



UNIVERSIDAD DE CHILE



FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS
ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS

PARTICIPACIÓN DE PROTEINAQUINASAS ACTIVADAS
POR MITÓGENOS ERK1/2 Y FOSFOLIPASA C GAMMA
DURANTE LA INFECCIÓN *EX VIVO* DE
VELLOSIDADES CORIÓNICAS HUMANAS CON
TRYPANOSOMA CRUZI

ARTURO RODRIGO VILLARROEL CORDOVA

Memoria para optar al Título Profesional
de Médico Veterinario

Departamento de Medicina Preventiva
Animal

PROFESORA GUÍA: DRA. ULRIKE KEMMERLING

SANTIAGO, CHILE

2011

Financiamiento: Proyectos Bicentenario Anillo 112 y FONDECYT 11080166



UNIVERSIDAD DE CHILE



FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS
ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS

PARTICIPACIÓN DE PROTEINAQUINASAS ACTIVADAS POR MITÓGENOS ERK1/2 Y FOSFOLIPASA C GAMMA DURANTE LA INFECCIÓN *EX VIVO* DE VELLOSIDADES CORIÓNICAS HUMANAS CON *TRYPANOSOMA CRUZI*

ARTURO RODRIGO VILLARROEL CORDOVA

Memoria para optar al Título Profesional
de Médico Veterinario

Departamento de Medicina Preventiva
Animal

NOTA FINAL:

NOTA: FIRMA:

PROFESOR GUÍA:	ULRIKE KEMMERLING
PROFESOR CONSEJERO:	CLAUDIO ZUÑIGA
PROFESOR CONSEJERO:	MARIANA ACUÑA

Financiamiento: Proyectos Bicentenario Anillo 112 y FONDECYT 11080166

SANTIAGO, CHILE

2011

INDICE

RESUMEN	1
SUMMARY	2
INTRODUCCIÓN	3
REVISION BIBLIOGRÁFICA.....	4
Epidemiología.....	4
Ciclo de Vida del <i>Trypanosoma cruzi</i>	5
Vías de transmisión.....	7
Curso clínico de la Enfermedad de Chagas.....	8
Fase aguda	8
Fase de latencia o indeterminada.....	8
Fase crónica.....	9
Enfermedad de Chagas congénita	9
Placenta	9
Diagnóstico de la enfermedad de Chagas Congénita	10
Infección <i>ex vivo</i> de vellosidades coriónicas placentarias humanas con <i>T. cruzi</i>	11
Mecanismos de activación de vías de transducción de señales	11
HIPÓTESIS	14
OBJETIVO GENERAL	15
OBJETIVOS ESPECIFICOS	15
MATERIALES Y MÉTODOS	16
RESULTADOS.....	22
DISCUSIÓN	25
CONCLUSIONES	28
FIGURAS.....	29

Figura 1	Estimación de la población mundial infectada con <i>Trypanosoma cruzi</i> , 2009.....	29
Figura 2	Tasa de incidencia de la enfermedad de Chagas en Chile.	30
Figura 3	Ciclo de vida de <i>Trypanosoma cruzi</i>	31
Figura 4	Formas celulares de <i>Trypanosoma cruzi</i>	32
Figura 5	Barrera placentaria.....	33
Figura 6	Vía de transducción de señal PLC- γ	34
Figura 7	Vía de transducción de señales ERK1/2 MAPK.....	35
Figura 8	<i>T. cruzi</i> induce la activación de la vía PLC- γ en vellosidades coriónicas placentarias humanas infectadas <i>ex vivo</i>	36
Figura 9	<i>T. cruzi</i> induce la activación de la vía PLC- γ en vellosidades coriónicas placentarias humanas infectadas <i>ex vivo</i>	37
Figura 10	Modulación de la vía ERK1/2 MAPK por <i>T. cruzi</i> en vellosidades coriónicas placentarias humanas infectadas <i>ex vivo</i>	38
Figura 11	Modulación de la vía ERK1/2 MAPK por <i>T. cruzi</i> en vellosidades coriónicas placentarias humanas infectadas <i>ex vivo</i>	39
Figura 12	El uso de inhibidores de las vías de transducción de señales PLC- γ o ERK1/2 MAPK no impide la infección <i>ex vivo</i> de vellosidades coriónicas con <i>T. cruzi</i>	40
BIBLIOGRAFÍA.....		41
ANEXOS.....		48
ANEXO 1.....		48
ANEXO 2.....		50
ANEXO 3.....		51

RESUMEN

La enfermedad de Chagas congénita es causada por el parásito hemoflagelado *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*) que alcanza al feto atravesando la barrera placentaria.

Los mecanismos de infección e invasión tisular del parásito *T. cruzi* son poco conocidos. La invasión celular de *T. cruzi* induce la activación de vías de transducción de señales, las que se cuentan las vías PLC- γ (Fosfolipasa C- γ) y ERK1/2 (Señal extracelular regulada por quinasas) MAPK (Proteína quinasa activada por mitógenos) en el hospedero. La activación de estas vías se relaciona con la infectividad del parásito. Para estudiar la participación de estas vías de transducción de señales en la infección tisular, se incubaron explantes de vellosidades coriónicas humanas sanas en presencia y ausencia del parásito y en presencia y ausencia de inhibidores específicos de cada una de las vías. La infección exitosa de los explantes de vellosidades coriónicas humanas fue determinada por detección del parásito mediante PCR. Los efectos de la infección del parásito respecto a la modulación de las vías de transducción de señales se determinaron mediante métodos de Western Blot e inmunofluorescencia. Bajas concentraciones de *T. cruzi* inducen la activación de las vías de transducción de señales PLC- γ y ERK1/2 MAPK. Altas concentraciones de parásitos activan a la vía PLC- γ e inhiben a la vía ERK1/2 MAPK. Ninguno de los inhibidores de las vías de transducción de señales fue capaz de impedir la infección *ex vivo* de las vellosidades coriónicas humanas con *T. cruzi*.

Se concluye que ambas vías de transducción de señales son parte de una compleja “estrategia” de invasión celular de *T. cruzi*.

SUMMARY

Congenital Chagas disease is caused by the hemoflagellated protozoan *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*). This parasite is able to cross the placental barrier and infect the fetus.

The mechanism of tissue infection and invasion of the parasite are poorly understood.

During cell invasion, the parasite induces the activation of PLC- γ (Phospholipase C- γ) and ERK1/2 MAPK (Extracellular regulated kinase, mitogen activated kinase) pathways in the host cell. The activation of these pathways are related to the parasite's infectivity.

The aim of this study was to determine the participation of these signal pathways during *T. cruzi* tissue invasion.

Human placental chorionic villi explants were incubated in presence and absence of the parasite as well as in presence and absence of specific inhibitors of each pathway. The placental infection was confirmed by PCR. The participation of the signal transduction pathway was determined by western blotting and immunofluorescence.

Low parasite concentration induces the activation of PLC- γ y ERK1/2 MAPK pathways.

High parasite concentration also activates the PLC- γ pathway, but inhibits the ERK1/2 MAPK pathway. None of the signal transduction inhibitors were able to impair the *T. cruzi* *ex vivo* infection of the placental chorionic villi.

We conclude that both signal transduction pathways are part of a complex parasite cell invasion "strategy".

INTRODUCCIÓN

La Enfermedad de Chagas o Tripanosomiasis americana es producida por el protozoo hemoflagelado *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*) del orden Kinetoplastida, familia Trypanosomatidae. Este parásito presenta un ciclo de vida indirecto, que tiene a insectos hematófagos (triatominos), como vector biológico, y como hospederos vertebrados a mamíferos, incluido el hombre. En los últimos años la transmisión vectorial ha ido en descenso debido a distintos programas de control de vectores. Así, otras formas de transmisión, como la transmisión congénita, han adquirido mayor importancia epidemiológica.

Durante la transmisión congénita el parásito debe cruzar la barrera placentaria compuesta por trofoblasto, tejido conectivo fetal y láminas basales que rodean al endotelio de los vasos fetales y que separan al trofoblasto del tejido conectivo fetal. El modelo de infección *ex vivo* de vellosidades coriónicas placentarias con el parásito permite, además de estudiar los mecanismos de transmisión congénita, avanzar en el conocimiento sobre los mecanismos de infección e invasión tisular en general del parásito.

