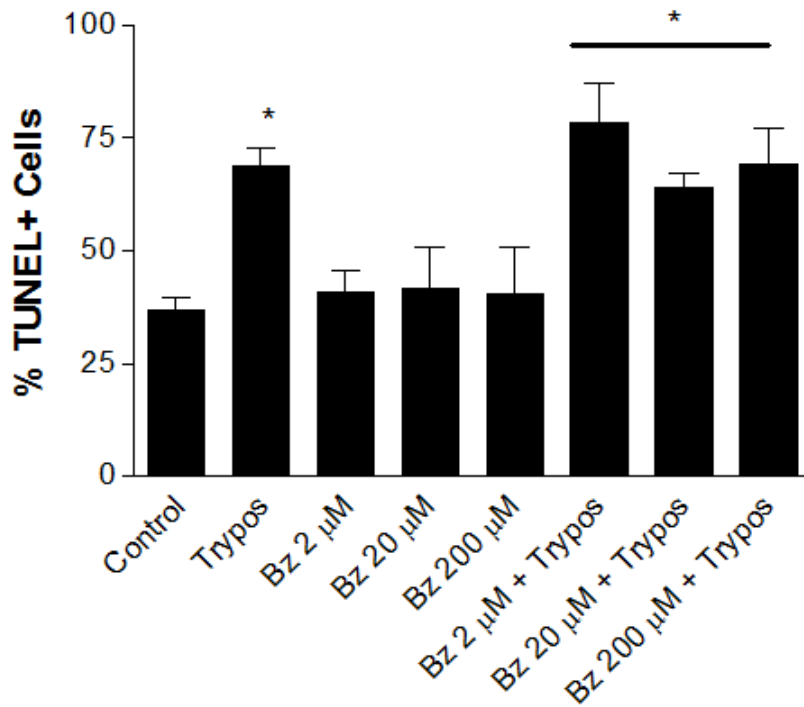
Se incubaron vellosidades coriónicas sin parásitos (A-C) y con 2 (D-F), 20 (G-I) y 200 (J-L)  $\mu\text{M}$  de Bz, respectivamente durante 24 horas. No se observan diferencias respecto a la inducción de células TUNEL + en las vellosidades coriónicas tratadas con Bz (D-L) respecto a las controles (A-C). Las vellosidades coriónicas fueron procesadas con el método de TUNEL (kit Promega) y la tinción nuclear se realizó con DAPI. A, D, G, J corresponden a contraste de fase; B, E, H, K corresponde a tinción nuclear con DAPI; C, F, I, L corresponde a detección de células TUNEL+.



**Figura 10: *Trypanosoma cruzi* induce fragmentación de DNA en las vellosidades coriónicas, el que no es prevenido por Benznidazol**

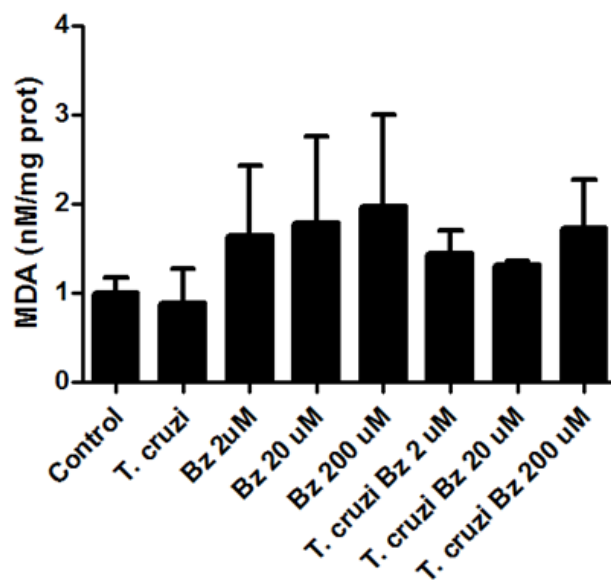
Vellosidades coriónicas humanas fueron incubadas durante 24 horas con  $10^6$  tripomastigotes cepa DM28c (A-C) y en presencia de 2 (D-F), 20 (G-I) y 200 (J-L)  $\mu$ M de Bz.. Las vellosidades coriónicas incubadas con el parásito y tratadas con Bz muestran un aumento similar de las células TUNEL+ que las vellosidades infectadas con el parásito. Las vellosidades coriónicas fueron procesadas para el método de TUNEL (kit Promega) y el contraste nuclear se realizó con DAPI. . A, D, G, J corresponden a contraste de fase; B, E, H, K corresponde a tinción nuclear con DAPI; C, F, I, L corresponde a detección de células TUNEL+.





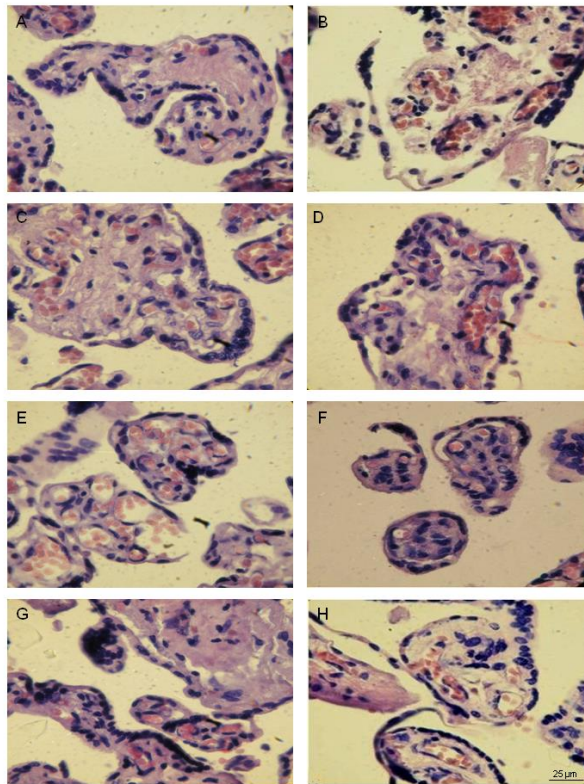
**Figura 11: Benznidazol no induce un aumento de células TUNEL+, sin embargo no es capaz de prevenir la inducción de células TUNEL+ en vellosidades coriónicas incubadas con *Trypanosoma cruzi***

Vellosidades coriónicas fueron incubadas durante 24 horas en ausencia y presencia de  $10^6$  tripomastigotes cepa DM28c y en ausencia y presencia de 2, 20 y 200  $\mu\text{M}$  de Bz. Vellosidades coriónicas infectadas con el parásito sólo y en presencia de Bz inducen un aumento estadísticamente significativo de células TUNEL+,  $p \leq 0,05$ .



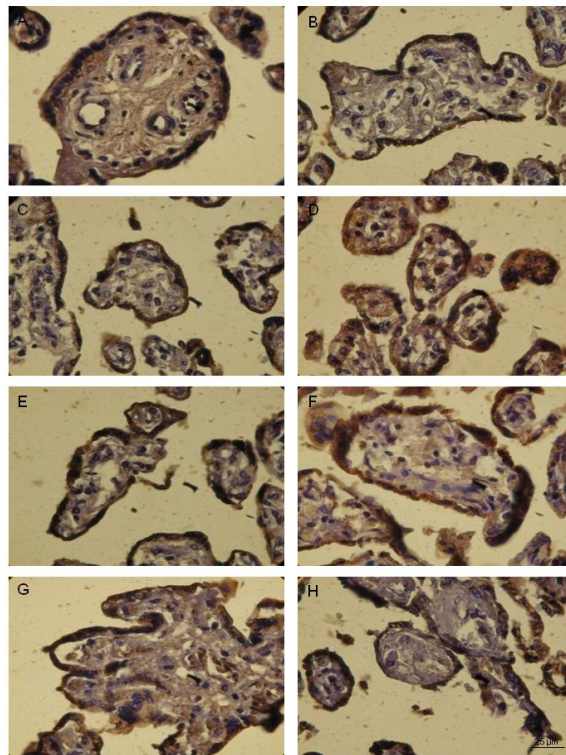
**Figura 12: Benznidazol y *Trypanosoma cruzi* no inducen lipoperoxidación en las vellosidades coriónicas humanas.**

Las vellosidades coriónicas humanas incubadas en presencia y ausencia de  $10^6$  tripomastigotes y con distintas concentraciones de Bz (2, 20 y 200  $\mu\text{M}$ ) no presentan diferencias significativas entre las vellosidades coriónicas tratadas con Bz respecto a las vellosidades coriónicas controles o infectadas con el parásito. Se utilizó Malondialdehído (MDA) como marcador de lipoperoxidación. El MDA fue separado en una columna C-18 con una fase móvil de 50% metanol y 50% de tampón fosfato 25 mM pH 6,5. El MDA fue evidenciado mediante un detector de fluorescencia a 553 nm.