En esta memoria de título se estudió la participación de las vías de transducción de señales Fosfolipasa C gamma (PLC- γ) y proteína quinasa activada por mitógeno MAPK, específicamente la vía ERK1/2 MAPK (mitogen-activated protein kinases, serina-treonina quinasas), en los distintos componentes tisulares de las vellosidades coriónicas placentarias humanas durante la infección *ex vivo* con tripomastigotes de *Trypanosoma cruzi*, relacionando la activación de éstas vías con la infectividad del parásito. Se utilizaron metodologías de Inmunofluorescencia y Western Blot para la detección de la participación de las vías de transducción de señales, así como metodologías de biología molecular para detectar al parásito.

REVISION BIBLIOGRÁFICA

La enfermedad de Chagas es producida por el protozoo hemoflagelado *T. cruzi* (Chagas, 1909), orden Kinetoplastida, familia *Trypanosomatidae*. El parásito presenta un ciclo de vida indirecto y es transmitido por insectos hematófagos triatominos. Esta enfermedad está presente en el continente americano desde más de 9000 años (Aufderheide *et al.*, 2004) y fue descrita por primera vez por el médico brasileño Carlos Chagas (Chagas, 1909). Actualmente es una de las mayores preocupaciones en materia de salud pública en América Latina (Coura, 2007), siendo después de la malaria, la enfermedad ligada a vectores, de mayor prevalencia y mortalidad. La enfermedad se extiende desde el sur de EE.UU, hasta el sur de Argentina y Chile (**Figura 1**).

Epidemiología

En la actualidad, la enfermedad de Chagas afecta en el continente americano a 12.000.000 de personas aproximadamente; el principal vector doméstico, *Triatoma infestans*, ha sido controlado a un nivel tal que prácticamente no existe transmisión por su intermedio en Uruguay desde 1997, Chile desde 1999 y Brasil desde el año 2008; se ha mejorado la calidad de la vivienda en zonas de endemia chagásica y es así como en Chile, el “rancho chagásico” sólo existe en forma aislada (Apt *et al.*, 2009)

Actualmente, el número de nuevos casos por año es de aproximadamente 41.200 a los cuales la transmisión congénita contribuye con aproximadamente 14.300 casos (World Health Organization, 2007). Por ende, la transmisión congénita adquiere cada vez más importancia epidemiológica, siendo además parcialmente responsable del fenómeno de la “globalización de la enfermedad de Chagas” (Schmunis 2007).

Las tasas de incidencia de la enfermedad de Chagas se han mantenido relativamente constante entre los años 1995 y 2005 (**Figura 2**). En el último informe del Ministerio de Salud sobre la enfermedad de Chagas en Chile se concluye, que la notificación de esta patología va en aumento, debido básicamente a dos factores: (1) la notificación y tamizaje en donantes son obligatorios desde el año 1986 y 1996, respectivamente. (2) Mayor interés en la patología desde el año 1991, ya que países del Cono Sur han incentivado diversos programas de control de transmisión vectorial y transfusional (Olea, 1998).

En los países latinoamericanos, los costos directos e indirectos, incluyendo el gasto del tratamiento y la pérdida de productividad atribuible a la enfermedad de Chagas varían desde 40 a 800 millones de dólares por país cada año. Más aún, en su conjunto, Latinoamérica experimenta pérdidas económicas totales de 18.000 millones de dólares anuales como resultado de la temprana morbilidad y mortalidad asociada a esta patología (Parker y Sethi, 2011).

Las áreas endémicas en Chile comprenden desde la Región de Arica y Parinacota a la Región del Libertador Bernardo O'Higgins, incluyendo la Región Metropolitana, donde reside el 67% de la población del país. Aunque es una enfermedad de prevalencia rural y periurbana, la población expuesta en Chile correspondería a 850.000 personas (Olea, 1998).

Según la Organización Mundial de la Salud, las tasas de mortalidad varían entre 8 y 12% dependiendo del país estudiado, la edad, estado fisiológico de los pacientes y modalidad de tratamiento recibido (World Health Organization, 2002).

Debido al control de vectores (triatominos), los casos de enfermedad de Chagas nuevos por año en Latinoamérica han disminuido enormemente, desde aproximadamente 700.000 en el año 1990 a 41.000 en el 2006. Sin embargo, los casos de Chagas congénito en 2006 fueron 14.385, por lo que esta forma de transmisión adquiere cada vez más importancia epidemiológica, siendo parcialmente responsable de la globalización de la enfermedad de Chagas (World Health Organization, 2007; Schmunis, 2007).

La "globalización de la enfermedad de Chagas" es un fenómeno que se debe a la migración de individuos infectados desde países endémicos por motivos económicos y/o políticos hacia países no endémicos, principalmente Estados Unidos y España. Otros países afectados son Australia, Canadá, Japón y algunos miembros de la Unión Europea (Schmunis, 2007). Se estima que 300.000 personas infectadas viven actualmente en Estados Unidos. En bancos de sangre de ese país se han reportado, desde 2007 a la fecha, 800 muestras positivas (Parker y Sethi, 2011). En Chile, se estima que 150.000 personas padecen de la enfermedad de Chagas (Apt *et al.*, 2009)

Ciclo de Vida de *Trypanosoma cruzi*.

T.cruzi es un protozoo hemoflagelado con un ciclo de vida indirecto (**Figura3**), que comprende a insectos hematófagos (triatominos) como vector biológico, y a mamíferos, incluido el hombre, como hospederos vertebrados.

Los principales triatóminos vectores de *T. cruzi* en Sudamérica son *Triatoma infestans*, *Rhodnius prolixus* y *Panstrongylus megistus* (conocidos vulgarmente como vinchucas). Además de *T. infestans* (ciclo domiciliario), en Chile se encuentran *Mepraia spinolai* y *Mepraia gajardo* (ciclo silvestre) (World Health Organization, 2002). Se han descrito tres ciclos de transmisión de la enfermedad: doméstico, peridoméstico y silvestre (Amino *et al.*, 2002).

El ciclo doméstico es el de mayor relevancia para el hombre; se presenta en áreas rurales y periurbanas por la picadura de un insecto parasitado por *T. cruzi*. El 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 la piel y mucosas, facilitado por el rascado en la zona de la picadura y por enzimas proteolíticas de la saliva del insecto (Amino *et al.*, 2002). En el mamífero, los tripomastigotes son fagocitados por macrófagos, diferenciándose a amastigotes, forma de replicación citoplasmática obligada. Tras cierto número de divisiones, los amastigotes se diferencian a tripomastigotes, lisan las células infectadas, ingresan a la circulación e infectan a los distintos tejidos blanco, como miocardio, músculo esquelético, músculo liso visceral, células de la glía del sistema nervioso central (Prata, 2001) y en caso de embarazo también la placenta (Kemmerling *et al.*, 2010). Cuando un insecto vector se alimenta de un mamífero, los tripomastigotes sanguíneos ingresan al tracto digestivo del insecto y en su intestino medio se diferencian a epimastigotes, forma replicativa extracelular. Los epimastigotes, a medida que avanzan en el tracto intestinal, se replican y luego se diferencian a tripomastigotes metacíclicos, completando así el ciclo de vida de *T. cruzi* cuando el insecto vector se alimenta nuevamente de un mamífero (**Figura 3**) (Tyler y Engman, 2001). En el ciclo de transmisión vectorial doméstico, perros y gatos son los principales reservorios que contribuyen a la mantención de la infección. En el ciclo de transmisión vectorial peridoméstico de la infección, los principales reservorios son roedores domésticos, ganado caprino, bovino, equino y ovino. En el ciclo de transmisión vectorial silvestre o selvático los principales reservorios son mamíferos del hábitat silvestre tales como perezosos, murciélagos, roedores, marsupiales, entre otros. Estos animales, aunque de escaso acceso al humano, son los que permiten la mantención del *T. cruzi* e impiden la completa erradicación del parásito (Tyler y Engman, 2001).

En el ciclo biológico del parásito, descrito más arriba, se observan tres formas celulares (**Figura 4**) caracterizadas por las posiciones relativas del flagelo, kinetoplasto y núcleo (Prata, 2001):

Tripomastigotes: Células de aproximadamente 20 μm 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 (**Figura 4 A**).

Epimastigotes: Células también de aproximadamente 20 μm 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 los epimastigotes ha permitido mantenerlos en cultivos axénicos (**Figura 4 B**).

Amastigotes: Células de aproximadamente 2 μm de diámetro, esféricas y con flagelo no emergente. Se multiplica dentro de las células del hospedero mamífero (8 – 9 divisiones celulares). Los amastigotes se diferencian a tripomastigotes y como tales lisan a la célula del hospedero y son liberados al tejido y torrente sanguíneo. Los amastigotes pueden cultivarse dentro de células musculares, fibroblastos y macrófagos, de las que se pueden obtener formas tripomastigotes infectivas (Morello *et al.*, 1987; Burleigh y Andrews, 1995; Yoshida, 2006; Duaso *et al.*, 2010) (**Figura 4 C**).

Vías de transmisión

Además de la forma transmisión vectorial, descrita más arriba, existen otras formas de contagio como las transfusiones sanguíneas, responsables del 10% de los casos en países como EE.UU (Andrade y Andrews, 2005). El contagio también puede producirse por trasplante de órganos. En regiones no-endémicas, como EE.UU, Canadá y muchas regiones de Europa, se han documentado algunos pocos casos de infección mediada por transfusión sanguínea y trasplantes de órganos. Sin embargo, el número actual de casos podría ser significativamente mayor debido al gran número de inmigrantes provenientes de países latinoamericanos. (World Health Organization, 2007; Rassi *et al.*, 2010). Otra forma de contagio es a través de la ingesta de alimentos y bebidas contaminadas con triatominos o sus excrementos (Jamison *et al.*, 2006). Cabe destacar, que la transmisión congénita adquiere cada vez más importancia epidemiológica, siendo además

parcialmente responsable del fenómeno de la “globalización de la enfermedad de Chagas” (World Health Organization, 2007).

La probabilidad de contraer la enfermedad de Chagas está directamente relacionada con las condiciones de pobreza de la vivienda. Los triatominos se guarecen en grietas y tejados, por lo cual viviendas construidas en forma precaria resultan ideales para este insecto (World Health Organization, 2002). La constante migración campo-ciudad que ha aumentado en los últimos 40 años, ha cambiado el modelo epidemiológico clásico de la enfermedad de Chagas asociada a viviendas rurales, convirtiéndola en una enfermedad rural y urbana (World Health Organization, 2002).

Curso clínico de la Enfermedad de Chagas

La enfermedad de Chagas presenta tres fases clínicas, con diferentes signos y síntomas (Teixeira *et al.*, 2011):

Fase aguda

Esta fase comienza inmediatamente después del ingreso del parásito, si es a través de la piel, genera una reacción inflamatoria llamada “chagoma”; en la conjuntiva ocular presenta un edema bipalpebral unilateral o signo de Romaña. El periodo de incubación demora alrededor de 72 horas, 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. Los pacientes pueden presentar (< 5% de los casos) manifestaciones de infección generalizada tales como fiebre, anorexia, mialgia, vómitos, diarrea, linfadenopatías regionales, hepatomegalia y esplenomegalia moderada, apatía, convulsión y miocarditis. Esta sintomatología es más frecuente en niños. La muerte en la fase aguda de la enfermedad no supera el 10% de los casos y es causada por miocarditis o meningoencefalitis, con complicaciones concurrentes como bronconeumonía (Teixeira *et al.*, 2011).

Fase de latencia o indeterminada

Los casos de infección aguda que no presentan manifestaciones clínicas pasan a una fase de latencia que puede extenderse por meses e incluso años. Ésta fase ha sido definida en base a los siguientes criterios: Test serológico positivo para IgG y/o hallazgo de parásitos, ausencia de signos y síntomas de la enfermedad de Chagas, ausencia de anomalías al electrocardiograma, morfología cardíaca, esofágica y colónica normal al examen radiológico (Teixeira *et al.*, 2011). En esta fase los parásitos raramente pueden

ser detectados en circulación sanguínea, ya que el grado de parasitemia es bajo (Soares *et al.*, 2001).

Aproximadamente 12 millones de latinoamericanos permanecerán en esta fase, de los cuales el 70% de los infectados no muestran ninguna manifestación detectable de la enfermedad de Chagas. (Teixeira *et al.*, 2011). Se considera que un paciente que está en la fase indeterminada no muere por causa de la enfermedad de Chagas. (Rassi *et al.*, 2010)

Fase crónica

La fase crónica puede manifestarse 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 producto de la denervación del sistema nervioso autónomo además de arritmia cardíaca y cardiomegalia con insuficiencia progresiva (Prata, 2001; Teixeira *et al.*, 2006). Estas patologías se asocian a un gran impacto negativo en la capacidad laboral del individuo (Parker y Sethi, 2011). 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).

Enfermedad de Chagas congénita

La infección congénita por *T. cruzi* se asocia a partos prematuros, bajo peso al nacer, abortos y nacidos muertos (Carlier, 2005). Se estima que el 50% de los recién nacidos prematuros de madres con enfermedad de Chagas mueren. La fisiopatología de la infección congénita es poco conocida (World Health Organization, 2007; Kemmerling *et al.*, 2010). Se ha sugerido que el parásito alcanza al feto vía sanguínea, atravesando la barrera placentaria. Se postula que la enfermedad de Chagas congénita deriva de una compleja interacción entre la respuesta inmune materna, factores placentarios y características del parásito (Carlier, 2005; Kemmerling *et al.*, 2010).

Placenta

La placenta es el lugar principal de intercambio de nutrientes y gases entre la madre y el feto (Moore y Persaud, 2004; Syme *et al.*, 2004). Se compone de una porción fetal desarrollada a partir del corion frondoso y una porción materna o decidua basal que procede del endometrio (Moore y Persaud, 2004; Cross, 2006). Esta barrera se compone

hasta las 20 semanas del trofoblasto (epitelio bi-estratificado compuesto por: sinciotrofoblasto y citotrofoblasto), tejido conectivo fetal de las vellosidades coriónicas libres y endotelio de los capilares fetales además de las láminas basales presentes entre los distintos compartimentos tisulares. Posterior a las 20 semanas la placenta sufre adaptaciones que mejoran el intercambio metabólico, las células del citotrofoblasto disminuyen, los núcleos del sinciotrofoblasto se acumulan formando nodos y los capilares fetales se acercan al trofoblasto (**Figura 5**). Esta re-estructuración favorece el intercambio metabólico por la formación de delgadas zonas citoplasmáticas sin núcleos y de esta manera la membrana placentaria se transforma en una barrera de menor grosor (Moore y Persaud, 2004; Kemmerling *et al.*, 2010). La 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 (Moore y Persaud, 2004).

Se han descrito diversos agentes patógenos que son capaces de atravesar la barrera placentaria e infectar tanto a la placenta como al feto humano. Entre estos se cuentan 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). También se han descrito enfermedades parasitarias, además de *T. cruzi*, entre éstas destacan las infecciones por *Plasmodium falciparum*, agente causal de la malaria (Desai *et al.*, 2007; Rogerson *et al.*, 2007), *Schistosoma* (Friedman *et al.*, 2007), *Toxoplasma gondii* (Correa *et al.*, 2007) y *Trypanosoma brucei* (Rocha *et al.*, 2004).

Diagnóstico de la enfermedad de Chagas Congénita

Actualmente, solo la detección directa del parásito es usada para confirmar la infección al nacimiento (Mallimaci *et al.*, 2010).

El método de elección para identificar la infección congénita es la técnica del hematocrito debido a su sensibilidad y a la pequeña cantidad de sangre necesaria. El examen microscópico de la sangre del cordón o de la sangre periférica del niño mediante esta técnica es recomendado durante el primer mes de vida. En centros especializados, ensayos basados en amplificación de DNA parasitario mediante PCR también puede ser usado por diagnóstico temprano de la infección congénita. La sensibilidad del PCR pareciera ser mayor que la examinación microscópica directa (Carlier y Truyens, 2010).

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

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

La inducción de alteraciones celulares durante la infección con *T. cruzi* ha sido estudiado principalmente en cultivos de células de mamífero. En nuestro laboratorio hemos establecido un modelo de infección *ex vivo* de explantes de vellosidades coriónicas humanas, en el cual se pueden estudiar los mecanismos de infección tisular del parásito (Duaso *et al.*, 2010, Duaso *et al.*, 2011a).

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

La penetración de *T. cruzi* a las células del hospedero ocurre a través de un proceso complejo, de varias etapas, que involucra a moléculas del parásito y del hospedero. La unión del parásito a las células del hospedero es mediada por receptores. *T. cruzi* posee una serie de moléculas de superficie que interactúan diferencialmente con receptores de las células y con moléculas de la MEC de tejidos del hospedero. Durante la invasión celular se activan diferentes vías de transducción de señales tanto en la célula que es infectada como en el mismo parásito (Yoshida, 2006).

Mecanismos de activación de vías de transducción de señales

La invasión celular de *T. cruzi* induce señales de Ca^{2+} y activación de vías de transducción de señales, tanto en el parásito como en el hospedero (Yoshida, 2006). La capacidad del parásito de activar distintas vías de transducción de señales y generar señales de Ca^{2+} en el hospedero se relaciona con su infectividad (Yoshida, 2008).