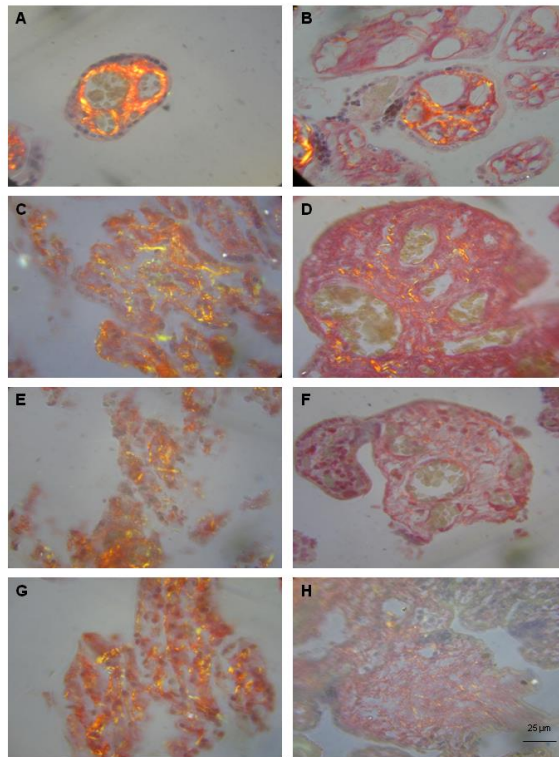
**Figura 13: El daño tisular se debe tanto a la presencia de *Trypanosoma cruzi* como al efecto tóxico de Nifurtimox: Análisis histopatológico**

Vellosidades coriónicas fueron incubadas durante 24 horas en ausencia (A, C, E, G) y presencia (B, D, F, H) de  $10^6$  tripomastigotes de la cepa DM28c y en ausencia y presencia de 1 (C-D), 10 (E-F) y 100 (G-H)  $\mu\text{M}$  de Nx. Se observa un severo daño tisular en las vellosidades coriónicas incubadas sólo con el parásito (B) respecto al control (A). Se observa destrucción y separación del sincitiotrofoblasto del tejido conectivo fetal vecino. El tejido conectivo fetal también muestra un marcado daño. Las vellosidades coriónicas incubadas con Nx en distintas concentraciones en presencia o en ausencia del parásito (C-H) evidencian un daño tisular similar a las vellosidades incubadas sólo con el parásito (B). Las vellosidades coriónicas fueron procesadas mediante técnicas histológicas convencionales y teñidas con hematoxilina eosina.



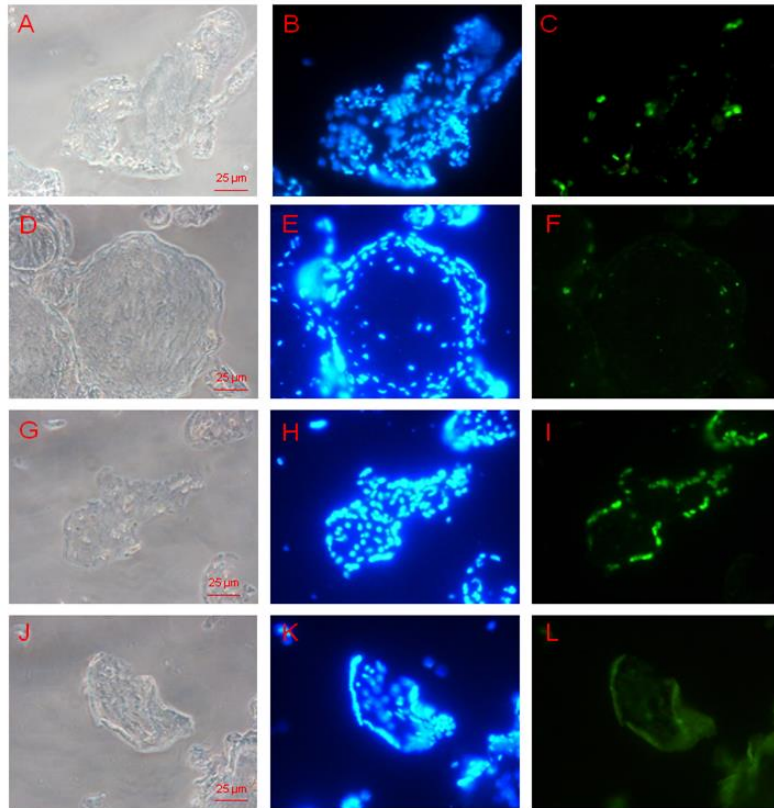
**Figura 14: La destrucción y desprendimiento del sinciotrofoblasto en vellosidades coriónicas infectadas ex vivo con *Trypanosoma cruzi* se debe tanto a la presencia del parásito como a Nifurtimox**

Vellosidades coriónicas fueron incubadas durante 24 horas en ausencia (A, C, E, G) y presencia (B, D, F, H) de  $10^6$  tripomastigotes de la cepa DM28c y en ausencia y presencia de 1 (C-D), 10 (E-F) y 100 (G-H)  $\mu\text{M}$  de Nx. Las vellosidades coriónicas incubadas con  $10^6$  tripomastigotes cepa DM28c durante 24 horas y en ausencia de tratamiento (B) muestran desprendimiento y destrucción del sinciotrofoblasto respecto a las vellosidades coriónicas controles (A). En las vellosidades coriónica incubadas con Nx 1, 10 y 100  $\mu\text{M}$  en presencia y ausencia de parásitos se evidencia un marcado daño del sinciotrofoblasto. Esto evidenciado mediante la inmunodetección de lactógeno placentario humano (marcador de sinciotrofoblasto). Las vellosidades coriónicas fueron procesadas mediante técnicas inmunohistoquímicas convencionales y la reacción antígeno anticuerpo fue revelado con DAB.