Entre las vías de transducción de señales que son activadas por *T. cruzi*, durante el proceso de invasión celular, se han descrito vías de proteína tirosina-quinasa (PTK),

proteína quinasa B (PKB/Akt), proteína quinasa C (PKC), PLC y MAPK (Burleigh y Woolsey, 2002; Mott *et al.*, 2009)

La activación de la vía de transducción de señales PLC, específicamente la vía Fosfolipasa C gamma (PLC- γ), es una de las vías de transducción de señales más importante durante el proceso de invasión celular del parásito, ya que genera Inositol-3-fosfato (IP₃), lo que lleva a una liberación de Ca²⁺ desde depósitos intracelulares (Yoshida, 2006) (**Figura 6**). Este aumento de Ca²⁺ induce el reclutamiento y fusión a la membrana plasmática de lisosomas al sitio de invasión del parásito, además de una desorganización del citoesqueleto causada por una depolimeración de los filamentos de actina (Yoshida, 2006; 2008).

La proteína quinasa activada por mitógeno (MAPK) (Mitogen Activated Protein) ERK (Extracellular Signal Regulated Kinases) es una proteína serina-treonina quinasa que es regulada por el microambiente celular (Li *et al.*, 2003; Vincent *et al.*, 2004). Es parte de un sistema de tres proteínas llamado mitogen-activated protein kinase module (MAP kinase module) (**Figura 7**). Los tres componentes de este sistema forman un módulo de señalización funcional que ha sido altamente conservado, desde levaduras hasta humanos. El “MAPK module” se activa en conjunto con otras vías de transducción de señales en muchos distintos contextos de señalización celular. Los tres componentes son proteína quinasa; la quinasa final en la serie es MAPK. El siguiente río arriba es MAP quinasa quinasa (MAPKK): éste se fosforila y así activa a MAPK. Y el siguiente río arriba de MAPKK es MAP quinasa quinasa quinasa (MAPKKK): el que se fosforila y activa MAPKK (Alberts *et al.*, 2008).

En el tejido cardíaco se ha descrito la activación de una de las vías de las MAPK, específicamente la vía ERK1/2 MAPK. Se ha postulado, que esta activación es parcialmente responsable del cambio de un crecimiento hipertrófico, a un crecimiento hiperplásico en los cardiomiocitos (Nagajyothi *et al.*, 2006). La activación de ERK1/2 MAPK también se ha observado en células musculares lisas, células endoteliales (Mukherjee *et al.*, 2004) y macrófagos (Villalta *et al.*, 1998). En cardiomiocitos y células endoteliales de vasos sanguíneos cardíacos, la activación de ERK1/2 MAPK induce un aumento en los niveles proteicos de ciclina D1, induciendo proliferación celular. En células musculares lisas, también se induce proliferación celular por la activación ERK1/2 MAPK-ciclina D1 (Mukherjee *et al.*, 2004). Por otra parte, en células PC12 la glicoproteína

parasitaria de superficie, transialidasa, induce la diferenciación hacia un fenotipo neuronal vía MAPK/ERK (Chuenkova y Pereira, 2001). En macrófagos también se activa ERK1/2 MAPK. En estas células, la endocitosis del parásito en estas células es inhibida por inhibidores específicos de estas quinasas. Por lo tanto, la activación de esta vía participaría tanto en la internalización del parásito a los diferentes tipos celulares, como en la inducción de proliferación y diferenciación celular (Villalta *et al.*, 1998).

La infección *ex vivo* de vellosidades coriónicas, induce alteraciones tisulares importantes (Duaso *et al.*, 2010). Es esperable que en una invasión celular parasitaria exitosa de las vellosidades coriónicas humanas, se active tanto la vía de PLC- γ como la de ERK1/2 MAPK. Se seleccionó la PLC- γ , debido a que participa en la generación de señales de Ca²⁺ en las células de hospedero mantenidas en cultivo, lo que se ha relacionado con la infectividad del parásito (Yoshida, 2006; 2008). Por otra parte, la activación de ERK1/2 MAPK en células en cultivo infectadas con *T. cruzi* se relaciona tanto con la internalización celular del parásito, como con la inducción de proliferación y diferenciación celular en el hospedero (Mukherjee *et al.*, 2004; Nagajyothi *et al.*, 2006; Yoshida, 2008).

En base a los antecedentes es esperable que durante la infección *ex vivo* de explantes de vellosidades coriónicas se activen tanto la vía de transducción de señales PLC- γ como la vía ERK1/2 MAPK.

HIPÓTESIS

Las vías de transducción de señales PLC- γ y ERK1/2 MAPK son activadas en los distintos componentes tisulares de las vellosidades coriónicas placentarias humanas durante la infección *ex vivo* con tripomastigotes de *Trypanosoma cruzi*.

OBJETIVO GENERAL

Estudiar la participación de las vías de transducción de señales PLC- γ y ERK1/2 MAPK como parte de los mecanismos de invasión e infección de *T. cruzi*.

OBJETIVOS ESPECIFICOS

1. Determinar en explantes de vellosidades coriónicas humanas infectadas *ex vivo* con tripomastigotes de *T. cruzi* la activación de las vías de transducción de señales PLC- γ y ERK 1/2 MAPK
2. Determinar en explantes de vellosidades coriónicas humanas infectadas con tripomastigotes de *T. cruzi* la infectividad parasitaria mediante el uso de inhibidores específicos para las vías de transducción de señales PLC- γ y ERK1/2 MAPK.

MATERIALES Y MÉTODOS

Cultivos celulares: Células VERO® (fibroblastos de riñón de mono verde africano, (ATCC® CCL-81)) fueron sembrados en frascos de cultivo de 25 cm² a una densidad de 4.000 células/cm², en medio RPMI suplementado con bicarbonato de sodio 0,22%, estreptomicina 100 µg/ml, penicilina 100 µg/ml y suero fetal bovino (SFB) al 10% para crecimiento o al 5% para mantenimiento. Las células fueron cultivadas a 37°C en una atmósfera húmeda con 5% CO₂, substituyendo el medio cada 24 a 48 horas. (Salas *et al.*, 2008)

Obtención de formas infectivas de *T. cruzi*: Células VERO® en semiconfluencia (70-80%) fueron inoculadas con 1-2 ml de cultivo de epimastigotes cepa Dm28c envejecido (fase estacionaria). Este cultivo presenta aproximadamente un 5% de la forma infectiva tripomastigote. Los tripomastigotes invaden a las células VERO®, se diferencian intracelularmente en amastigotes y como tales proliferan; después de 4 o 5 días se diferencian nuevamente a tripomastigotes, lisan las células VERO® y son liberados de esta manera al medio de cultivo. Se colectó el medio de cultivo 4-5 días después de la inoculación con el medio de epimastigotes envejecido y 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 asciendan hacia el sobrenadante. Este sobrenadante fue recolectado y centrifugado a 3000 x g durante 10 minutos a fin de obtener en el sedimento las formas infectivas de *T. cruzi*. Los tripomastigotes fueron re-suspendidos en medio RPMI y el número de células fue determinado mediante conteo en una cámara de Neubauer. (Vieites *et al.*, 2009)

Obtención de placentas: Se obtuvieron 27 placentas de término del Servicio de Obstetricia y Ginecología del Hospital San José, Servicio de Salud Metropolitano Norte. 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**).

Las placentas fueron obtenidas en alumbramientos por cesárea para asegurar la asepsia y preservación de las muestras. Las placentas provenían de madres sanas con embarazos monogestacionales y fetos con crecimiento normal. Los criterios de exclusión para la obtención de 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,

Na₂HPO₄ 10 mM, KH₂PO₄ 1,8 mM) estéril a 4°C y fueron procesados durante los 30 minutos siguientes al alumbramiento. Se disecaron cotiledones a 5 cm de la inserción del cordón umbilical cuyas caras placentarias maternas y fetales fueron desechadas. Se obtuvieron trozos de tejido de vellosidades coriónicas de aproximadamente 0,5 cm³ del centro del cotiledón, los cuales fueron lavados al menos 5 veces con PBS e incubadas en medio RPMI suplementado con antibióticos y 10% suero fetal bovino inactivado (Lin *et al.*, 2004, Duaso *et al.*, 2010).

Infección *ex vivo* de vellosidades coriónicas con *T. cruzi*: Las vellosidades coriónicas fueron incubadas en presencia y ausencia de tripomastigotes de la cepa Dm28c (concentraciones de 1X10⁵ y 1X10⁶ por ml tripomastigotes) durante 24 horas en medios de cultivo RPMI suplementado con SFB inactivado y antibióticos. Las vellosidades coriónicas controles se mantuvieron en las mismas condiciones, sin parásitos. Adicionalmente las vellosidades coriónicas fueron incubadas en presencia y ausencia de inhibidores de las vías de transducción de señales: U-73122 (100µM) para PLC-γ y UO126 (10µM) para ERK1/2 MAPK. Posteriormente las vellosidades coriónicas fueron procesadas para los estudios microscópicos, bioquímicos y de biología molecular.

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

Las muestras de las vellosidades coriónicas incubadas en presencia y ausencia del parásito, además de en presencia y ausencia de inhibidores de las vías de transducción de señales: U-73122 para PLC-γ y UO126 para MAPK ERK1/2, se lavaron al menos 10 veces en PBS, posteriormente se extrajo el DNA genómico con el kit WizardGenomic® (Promega) según indicaciones del fabricante: El tejido fue homogenizado a 4°C en 600 µl de solución de lisis de núcleos. El homogenado fue incubado a 65° C por 20 minutos, posteriormente se agregó 3 µl de RNAasa 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 15000 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 15000 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 15000 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 500 µl de solución de hidratación de DNA mediante incubación por una hora a 65° C.

La concentración de DNA se determinó en un fluorómetro (Qubit®, Invitrogen) mediante el kit Quant-iT™ds DNA BR Assay según indicaciones del fabricante. Se amplificó un fragmento de 384 pares de bases correspondiente a DNA de minicirculos de *T. cruzi* (Zulantay *et al.*, 2004). Las secuencias de los partidores usados fueron

S35: 5'-AAATAATGTACGGGKGAGATGCAT-3' ;

S36: 5'-GGGTTTCGATTGGGGTTGGTGT-3'.

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

Detección de la activación de PLC- γ y ERK1/2 MAPK mediante Western blot: Las vellosidades corióncas fueron homogenizadas en 700 µL de buffer de lisis (Tris 10 mM pH 8,0; SDS 1% p/v, en presencia de una mezcla de inhibidores de proteasas (Complete Mini (Roche®)) e inhibidores de fosfatasa (Phosphatase inhibitor Cocktail 2 (Sigma-Aldrich®)) en un homogenizador Potter-Elvehjem a 4°C (Kemmerling, *et al.*, 2007). Posteriormente las muestras fueron agitadas en frío durante 15-20 minutos y luego centrifugadas a 15.000 x g por 15 minutos. La concentración de proteínas se determinó en un fluorómetro (Qubit®, Invitrogen) mediante el kit Quant-iT™proteinAssay, según indicaciones del fabricante. Los sobrenadantes de los lisados tisulares fueron diluidos en un buffer de carga denaturante (glicerol 10%, dodecil sulfato de sodio (SDS) 4,5%, β -mercaptoetanol 5%, 62,5 mM Tris-HCL (pH 6,8) 1,5 mM EDTA y 0,1% azul de bromofenol) y hervidos durante cinco minutos. Las proteínas fueron separadas en geles por SDS-PAGE al 8% para PLC- γ y 10% para ERK 1/2 MAPK, luego transferidas a membranas de nitrocelulosa (BioRad®) para P-PLC- γ y membranas de PDVF (Milipore Corp.®) para P-ERK, durante tres horas a 100 mA. Se utilizaron 50 µg de proteínas para la detección de P-PLC- γ y PLC- γ , y 30 µg de proteínas para la detección de P-ERK 1/2 y ERK1/2. Las membranas fueron bloqueadas durante dos horas a temperatura ambiente en buffer Tris Salino (TBS) (50 mMTris.HCl, pH 7.4, 150 mMNaCl), Tween® (0,1%) con leche BioRad® al 5% para P-PLC- γ ; y dos horas a temperatura ambiente en buffer Fosfato Salino (PBS: NaCl 135 mM, KCl 2,7 mM,

Na₂HPO₄ 10 mM, KH₂PO₄ 1,8 mM) con albumina de suero bovino BSA al 5%. Luego fueron lavadas tres veces por 10 minutos en PBS 0,05% Tween® (PBST) para evitar marcas inespecíficas en ERK1/2 MAPK y sin lavados para P-PLC- γ y PLC- γ . Posteriormente las membranas fueron incubadas con el anticuerpo primario Phospho-PLC- γ 1 (Tyr783, CellSignaling®) o P-ERK1/2 MAPK (sc-16982, Santa Cruz®) durante toda la noche a 4°C. Al día siguiente las membranas fueron lavadas tres veces durante 5 minutos con TBST 0,1% para P-PLC- γ y tres veces durante 10 minutos con PBST 0,05% para P-ERK 1/2 e incubadas con el anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa durante 60 minutos. Las proteínas inmunoreactivas fueron detectadas mediante quimioluminiscencia, según las instrucciones del fabricante (AmershamBiosciences®). Después de detectar la forma activa (fosforilada) de la proteína P-PLC- γ o P-ERK1/2, las membranas fueron incubadas en una solución de "stripping" (62.5 mM Tris-HCl, pH 6.8, 2% SDS y 50mM β -mercaptoetanol) a 50°C durante 30 minutos. Posteriormente las membranas fueron lavadas tres veces durante 10 minutos con TBST 0,1% para PLC- γ y tres veces durante 10 minutos con PBST 0,05% para ERK 1/2, bloqueadas en TBST 0,1% BSA al 5% para P-PLC- γ y PBS-BSA al 5% para P-ERK, incubadas con el anticuerpo primario para las formas no fosforiladas de PLC- γ (sc-7290, Santa Cruz®) y ERK1/2 MAPK (sc-1647, Santa Cruz®) durante toda la noche a 4°C (Kemmerling, *et al.*, 2007) El tratamiento para la detección de la inmunoreactividad de estas proteínas fue el mismo que el descrito más arriba.

Las películas fueron digitalizadas en un sistema automático de barrido y se utilizó el programa ImageJ para el análisis densitométrico de las bandas. Los resultados se expresaron como la razón de anti-P-PLC- γ /PLC- γ o anti-P-ERK 1/2 /ERK 1/2.

Se normalizaron a 1 los valores de la razón P-PLC- γ /PLC- γ ó P-ERK 1/2/ERK1/2 de los controles en los distintos blots en cada experimento y se expresaron los datos de las distintas condiciones experimentales en relación con sus controles respectivos.

Detección de la activación de PLC- γ y ERK1/2 MAPK mediante Inmunofluorescencia:

Las vellosidades coriónicas fueron fijadas durante 24 horas en formaldehído 4% preparada en un tampón fosfato pH 7,3. Posteriormente fueron lavadas en agua corriente durante 2 horas, deshidratadas 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 (Kiernan, 2008;

Bancroft y Gamble, 2008). Posteriormente se obtuvieron cortes de 5 μm de espesor, éstos fueron colocados en portaobjetos silanizados con carga positiva (Superfrost® plus, ThermoScientific). Posteriormente los cortes 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 (Kiernan, 2008). Los cortes desparafinados fueron incubados con una solución de Cloruro de Amonio 25mM por 10 minutos, luego lavado 3 veces con PBS 5 minutos cada vez, incubado con “bloqueador de reacciones inespecíficas” (Pro-Blok (ScyTek, ACA)) por 30 minutos, luego lavado 3 veces con PBS 5 minutos cada vez y posteriormente incubados con suero normal equino R.T.U al 2,5% (ScyTek, ACA) por 20 minutos. El anticuerpo primario anti-P-PLC- γ (sc-12944, Santa Cruz®) fue utilizado en una concentración de 1:25 v/v durante toda la noche a 4°C y anti-P-ERK1/2 MAPK (sc-16982, Santa Cruz®) se utilizó en una concentración de 1:50 v/v durante 2 horas a 37°C de temperatura. Posteriormente, las muestras fueron lavadas 3 veces con PBS por 5 minutos cada vez, e incubadas con anticuerpo secundario fluorescente (1:400 v/v) (DyLightTM488-conjugated AffiniPureDonkey Anti-GoatIgG (H+L) Jackson Inmuno Research Laboratories, INC.®) durante 1 hora y lavadas con PBS como se explica más arriba. Luego las muestras fueron teñidas con DAPI (4',6- diamidino-2-fenilindol dicloridrato, PIERCE ®; 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$) por 5 minutos, lavadas dos veces en PBS por 3 minutos cada vez, selladas con esmalte de uñas y montadas con medio para fluorescencia (VECTASHIELD® VECTOR (ScyTek, ACA)). Los controles negativos de la técnica inmunofluorescencia fueron realizados mediante la sustitución de los anticuerpos primarios con PBS. Todo el proceso fue realizado en una cámara húmeda y en ausencia de luz. Las muestras fueron observadas en un microscopio de epifluorescencia Nikon Eclipse E400 (Tokio, Japón) y las imágenes fueron capturadas con una cámara Nikon Digital Sight y procesadas con los “software” NIS-Elements F 3.0 e ImageJ 1.43.