**Figura 15: La desorganización de colágeno I en el tejido conectivo fetal en vellosidades coriónicas infectadas ex vivo con *Trypanosoma cruzi* se debe tanto a la presencia del parásito como a Nifurtimox**

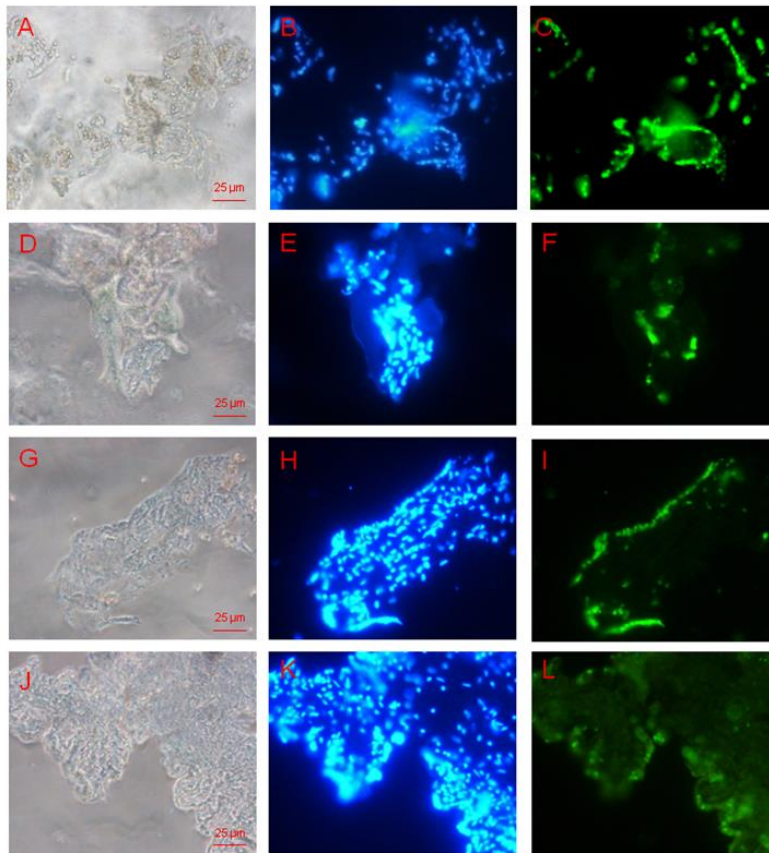
Vellosidades coriónicas fueron incubadas durante 24 horas en ausencia (A, C, E, G) y presencia (B, D, F, H) de  $10^6$  tripomastigotes de la cepa DM28c y en ausencia y presencia de 1 (C-D), 10 (E-F) y 100 (G-H)  $\mu\text{M}$  de Nx. Se observa una severa desorganización de colágeno I en las vellosidades incubadas solo con el parásito (B) respecto a las vellosidades coriónicas controles (A). En las vellosidades coriónicas que fueron incubadas con las distintas concentraciones de Nx (C, E, G) se evidencia una desorganización de colágeno I similar a las vellosidades coriónicas tratadas con Nx que además fueron incubadas con  $10^6$  tripomastigotes durante 24 horas (D, F, G). El daño observado en las vellosidades coriónicas tratadas sólo con Nx o en presencia de Nx y parásito (C-H) es similar al daño observado en las vellosidades infectadas sólo con el parásito. Las vellosidades coriónicas fueron procesadas mediante técnicas histológicas convencionales; el colágeno I se identificó con la técnica histoquímica de picro rojo sirio.



**Figura 16: Nifurtimox no induce fragmentación de DNA en explantes de vellosidades coriónicas**

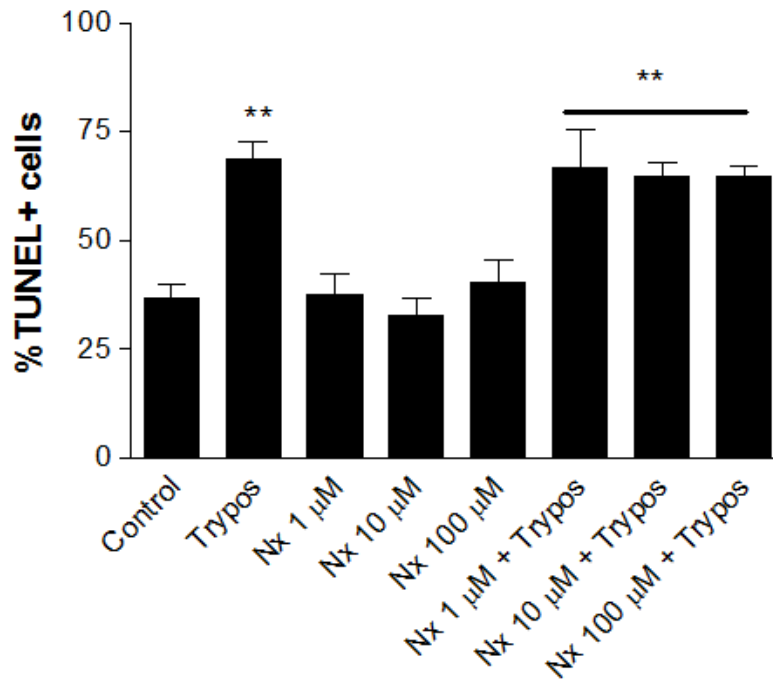
Se incubaron vellosidades coriónicas sin parásitos (A-C) y con 1 (D-F), 10 (G-I) y 100 (J-L)  $\mu\text{M}$  de Nx, respectivamente durante 24 horas. No se observan diferencias respecto a la inducción de células TUNEL + en las vellosidades coriónicas tratadas con Nx (D-L) respecto a las controles (A-C). Las vellosidades coriónicas fueron procesadas con el método de TUNEL (kit Promega) y la tinción nuclear se realizó con DAPI. . A, D, G, J corresponden a contraste de fase; B, E, H, K corresponde a tinción nuclear con DAPI; C, F, I, L corresponde a detección de células TUNEL+.





**Figura 17: *Trypanosoma cruzi* induce fragmentación de DNA en las vellosidades coriónicas, el que no es prevenido por Nifurtimox**

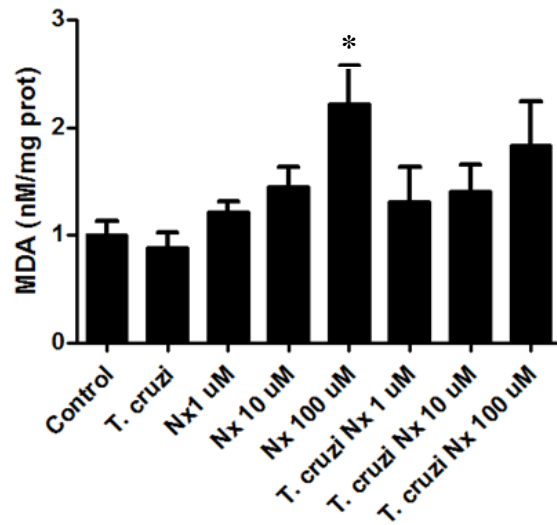
Vellosidades coriónicas humanas fueron incubadas durante 24 horas con  $10^6$  tripomastigotes cepa DM28c (A-C) y en presencia de 1 (D-F), 10 (G-I) y 100 (J-L)  $\mu\text{M}$  de Nz.. Las vellosidades coriónicas incubadas con el parásito y tratadas con Nx muestran un aumento similar de las células TUNEL+ que las vellosidades infectadas sólo con el parásito. Las vellosidades coriónicas fueron procesadas para el método de TUNEL (kit Promega) y el contraste nuclear se realizó con DAPI. . A, D, G, J corresponden a contraste de fase; B, E, H, K corresponde a tinción nuclear con DAPI; C, F, I, L corresponde a detección de células TUNEL+.