Análisis estadístico: Los resultados fueron expresados en promedio más desviación estándar. La significancia de las variables múltiples fue evaluada mediante ANDEVA seguido por “Dunnett’s post test” (Kemmerling *et al.*, 2007).

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" (**anexo 2**).

Las formas infectivas del parásito fueron manipuladas por la profesora guía.

Bioética: Este estudio cuenta con la aprobación del "Comité de Ética Humana de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile" (**anexo 3**).

RESULTADOS

La invasión celular de *T. cruzi* induce señales de Ca^{2+} y activación de vías de transducción de señales, tanto en el parásito como en el hospedero (Yoshida, 2006). Entre las vías de transducción de señales que son activadas por *T. cruzi*, durante el proceso de invasión celular, se han descrito PLC y MAPK (Burleigh y Woolsey, 2002; Mott *et al.*, 2009).

T. cruzi* induce la activación de la vía PLC- γ en vellosidades coriónicas placentarias humanas infectadas *ex vivo

Vellosidades coriónicas humanas fueron incubadas durante 24 horas a 37°C, en presencia y ausencia de 10^5 y 10^6 tripomastigotes de la cepa Dm28c y en presencia y ausencia del inhibidor específico de PLC- γ (U73122 (100 μ M)). La fosforilación de esta vía de transducción de señales fue determinada mediante Western blot e inmunofluorescencia.

En la **figura 8** se observa un aumento significativo en los niveles de fosforilación de PLC- γ en las vellosidades incubadas con 10^5 ($p \leq 0,001$) y 10^6 ($p \leq 0,05$) tripomastigotes con respecto al control. Adicionalmente en las vellosidades incubadas con el inhibidor específico de P-PLC- γ (U73122) o en las incubadas con el inhibidor y parásitos se observa una inhibición significativa ($p \leq 0,001$) de la fosforilación respecto al control (**Figura 8**).

Estos resultados observados mediante Western blot fueron confirmados mediante inmunofluorescencia. Se observa un franco aumento de la inmunoreactividad para P-PLC- γ en las vellosidades incubadas con 10^5 y 10^6 tripomastigotes (**Figura 9, G-I; M-O**) respecto al control (**Figura 9, A-C**) o en presencia del inhibidor (**Figura 9, D-F; J-L; P-R**). La localización de la inmunoreactividad se observa tanto en células del trofoblasto como en las del tejido conectivo fetal. Por lo tanto, la activación de la vía PLC- γ , determinada previamente en cultivos celulares, también se observa en el tejido placentario. Se concluye que la activación de la vía PLC- γ es importante tanto para la invasión celular como tisular.

T. cruzi* induce la modulación de la vía ERK1/2 MAPK en vellosidades coriónicas placentarias humanas infectadas *ex vivo

Vellosidades coriónicas humanas fueron incubadas durante 24 horas a 37°C, en presencia y ausencia de 10^5 y 10^6 tripomastigotes de la cepa Dm28c y en presencia y ausencia del inhibidor específico de ERK (UO126 ($10\mu\text{M}$)). La fosforilación de esta vía de transducción de señales fue determinada mediante Western blot e inmunofluorescencia.

Se observó un aumento significativo ($p \leq 0,01$) en los niveles de fosforilación de ERK 1/2 MAPK en las vellosidades coriónicas tratadas con 10^5 parásitos respecto al control o respecto a las vellosidades incubadas sólo con el inhibidor o con los parásitos y el inhibidor (**Figura 10**). Por el contrario, las vellosidades incubadas con 10^6 tripomastigotes presentaron menores niveles de fosforilación de estas quinasas (**Figura 10**) comparadas a los controles. Los niveles de fosforilación en presencia de 10^6 parásitos son similares a los niveles de fosforilación en presencia del inhibidor y menores que los controles (**Figura 10**).

Estos resultados también fueron confirmados mediante inmunofluorescencia. Se observa un franco aumento de la inmunoreactividad para P-ERK MAPK en las vellosidades incubadas con 10^5 tripomastigotes (**Figura 11, G-I**) respecto al control (**Figura 11, A-C**) o en presencia del inhibidor (**Figura 11, D-F; J-L; P-R**). Vellosidades incubadas con la concentración más alta de parásitos no presentan aumento de la inmunoreactividad para la P-ERK1/2 MAPK (**Figura 11, M-O**).

La activación de la vía MAPK durante la infección parasitaria ha sido descrita en diversos tipos celulares; en este estudio se confirman estos resultados pero a nivel tisular. Probablemente la activación de la vía ERK1/2 MAPK con baja concentración de parásitos está relacionada a los mecanismos de invasión, así como a respuestas de reparación en el tejido afectado. Por otra parte, la inhibición de esta vía en las vellosidades incubadas con una mayor concentración parasitaria podría estar relacionada con el mayor daño tisular observado en esta condición experimental donde los procesos de degradación tisular y muerte celular son predominantes (Duaso *et al.*, 2010).

La inhibición de las vías de transducción de señales PLC- γ o ERK1/2 MAPK no impide la infección *ex vivo* de explantes de vellosidades coriónicas placentarias humana con tripomastigotes de *T. cruzi*.

Vellosidades coriónicas humanas fueron incubadas durante 24 horas a 37°C, en presencia y ausencia de 10⁵ y 10⁶ tripomastigotes de la cepa Dm28c y en presencia y ausencia de inhibidores específicos de PLC- γ (U73122) o ERK (UO126). Mediante PCR se amplificó un fragmento de 384 pb de minicírculo de kinetoplasto de *T. cruzi*. Ninguno de los dos inhibidores fue capaz de impedir la infección de las vellosidades coriónicas.

En la **figura 12** se observa la detección de DNA parasitario en las vellosidades coriónicas humanas mediante PCR. En todas las muestras incubadas con el parásito en ausencia y presencia de los inhibidores (**Figura 12 paneles A y B carriles 5-12**) se detecta DNA parasitario.

DISCUSIÓN

La invasión de *T. cruzi* a las células del hospedero mamífero requiere de la activación de las vías de transducción de señales tanto del parásito como del hospedero (Tardieux *et al.*, 1994; Favoreto *et al.*, 1998; Yoshida, 2006). Durante el proceso de invasión celular participan receptores de superficie que activan vías de transducción de señales e inducen señales de Ca^{2+} , lo que promueve la reorganización del citoesqueleto en la célula (Rodríguez *et al.*, 1995), el reclutamiento de lisosomas en el lugar de entrada de *T. cruzi* (Tardieux *et al.*, 1994) y la internalización del parásito (Andrews, 1995).

Entre las vías de transducción de señales que son activadas por *T. cruzi*, durante el proceso de invasión celular, se han descrito vías de proteína tirosina quinasas (PTK), proteína quinasa B (PKB/Akt), proteína quinasa C (PKC), PLC y MAPK (Burleigh y Woolsey, 2002; Mott *et al.*, 2009).

El presente estudio fue diseñado para determinar la participación de las vías de transducción de señales PLC- γ y ERK1/2 MAPK en la infección e invasión tisular de *T. cruzi*. Los resultados claramente muestran que existe un aumento en los niveles de fosforilación en las vías de transducción de señales PLC- γ (**Figura 8 y 9**) y que la vía ERK 1/2 MAPK también es modulado por el parásito (**Figura 10 y 11**). Éstos resultados sugieren que éstas vías de transducción de señales participan en los mecanismos de infección e invasión de *T. cruzi* en las vellosidades coriónicas humanas.

El flujo de información desde la superficie celular a los componentes intracelulares lleva a un aumento en la concentración de Ca^{2+} . La interacción tripomastigotes-célula hospedera induce la fosforilación de PLC- γ generando inositol 1,4,5-trifosfato (IP_3) que activa a canales de Ca^{2+} (IP_3R , receptores de IP_3) presentes en el retículo endoplasmático, liberando de esta manera Ca^{2+} desde éste depósito intracelular (Rodríguez *et al.*, 1995). La capacidad del parásito de activar vías de transducción de señales y generar señales de Ca^{2+} en el hospedero se relaciona con su infectividad (Yoshida, 2008), ya que epimastigotes no infectivos no inducen señales de Ca^{2+} (Tardieux *et al.*, 1994). PLC- γ es una proteína serina-treonina quinasa, la fosforilación de PLC- γ -Tyr⁷⁸³ activa enzimas y juega un importante rol en la transducción de señales involucrados en los procesos de crecimiento y migración celular (Nong *et al.*, 2010) (**Figura 6**). Los resultados de este estudio muestran que la infección e invasión de *T. cruzi* no solo afecta a la estructura del tejido (Duaso *et al.*, 2010), sino que también activa la vía de transducción de señales

PLC- γ . Cuando los explantes *ex vivo* de vellosidades coriónicas humanas son incubadas con U73122 es posible observar una inhibición de la fosforilación de PLC- γ (**Figura 8**) lo que sugiere que los mecanismos de infección e invasión de *T. cruzi* son afectados. La participación de esta vía de transducción de señales en este proceso fue determinado en células HeLa, en las cuales el parásito induce la activación de la PLC- γ , genera IP₃ con la consecuente movilización de Ca²⁺. La inhibición de PLC- γ con el mismo inhibidor usado en el presente estudio impidió la invasión del parásito en las células HeLa (Yoshida *et al.*, 2000), confirmando la participación de ésta vía en los mecanismos de invasión del *T. cruzi*.

ERK1/2 MAPK es el componente central de la cascada de las MAPK (**Figura 7**). Es una proteína serina-treonina quinasa que es regulada por el microambiente celular (Li *et al.*, 2003; Vincent *et al.*, 2004). Cuando las proteínas *ras* son activadas, inician una cascada de fosforilación serina/treonina que comienza por la activación de MAP-quinasa-quinasa-quinasa, activando a MAP-quinasa-quinasa que a su vez converge sobre MAPK, las cuales colaboran en la transmisión de la señal al núcleo (Alberts *et al.*, 2008). La fosforilación de ERK 1/2 activa señales río abajo fosforilando varias proteínas dentro de la célula, incluyendo proteínas reguladoras de genes y otras proteínas quinasas (Quinasa C y D), jugando un importante rol en procesos celulares como expresión génica, proliferación, diferenciación y migración (Hill y Treisman, 1995; Marshall, 1995).

La participación de la vía de transducción de señales ERK1/2 MAPK se ha descrito en otros tejidos como en cardiomiocitos y células endoteliales de vasos sanguíneos cardíacos. La activación de ERK1/2 MAPK induce un aumento en los niveles proteicos de ciclina D1, induciendo proliferación celular. En células musculares lisas, también se induce proliferación celular por la activación ERK1/2 MAPK-ciclina D1 (Mukherjee *et al.*, 2004). En macrófagos también se activa ERK1/2 MAPK durante el proceso de invasión celular del parásito. Específicamente, la endocitosis del parásito en estas células es inhibida por inhibidores específicos de estas quinasas (Villalta *et al.*, 1998). Por lo tanto, la activación de esta vía participa tanto en la internalización del parásito a los diferentes tipos celulares, como en la inducción de proliferación y diferenciación celular.

Nuestros resultados indican, que durante la infección e invasión celular del *T. cruzi* la vía de transducción de señales ERK1/2 MAPK es modulada por el parásito. Una concentración baja de parásitos (10⁵/ml) induce la activación de la vía, mientras que una

incubación con una alta concentración de parásitos (10^6 /ml) induce la inhibición de la vía **(Figura 10 y 11)**. La inhibición de la vía con altas concentraciones del parásito se puede relacionar con el gran daño tisular observado en las mismas condiciones experimentales (Duaso *et al.*, 2010). La infección *ex vivo* de vellosidades coriónicas humanas induce destrucción y desprendimiento del trofoblasto, desorganización selectiva de los componentes moleculares de las láminas basales y desorganización severa de colágeno tipo I en el tejido conectivo fetal (Duaso *et al.*, 2010), daño que supera los posibles estímulos mitogénicos que activen a la vía ERK1/2 MAPK.

Así, como algunas enfermedades infecciosas producen un aumento en la apoptosis celular en placenta humana; existen parásitos que han desarrollado la capacidad de inducir o inhibir la apoptosis o como el caso de *Plasmodium falciparum*, el agente causante de la Malaria, capaz de generar necrosis del tejido placentario. Nosotros hemos descrito que *T. cruzi* induce muerte celular tipo apoptosis (bajas concentraciones) o necrosis (altas concentraciones) en el tejido placentario. La inducción de necrosis también apoya la hipótesis que el daño tisular ha superado la capacidad de reparación del tejido placentario y por ende se explica la inhibición de la vía ERK1/2 MAPK. Por otra parte, la muerte celular tipo apoptosis forma parte del proceso de diferenciación y recambio del trofoblasto (Huppertz y Kingdom, 2004) por lo que es probable que ante el desafío de la infección parasitaria (bajas concentraciones) el trofoblasto responda aumentando no sólo su tasa de muerte celular (diferenciación) sino también la de proliferación celular. Este último proceso requiere la activación de las distintas MAPK (Alberts *et al.*, 2008).

La inhibición de ambas vías de transducción de señales por sí solo no impide la infección *ex vivo* de las vellosidades coriónicas humanas **(Figura 12 Paneles A y B)**. Esto se podría explicar por el hecho de que existen otras vías de transducción de señales como PTK y otros mecanismos, tales como la activación de proteasas, que están involucrados en la infección e invasión de *T. cruzi*. Adicionalmente es esperable que el comportamiento del parásito frente a un tejido sea distinto que frente un cultivo celular. No existen estudios anteriores donde se analicen estas vías de transducción de señales en vellosidades coriónicas placentarias humanas incubadas con *T. cruzi*.

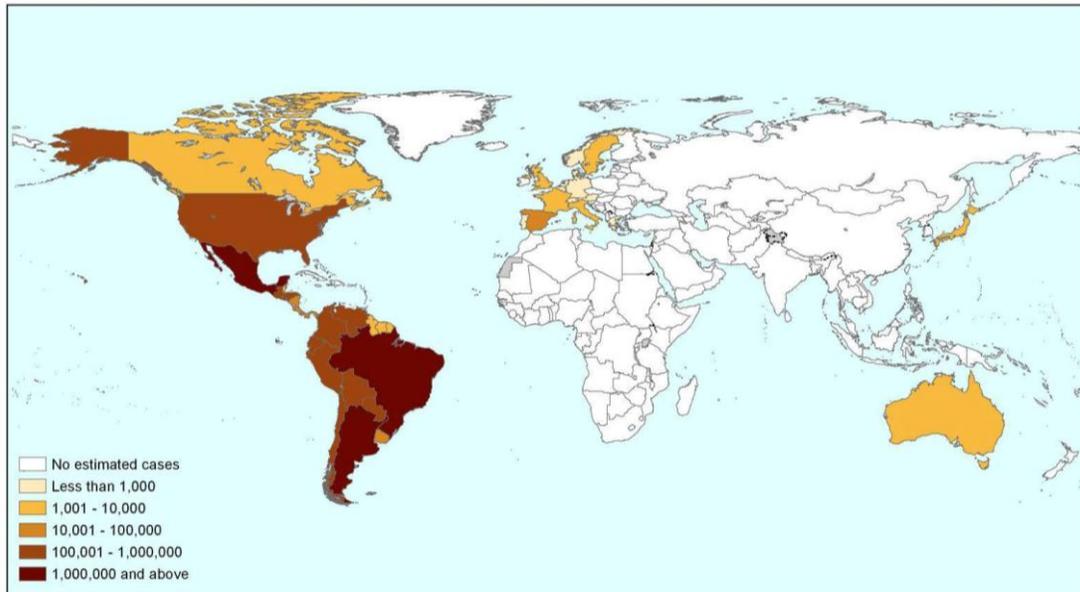
Se concluye que tanto la vía de transducción de señales PLC- γ como ERK1/2 MAPK son parte de una compleja “estrategia” de invasión celular y tisular de *T. cruzi*.

CONCLUSIONES

- La activación de la vía de transducción de señales PLC- γ forma parte de los mecanismos de infección tisular de *T. cruzi* en explantes de vellosidades coriónicas infectadas *ex vivo*.
- La modulación de la vía de transducción de señales ERK1/2 MAPK forma parte de los mecanismos de infección tisular de *T. cruzi* en explantes de vellosidades coriónicas infectadas *ex vivo*.
- La inhibición de las vías de transducción de señales PLC- γ o ERK 1/2 MAPK no impide la infección *ex vivo* de explantes de vellosidades coriónicas placentarias humana con tripomastigotes de *T. cruzi*.
- Tanto la vía de transducción de señales PLC- γ como ERK1/2 MAPK son parte de una compleja “estrategia” de invasión celular y tisular de *T. cruzi*.