**Figura 18: Nifurtimox no induce un aumento de células TUNEL+, sin embargo no es capaz de prevenir la inducción de células TUNEL+ en vellosidades coriónicas incubadas con *Trypanosoma cruzi***

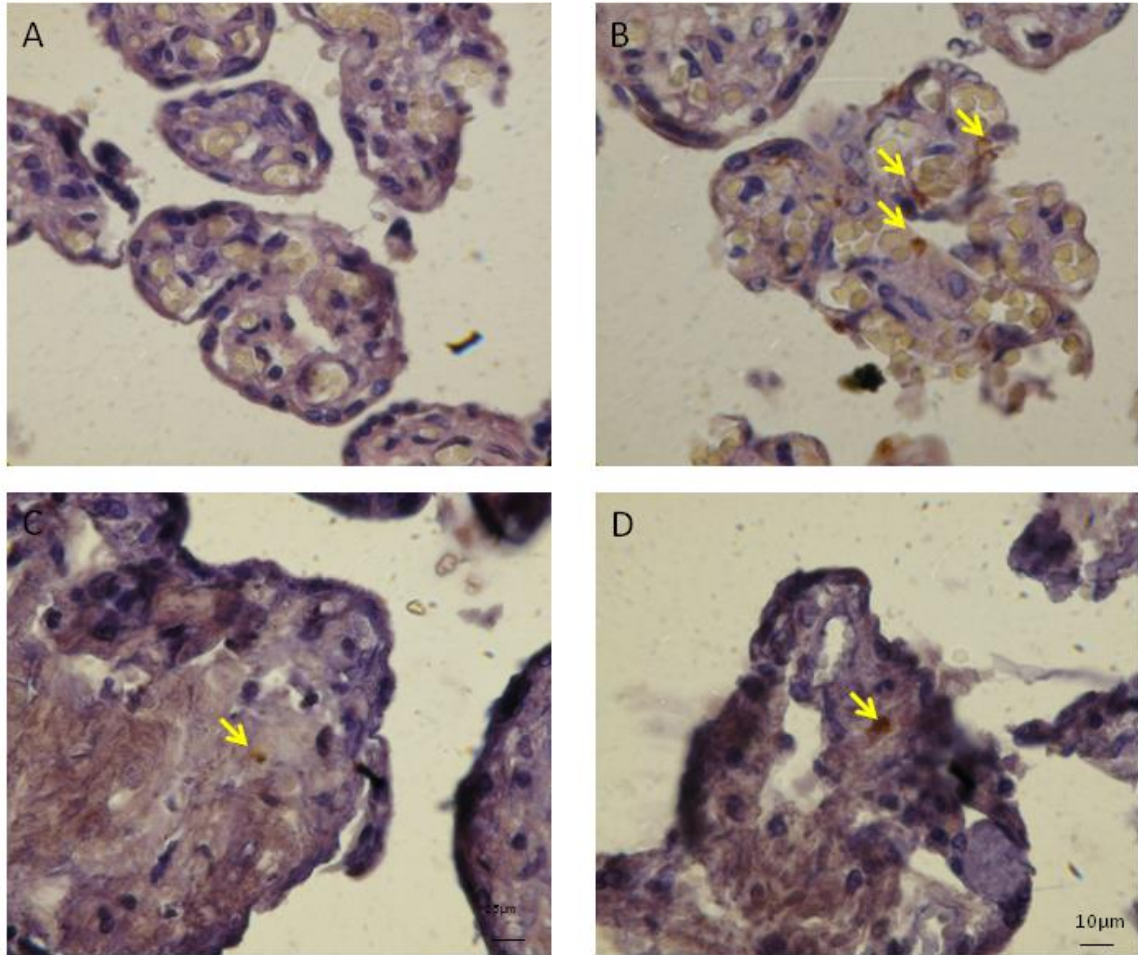
Vellosidades coriónicas fueron incubadas durante 24 horas en ausencia y presencia de  $10^6$  tripomastigotes cepa DM28c y en ausencia y presencia de 1, 10 y 100  $\mu\text{M}$  de Nx. Vellosidades coriónicas infectadas con el parásito sólo y en presencia de Nx inducen un aumento estadísticamente significativo de células TUNEL+,  $p \leq 0,001$  (\*\*)





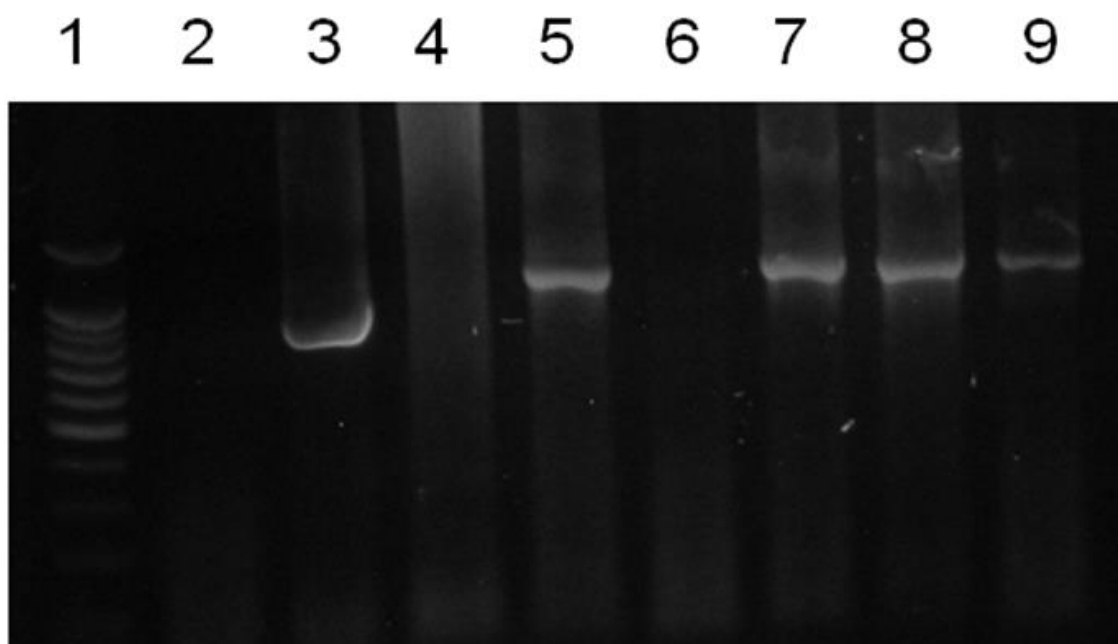
**Figura 19: Nifurtimox y *Trypanosoma cruzi* no inducen lipoperoxidación en las vellosidades coriónicas humanas.**

Las vellosidades coriónicas humanas incubadas en presencia y ausencia de  $10^6$  tripomastigotes y con distintas concentraciones de Nifurtimox (1, 10 y 100  $\mu\text{M}$ ). Solamente las vellosidades coriónicas tratadas, en ausencia del parásito, con la más alta concentración de Nx ensayada (100  $\mu\text{M}$ ) presentan un aumento en la producción de MDA ( $p \leq 0,05$ )(\*) respecto al control. Se utilizó Malondialdehído (MDA) como marcador de lipoperoxidación. El MDA fue separado en una columna C-18 con una fase móvil de 50% metanol y 50% de tampón fosfato 25 mM pH 6,5. El MDA fue evidenciado mediante un detector de fluorescencia a 553 nm.



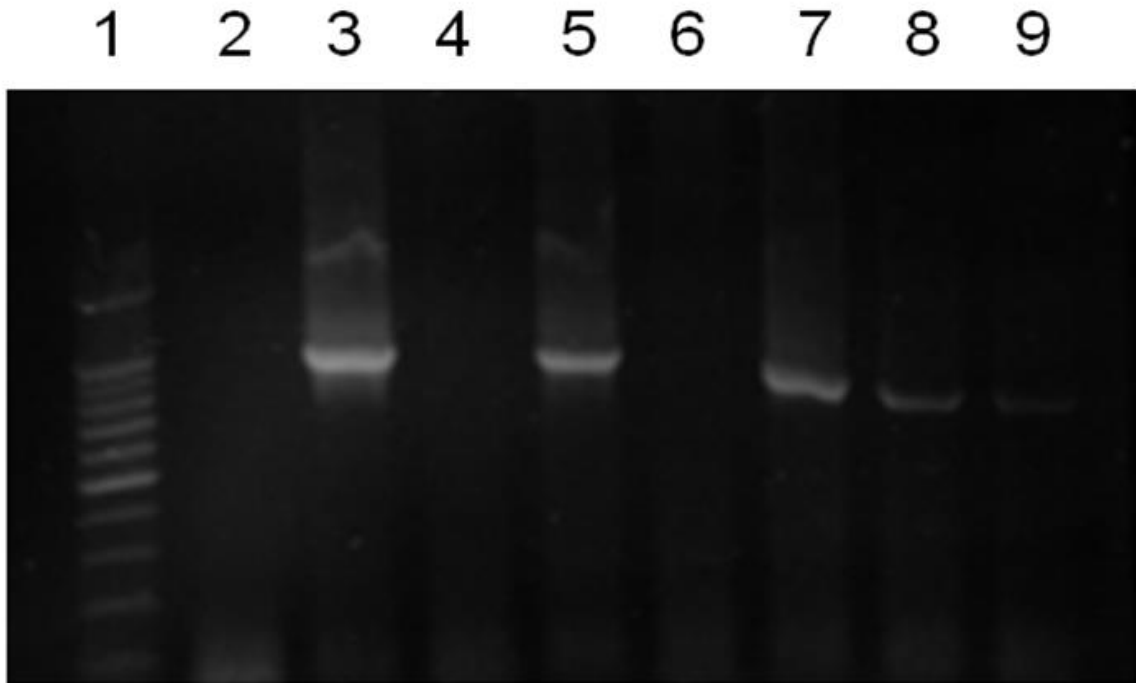
**Figura 20: Ninguna de las drogas es capaz de eliminar a *Trypanosoma cruzi* en vellosidades coriónicas infectadas *ex vivo* con el parásito:**

Vellosidades coriónicas fueron incubadas durante 24 horas en ausencia (A) y presencia (B-D) de  $10^6$  tripomastigotes de la cepa DM28c y en presencia de 200  $\mu\text{M}$  de Bz (C) o 100  $\mu\text{M}$  de Nx (D). En todas las muestras que fueron incubadas con el parásito (B-D) es posible detectar antígenos parasitarios (Ac anti-cruzipaína, dilución 1:2000 v:v) a pesar de la incubación con las concentraciones más altas de ensayadas de Bz (C) y Nx (D). Las vellosidades coriónicas fueron procesadas mediante técnicas inmunohistoquímicas convencionales y la reacción antígeno anticuerpo fue revelado con DAB.



**Figura 21: Benznidazol no elimina al parásito en las vellosidades coriónicas humanas infectadas *ex vivo* con *Trypanosoma cruzi***

Vellosidades coriónicas fueron incubadas durante 24 horas en ausencia y presencia de  $10^6$  tripomastigotes de la cepa DM28c y en ausencia y presencia de 2, 20 y 200  $\mu\text{M}$  de Bz. Se amplificaron fragmentos mediante la técnica de PCR del gen codificante para la endonucleasa NL1Tc de *T. cruzi*, amplificando un fragmento de 984 pares de bases. Los partidores usados fueron: Sentido 5'-GGGGTACCATGGAGCCATTTACATGGCTG-3' y antisentido 5'-CCCAAGCTTTATAAGCGCTCTCGTGAAAGC-3'. Los amplificados de DNA se separaron en geles de agarosa al 1% y se tiñeron con bromuro de etidio. Carriles: Marcador de peso molecular, 2) Control negativo PCR sin DNA molde, 3) DNA de epimastigote, 4) DNA de placenta sana, 5) DNA de placenta infectada con  $10^6$  tripomastigotes cepa DM28c, 6) DNA de placenta incubada con Bz 200  $\mu\text{M}$ , 7) DNA de placenta infectada con  $10^6$  tripomastigotes cepa DM28c e incubada con Bz 2  $\mu\text{M}$ , 8) DNA de placenta infectada con  $10^6$  tripomastigotes cepa DM28c e incubada con Bz 20  $\mu\text{M}$ , DNA de placenta infectada con  $10^6$  tripomastigotes cepa DM28c e incubada con Bz 200  $\mu\text{M}$ .



**Figura 22: Nifurtimox no elimina en las vellosidades coriónicas humanas infectadas *ex vivo* con *Trypanosoma cruzi***

Vellosidades coriónicas fueron incubadas durante 24 horas en ausencia y presencia de  $10^6$  tripomastigotes de la cepa DM28c y en ausencia y presencia de 1, 10 y 100  $\mu\text{M}$  de Nx. Se amplificaron fragmentos mediante la técnica de PCR del gen codificante para la endonucleasa NL1Tc de *T. cruzi*, amplificando un fragmento de 984 pares de bases. Los partidores usados fueron: Sentido 5'-GGGGTACCATGGAGCCATTTACATGGCTG-3' y antisentido 5'-CCCAAGCTTTATAAGCGCTCTCGTGAAAGC-3'. Los amplificados de DNA se separaron en geles de agarosa al 1% y se tiñeron con bromuro de etidio. Carriles: Marcador de peso molecular, 2) Control negativo PCR sin DNA molde, 3) DNA de epimastigote, 4) DNA de placenta sana, 5) DNA de placenta infectada con  $10^6$  tripomastigotes cepa DM28c, 6) DNA de placenta incubada con Nx 100  $\mu\text{M}$ , 7) DNA de placenta infectada con  $10^6$  tripomastigotes cepa DM28c e incubada con Nx 1  $\mu\text{M}$ , 8) DNA de placenta infectada con  $10^6$  tripomastigotes cepa DM28c e incubada con Nx 10  $\mu\text{M}$ , DNA de placenta infectada con  $10^6$  tripomastigotes cepa DM28c e incubada con Nx 100  $\mu\text{M}$ .

## BIBLIOGRAFÍA

**ABBASI, M.; KOWALEWSKA-GROCHOWSKA, K.; BAHAR, MA.; KILANI, RT.; WINKLER-LOWEN, B.; GUILBERT, LJ.** 2003. Infection of placental trophoblasts by *Toxoplasma gondii*. *J Infect Dis.*188(4):608-16.

**ALBERTS, B.; JOHNSON, A.; LEWIS J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WALTER, P.** 2008. *Molecular biology of the cell*; Fifth Edition; Garland science; New York. 1601p.

**ALONSO-VEGA, C.; HERMANN, E.; TRUYENS, C.; RODRIGUEZ, P.; TORRICO, MC.; TORRICO, F.; CARLIER, Y.** 2005. Immunological status of mothers infected with *Trypanosoma cruzi*. *Rev Soc Bras Med Trop.* 38 2:101-4.

**ALTEMANI, AM.; BITTENCOURT, AL.; LANA, AM.** 2000. Immunohistochemical characterization of the inflammatory infiltrate in placental chagas' disease: A qualitative and quantitative analysis. *Am J. Trop. Med. Hyg.* 62(2): 319-324.

**AMINO, R.; MARTINS, R.M.; PROCOPIO, J.; HIRATA, I.Y.; JULIANO, M.A.; TRIALYSIN,** 2002. A novel pore-forming protein from saliva of hematophagous insects activated by limited proteolysis. *J Biol Chem.* 277:6207-6213.

**ANDRADE, S.G.** 1982. The influence of the strain of *Trypanosoma cruzi* in placental infections in mice. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 76:123-8.

**ANDRADE, L.O.; ANDREWS, N.W.** 2005. The *Trypanosoma cruzi*-host-cell interplay: location, invasion, retention. *Nat Rev Microbiol.* 3(10):819-23.

**APT, W.** 1999. Tratamiento de la Enfermedad de Chagas. *Parasitol al Día.* 23:100-112.

**BELKACEMI, L; CHEN, C.H.; ROSS, M.G; DESAI, M.** 2009. Increased placental apoptosis in maternal food restricted gestations: role of the Fas pathway. *Placenta.*30(9):739-51.

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

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

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

**BOCK, M.; GONNERT, R.; HABERKORN, A.** 1969. Studies with Bay 2502 in animals. *Bol Chile Parasit.* 24:13-16.

**BOIANI, M.; PIACENZA, L.; BOIANI, L.; CERECETTO, H.; GONZÁLEZ, M.; DENICOLA, M.** 2010. Mode of action of Nifurtimox and N-oxide-containing heterocycles against *Trypanosoma cruzi*: Is oxidative stress involved? *Biochem Pharmacol.* 15;79(12):1736-45.

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

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

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

**CHAGAS, C.** 1909. Nova tripanosomiase humana. Estudos sobre a morfología e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi* n.gen, n.sp., agente etiológico do nova entidade mórbida do homen. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 1:159-218.

**CHAN, G.; GUILBERT, L.J.** 2006. Ultraviolet-inactivated human cytomegalovirus induces placental syncytiotrophoblast apoptosis in a Toll-like receptor-2 and tumour necrosis factor-alpha dependent manner. *J Pathol.* 210(1):111-20.

**CLARK, D.; ALBRECHT, M.; AREVALO, J.** 1994. Ascorbate variations and dehydroascorbate reductase activity in *Trypanosoma cruzi* epimastigotes and trypomastigotes. *Mol Biochem Parasitol.* 66(1):143-5.

**CORREA, D.; CAÑEDO-SOLARES, I.; ORTIZ-ALEGRÍA, L.B.; CABALLERO-ORTEGA, H.; RICO-TORRES, C.P.** 2007. Congenital and acquired toxoplasmosis: diversity and role of antibodies in different compartments of the host. *Parasite Immunol.* 29(12):651-60.

**COURA, J.R.** 2007. Chagas disease: what is known and what is needed: a background article. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 102 1:113-22.

**CROCKER, I.P.; TANNER, O.M.; MYERS, J.E.; BULMER, J.N.; WALRAVEN, G.; BAKER, P.N.** 2004. Syncytiotrophoblast Degradation and the Pathophysiology of the Malaria-infected Placenta. *Placenta* 25: 273–282.

**CROSS, J.C.** 2006. Placental function in development and disease. *Reprod Fertil Dev.* 18(1-2):71-6.

**DE SOUZA, E.M.; ARAUJO, JORGE; BAILLY, C.; LANSIAUX, A.; BATISTA M.M.; OLIVEIRA, G.M.; SOEIRO, M.N.** 2003. Host and parasite apoptosis following *Trypanosoma cruzi* infection *in vitro* and *in vivo* models. *Cell and Tissue Research*, 314, 223–235.

**DE SOUZA, E.M.; MEUSER-BATISTA, M.; BATISTA, D.G.; DUARTE, B.B.; ARAÚJO-JORGE, T.C.; SOEIRO, M.N.C.** 2008. Trypanosoma cruzi: Alpha-2-macroglobulin regulates host cell apoptosis induced by the parasite infection *in vitro*. *Experimental Parasitology.* 118: 331–337.

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

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

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

**DOSREIS, G.A.; LOPES, M.** 2001. The importance of apoptosis for immune regulation in Chagas disease. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 104: 259-262.

**DUASO, J.; ROJO, G.; CABRERA, G.; GALANTI, N.; BOSCO, C.; MAYA, J.D.; MORELLO, A. AND KEMMERLING, U.** 2010. Trypanosoma cruzi induces tissue disorganization and destruction of chorionic villi in an *ex vivo* infection model of human placenta. *Placenta.* 31 (8) 705-11.

**DUASO, J.** 2010. *Trypanosoma cruzi* induce desorganización tisular en vellosidades coriónicas placentarias humanas en un modelo de infección *ex vivo*. Memoria título Médico Veterinario. Santiago, Chile. U. Chile, Fac. Cias. Veterinarias y Pecuarias. 81p

**EATON, D.L.** 2000. Biotransformation enzyme polymorphism and pesticide susceptibility. *Neurotoxicology.* 21(1-2):101-11.

**ESTRELA, J.M.; ORTEGA, A.; OBRADOR, E.** 2006. Glutathione in cancer biology and therapy. *Crit Rev Clin Lab Sci.* 43(2):143-81.

**FAIRLAMB, A.H.; CERAMI, A.** 1985. Identification of a novel, thiol-containing co-factor essential for glutathione reductase enzyme activity in trypanosomatids. *Mol Biochem Parasitol.* 14(2):187-98.

**FRIEDMAN, J.F.; MITAL, P.; KANZARIA, H.K.; OLDS, G.R.; KURTIS, J.D.** 2007. Schistosomiasis and pregnancy. *Trends Parasitol.* 23(4):159-64.

**FRISCH, S.M.; FRANCIS, H.** 1994. Disruption of epithelial cell-matrix interactions induces apoptosis. *J. Cell Biol.* 124, 619-626.

**FUKUNAGA, K.; YOSHIDA, M. AND NAKAZONO, N.** 1998. A Simple, Rapid, Highly Sensitive and Reproducible Quantification Method for Plasma Malondialdehyde by High-Performance Liquid Chromatography. *Biomed. Chromatogr.* 12, 300–303

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

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

**GORLA, N.B.; LEDESMA, O.S.; BARBIERI, G.P.; LARRIPA, I.B.** 1989. Thirteen fold increase of chromosomal aberrations non-randomly distributed in chagasic children treated with nifurtimox. *Mutation Res.* 224:263-267.

**GRIFFITH, O.W.; MULCAHY, T.** 1999. The enzymes of glutathione synthesis: gamma glutamylcysteine synthetase. *Adv. Enz. Relat. Areas Mol Biol.* 73:209-67.

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

**GUPTA, S.** 2001. Molecular steps of death receptor and mitochondrial pathways of apoptosis. *Life Sci.* 69, 2957-2964.

**GUTTERIDGE, J.M.; HALLIWELL, B.** 2000. Free radicals and antioxidants in the year 2000. A historical look to the future. *Ann NY Acad Sci.* 899:136-47.

**HALLIWELL, B.** 1999. Antioxidant defence mechanisms: from the beginning to the end (of the beginning). *Free Radic Res.* 31(4):261-72.

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



- HAYES, J.D.; MCLELLAN, L.I.** 1999. Glutathione and glutathione-dependent enzymes represent a co-ordinately regulated defence against oxidative stress. *Free Radic Res.* 31(4):273-300.
- HENGARTNER, M.O.** 2000. The biochemistry of apoptosis. *Nature.* 407, 770-776.
- HERMANN, E.; TRUYENS, C.; ALONSO-VEGA, C.; EVEN, J.; RODRIGUEZ, P.; BERTHE, A.; GONZALEZ-MERINO, E.; TORRICO, F.; CARLIER, Y.** 2002. Human fetuses are able to mount an adultlike CD8 T-cell response. *Blood.* 100(6):2153-8.
- HERMANN, E.; TRUYENS, C.; ALONSO-VEGA, C.; RODRIGUEZ, P.; BERTHE, A.; TORRICO, F.; CARLIER, Y.** 2004. Congenital transmission of *Trypanosoma cruzi* is associated with maternal enhanced parasitemia and decreased production of interferon- gamma in response to parasite antigens. *J Infect Dis.* 189(7):1274-81.
- HERMANN, E.; ALONSO-VEGA, C.; BERTHE, A.; TRUYENS, C.; FLORES, A.; CORDOVA, M.; MORETTA, L.; TORRICO, F.; BRAUD, V.; CARLIER, Y.** 2006. Human congenital infection with *Trypanosoma cruzi* induces phenotypic and functional modifications of cord blood NK cells. *Pediatr Res.* 60(1):38-43
- HEUSSLER, V.T; KÜENZI, P.; ROTTENBERG, S.** 2001 Inhibition of apoptosis by intracellular protozoan parasites. *Int J Parasitol.* 31(11):1166-76.
- ISMAIL, S.O.; PARAMCHUK, W.; SKEIKY, Y.A.; REED, S.G.; BHATIA, A.; GEDAMU, L.** 1997. Molecular cloning and characterization of two iron superoxide dismutase cDNAs from *Trypanosoma cruzi*. *Mol Biochem Parasitol.* 86(2):187-97.
- JAMISON, D.; BREMAN, J.; MEASHAM, A.; MUSGROVE, P.** 2006. Tropical Diseases Targeted for Elimination: Chagas Disease, Lymphatic Filariasis, Onchocerciasis, and Leprosy. In: *Disease Control Priorities in Developing Countries, DCPD; World Bank.* 1400p.
- JUNQUEIRA, L.C. AND CARNEIRO, J.** 2005. *Basic Histology: Text and Atlas* 11 edition McGraw-Hill Company. 501p.
- KEMMERLING, U.; BOSCO C. AND GALANTI, N.** 2010. Infection and invasion mechanism of *Trypanosoma cruzi* in the congenital transmission of Chagas' disease: A proposal. *Biol res.* 43:307-316.
- KEPPLER, D.** 1999. Export pumps for glutathione S-conjugates. *Free Radic Biol Med.* 27(9-10):985-91.
- KIERNAN, J.A.** 2008. *Histological and histochemical methods : theory and practice*, fourth edition. Scion publishing Ltd. Oxfordshire, UK. 606p

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

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

**KRAUTH-SIEGEL, R.L.; COOMBS, G.H.** 1999. Enzymes of parasite thiol metabolism as drug targets. *Parasitol Today.* 15(10):404-9.

**KROEMER, G.; GALLUZZI, L.; VANDENABEELE, P.; ABRAMS, J.; ALNEMRI, E.S.; BAEHRECKE, E.H.; BLAGOSKLONNY, M.V.; EL-DEIRY, W.S.; GOLSTEIN, P.; GREEN, D.R.; HENGARTNER, M.; KNIGHT, R.A.; KUMAR, S.; LIPTON, S.A.; MALORNI, W.; NUÑEZ, G.; PETER, M.E.; TSCHOPP, J.; YUAN, J.; PIACENTINI, M.; ZHIVOTOVSKY, B. y MELINO, G.** 2009. Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009. *Cell Death and Differentiation.* 16, 3–11.

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

**LETELIER, P.** 2004. Estudio de crecimiento y contenido de tioles libres en epimastigotes de *Trypanosoma cruzi* tratados con butionina sulfoximia. Tesis para optar al título de Químico Farmacéutico, Santiago, Chile. Universidad de Chile, Facultad de de Ciencias Químicas y Farmacéuticas. 51p.

**LETELIER, M.E; MARTINEZ, M.; GONZALEZ-LIRA, V.; FAUNDEZ, M.; ARACENA-PARKS, P.** 2006. Inhibition of cytosolic glutathione S-transferase activity from rat liver by copper. *Chem Biol Interact.* Dec 1;164(1-2):39-48.

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

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

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

- LUJÁN, CD.; TRIQUEL, MF.; SEMBAJ, A.; GUERRERO, CE.; FRETES, RE.** 2004. *Trypanosoma cruzi*: productive infection is not allowed by chorionic villous explant from normal human placenta in vitro. *Exp Parasitol.* 108(3-4):176-81.
- MARGONO, F.; MROUEH, J.; GARELY, A.; WHITE, D.; DUERR, A.; MINKOFF, HL.** 1994. Resurgence of active tuberculosis among pregnant women. *Obstet Gynecol.* 83(6):911-4.
- MASON, R.P. AND HOLTZMAN, J.L.** 1975. The role of catalytic superoxide formation in the O<sub>2</sub> inhibition of nitroreductase *Biochem Biophys Res Commun.* 67(4):1267-74.
- MAYA, J.D.; CASSELS, B.K.; ITURRIAGA-VÁSQUEZ, P.; FERREIRA, J.; FAÚNDEZ, M.; GALANTI, N.; FERREIRA, A.; MORELLO, A.** 2006 Mode of action of natural and synthetic drugs against *Trypanosoma cruzi* and their interaction with the mammalian host *Comparative Biochemistry and Physiology, Part A* 146, 601–620.
- MAYA, J.D.; REPETTO, Y.; AGOSIN, M.; OJEDA, J.M.; TELLEZ, R.; GAULE, C. AND MORELLO A.** 1997. Effects of Nifurtimox and Benznidazole upon glutathione and trypanothione in epimastigote, trypomastigote and amastigote forms of *Trypanosoma cruzi*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 86, 101-106. 108.
- MAZUR, L.** 2000. Radioprotective effects of the thiols GSH and WR-2721 against X-ray-induction of micronuclei in erythroblasts. *Mutat Res.* 468(1):27-33.
- MEHLOTRA, RK.** 1996. Antioxidant defense mechanisms in parasitic protozoa. *Crit Rev Microbiol.* 22(4):295-314.
- MEZZANO, L.; SARTORI, MJ.; LIN, S.; REPOSSI, G.; DE FABRO, SP.** 2005 Placental alkaline phosphatase (PLAP) study in diabetic human placental villi infected with *Trypanosoma cruzi*. *Placenta.* 26(1):85-92.
- MOORE, K.L.; PERSEAUD, T.V.N.;** 2004. *The Developing Human, Clinically Oriented Embryology* 7° edition Elsevier. 522p.
- MORELLO, A.; LETELIER, M.E.; ALDUNATE, J.; REPETTO, Y.** 1987. Enfermedad de Chagas, biotransformación de xenobióticos por el *Trypanosoma cruzi*. In: *Estudios en honor de Gustavo Hoecker.* Auch 14: 33-48.
- MORELLO, A.; LIPCHENCA, I.; CASSELS, B. K.; SPEISKY, H.; ALDUNATE, J.; AND REPETTO, Y.** 1994. Trypanocidal effect of boldine and related alkaloids upon several strains of *Trypanosoma cruzi*. *Comp. Biochem. Physiol. Pharmacol. Toxicol. Endocrinol.* 107, 367-371.

**MORENO, S.N.; DOCAMPO, R.; MASON, R.P.; LEON, W. AND STOPPANI, A.O.** 1982. Different behaviors of Benznidazole as free radical generator with mammalian and *Trypanosoma cruzi* microsomal preparations. Arch Biochem Biophys. 218(2):585-91.

**MURIEL, P.** 1997. Peroxidation of lipids and liver damage. En: Oxidants, antioxidants and free radicals. (S.I. Baskin y H.Salem, Eds.). Taylor and Francis, Washington, pp. 237-239.

**NAITO, M.; NAGASHIMA, K.; MASHIMA, T.; AND TSURUO, T.** 1997. Phosphatidylserine externalization is a downstream event of interleukin-1 beta-converting enzyme family protease activation during apoptosis. Blood 89, 2060-2066.

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

**NOGUEIRA, F.B.; KRIEGER, M.A.; NIRDE, P.; GOLDENBERG, S.; ROMANHA, A.J.; MURTA, S.M.** 2006. Increased expression of iron-containing superoxide dismutase-A (TcFeSOD-A) enzyme in *Trypanosoma cruzi* population with in vitro-induced resistance to benznidazole. Acta Trop. 100(1-2):119-32.

**OKADA, Y.; MAENO, E.** 2001. Apoptosis, cell volume regulation and volume-regulatory chloride channels. Comp Biochem. Physiol A Mol. Integr. Physiol. 130: 377-383.

**PIACENZA, L.; IRIGOIN, F.; ALVAREZ, M.N.; PELUFFO, G.; TAYLOR, M.C.; KELLY, J.M.; WILKINSON, S.R.; RADI, R.** 2007. Mitochondrial superoxide radicals mediate programmed cell death in *Trypanosoma cruzi*: cytoprotective action of mitochondrial iron superoxide dismutase overexpression. Biochem J. 403(2):323-34.

**POLAK, A.; RICHLE R.** 1978. Mode of action of the 2-nitroimidazole derivative Benznidazole. Ann Trop Med Parasitol. 72(1):45-54.

**POURAHMAD, J., O'BRIEN, P.J.** 2000. A comparison of hepatocyte cytotoxic mechanisms for Cu<sup>2+</sup> and Cd<sup>2+</sup>. Toxicology. 143(3):263-73.

**PRATA, A.** 2001. Clinical and epidemiological aspects of Chagas disease. Lancet Infect Dis. 1(2):92-100.

**RAGHUPATHY, R.; KALINKA, J.** 2008 Cytokine imbalance in pregnancy complications and its modulation. Front Biosci. 1;13:985-94.

**RAGHUPATHY R.** 2001. Pregnancy: success and failure within the Th1/Th2/Th3 paradigm. Semin Immunol. 13(4):219-27.

- RAZIK, M.A.; CIDLOWSKI, J.A.** 2002. Molecular interplay between ion channels and the regulation of apoptosis. *Biol. Res.* 35: 203-207.
- ROCHA, G.; MARTINS, A.; GAMA, G.; BRANDÃO, F.; ATOUGUIA, J.** 2004. Possible cases of sexual and congenital transmission of sleeping sickness. *Lancet.* 17;363(9404):247.
- RODRIGUES-COURA, J.; L. DE CASTRO, S.** 2002. A Critical Review on Chagas Disease Chemotherapy. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro.* 97(1): 3-24.
- ROGERSON, S.J.; HVIID, L.; DUFFY, P.E.; LEKE, R.F.; TAYLOR, D.W.** 2007. Malaria in pregnancy: pathogenesis and immunity. *Lancet Infect Dis.* 7(2):105-17
- SARTORI, M.J.; MEZZANO, L.; LIN, S.; REPOSSI, G.; FABRO, S.P.** 2005. Cellular components and placental alkaline phosphatase in *Trypanosoma cruzi* infection. *Rev Soc Bras Med Trop.* 38 Suppl 2:87-91.
- SARTORI, M.J.; PONS, P.; MEZZANO, L.; LIN, S.; DE FABRO, S.P.** 2003 *Trypanosoma cruzi* infection induces microfilament depletion in human placenta syncytiotrophoblast. *Placenta.* 24(7):767-71.
- SCHARFSTEIN, J.; MORROT, A.** 1999. A role for extracellular amastigotes in the immunopathology of Chagas disease. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 94(1):51-63.
- SCHMUNIS GA.** 2007. Epidemiology of Chagas disease in non-endemic countries: the role of international migration. *Mem Inst Oswaldo Cruz.*102(1):75-85.
- SHIPPEY, S.H.; ZAHN, C.M.; CISAR, M.M.; WU, T.J.; SATIN, A.J.** 2005. Use of the placental perfusion model to evaluate transplacental passage of *Trypanosoma cruzi*. *Am J Obstet Gynecol.* 192(2):586-91.
- SHIVERICK KT, SLIKKER W JR, ROGERSON SJ, MILLER RK.** 2003. Drugs and the placenta--a workshop report. *Placenta.* 24 A:S55-9.
- SIES, H.** 1999. Glutathione and its role in cellular functions. *Free Radic Biol Med.* 27(9-10):916-21.
- SOARES, M.B.; PONTES-DE-CARVALHO, L.; RIBEIRO-DOS-SANTOS, R.** 2001. The pathogenesis of Chagas' disease: when autoimmune and parasite-specific immune responses meet. *An Acad Bras Cienc* 73:547-559.
- SPERANDIO, S.; DE, BELLE I. AND BREDESEN, D.E.** 2000. An alternative, nonapoptotic form of programmed cell death. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 97: 14376-14381.
- STOPANI, A.O.** 1999. The chemotherapy of Chagas disease. *Medicina* 2:147-65.

**SYME, M.R.; PAXTON, J.W.; KEELAN, J.A.** 2004. Drug transfer and metabolism by the human placenta. *Clin Pharmacokinet.* 43(8):487-514.

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

**TEMPERTON, N.J., WILKINSON, S.R., MEYER, D.J. AND KELLY, J.M.** 1998 Overexpression of superoxide dismutase in *Trypanosoma cruzi* results in increased sensitivity to the trypanocidal agents gentian violet and Benznidazole. *Mol Biochem Parasitol.* 96(1-2):167-76.

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

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

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

**URBINA, J.A.; PAYARES, G.; SANOJA, C.; LIRA, R. Y ROMANHA, A.J.** 2003 In vitro and in vivo activities of ravuconazole on *Trypanosoma cruzi*, the causative agent of Chagas disease. *Int J Antimicrob Agents.* 21(1):27-38.

**URBINA, J.A.; DOCAMPO, R.,** 2003. Specific Chemotherapy of Chagas disease: controversies and advances. *Trends in Parasitology.* 19(11):495-501.

**URSINI, F.; MAIORINO, M.; SEVANI, A.;** 1991. Membrane hidroperoxides. In: Sies, H. (Ed.). *Oxidative stress: Oxidants and antioxidants.* Londres, Inglaterra. Academic press, pp.319-36.

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

**WILKINSON, S.R; PRATHALINGAM, S.R; TAYLOR, M,C; HORN, D.; KELLY, J.M.** 2005. Vitamin C biosynthesis in trypanosomes: a role for the glycosome. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 102(33):11645-50.

**WORLD HEALTH ORGANIZATION.** 2002. Control of Chagas' disease. Report of the WHO Expert Committee. *World Health Organ Tech Rep Series.* 905:i-vi, 1-109.

**ZAHOOR, A.; LAFLEUR, M.V.; KNIGHT, R.; LOMAN, H.; EDWARDS, D.I.** 1987  
DNA damage induced by reduced nitroimidazole drugs. *Biochem Pharmacol.*  
36(19):3299-304.

**ZIMMERMANN, K.C.; BONZON, C.; GREEN, D.R.** 2001A. The machinery of  
programmed cell death. *Pharmacol. Ther.* 92: 57-70.

**ZIMMERMANN, K.C.; GREEN, D.R.** 2001b. How cells die: apoptosis pathways. *J.*  
*Allergy Clin. Immunol.* 108: S99-103.



## **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 posteriores 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 2008

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

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

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

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

Investigador:

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

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

**Conclusión:**

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

Nombre del sujeto

Firma

Fecha

Nombre de informante

Firma

Fecha

*Ulrike Kemmerling*  
Nombre del investigador

*Ulrike Kemmerling*  
Firma

*26/6/08*  
Fecha

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

## ANEXO 2



UNIDAD DE BIOSEGURIDAD  
FACULTAD DE MEDICINA  
UNIVERSIDAD DE CHILE

Santiago, 30 de Abril 2008.-

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

Estimados señores

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

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

Tomé conocimiento: Profesora **Ulrike Kemmerling Weis**

**Profesora Mónica 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



UNIVERSIDAD DE CHILE  
FACULTAD DE MEDICINA

COMITÉ DE ÉTICA DE INVESTIGACIÓN EN SERES HUMANOS

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



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

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

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

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

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

*El Comité revisó los siguientes documentos del estudio:*

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

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





UNIVERSIDAD DE CHILE  
FACULTAD DE MEDICINA

### COMITÉ DE ÉTICA DE INVESTIGACIÓN EN SERES HUMANOS



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

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

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

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

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

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

Notificación oportuna de reacciones adversas: No es necesaria.

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

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

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



UNIVERSIDAD DE CHILE  
FACULTAD DE MEDICINA

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

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

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

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

25 JUN. 2008

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

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