FIGURAS

Figura 1

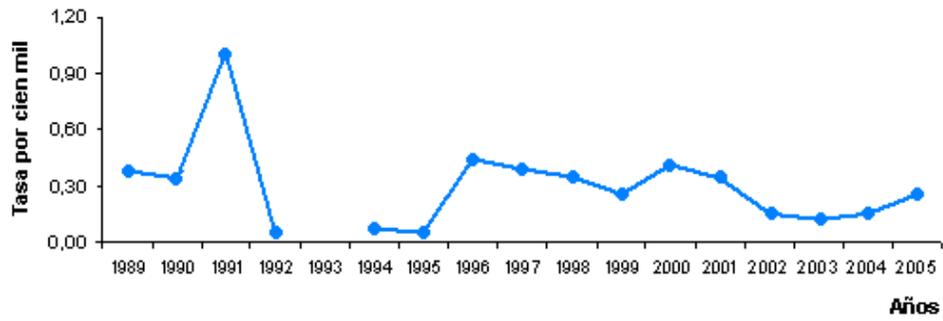


Estimación de la población mundial infectada con *Trypanosoma cruzi*, 2009:

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

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

Figura 2

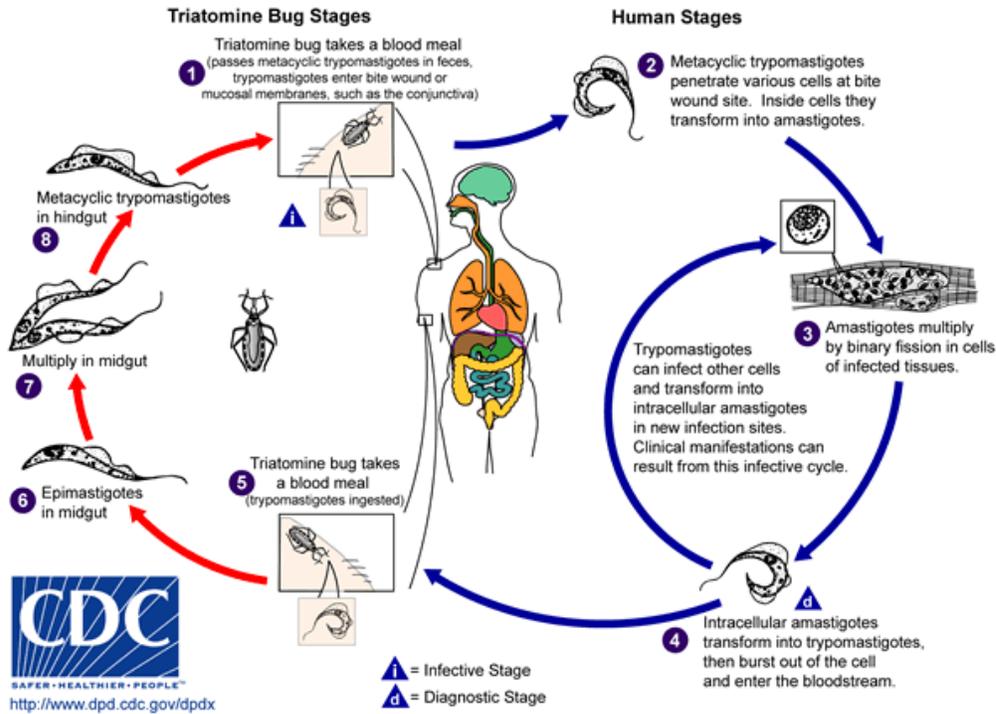


Tasa de incidencia de la enfermedad de Chagas en Chile.

Fuente: Ministerio de Salud

*No existen datos para 1993.

Figura 3



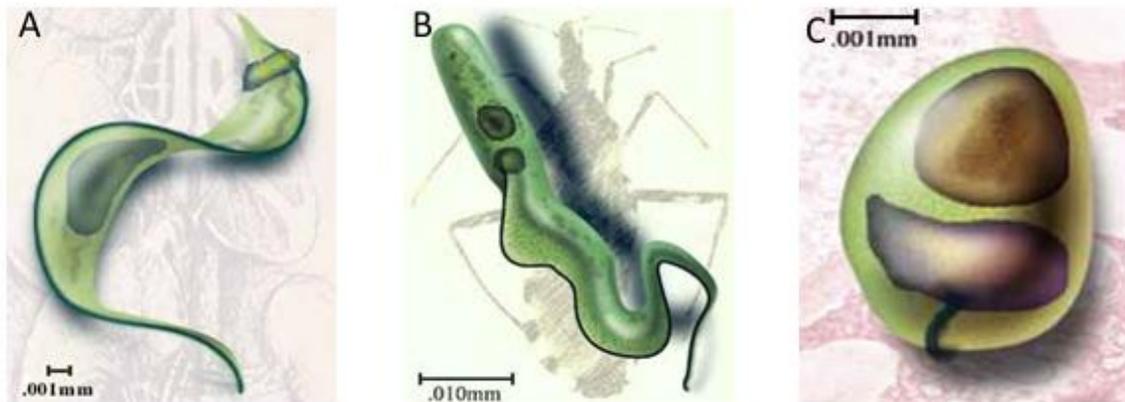
Ciclo de vida de *Trypanosoma cruzi*:

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

Fuente: Centers of Disease Control and Prevention.

<http://www.dpd.cdc.gov/dpdx/Default.htm>

Figura 4

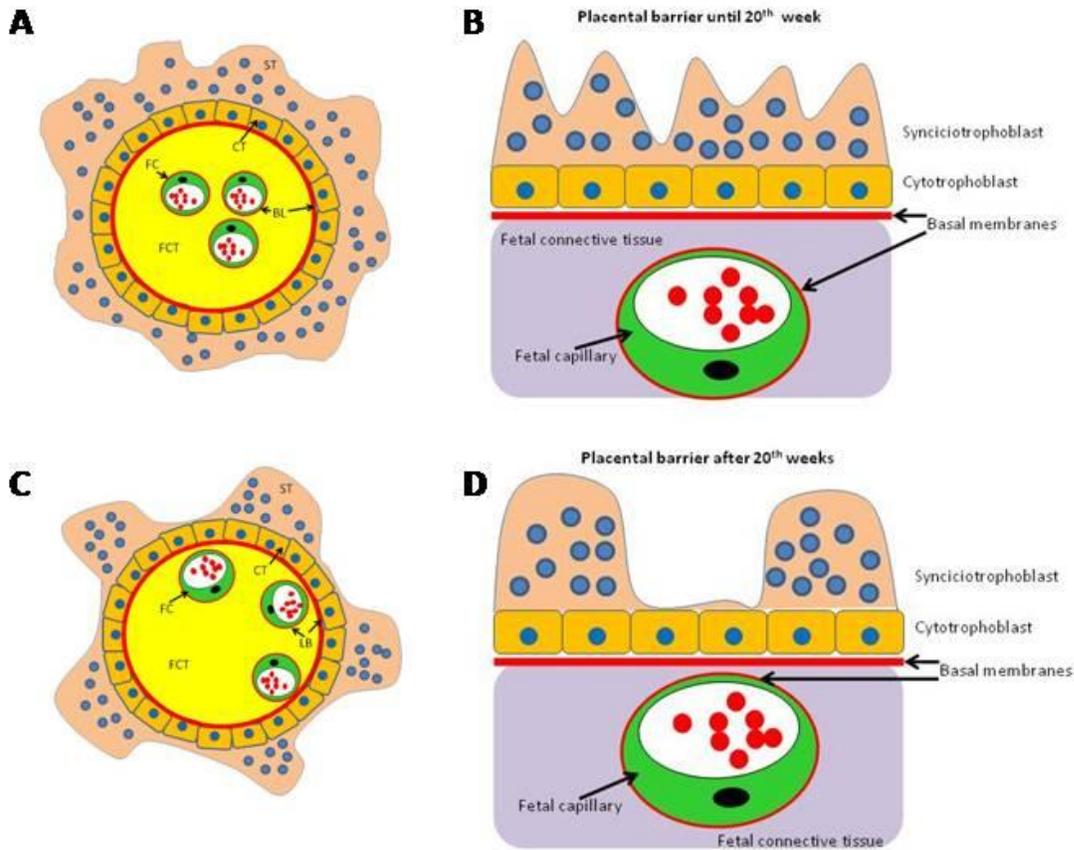


Formas celulares de *Trypanosoma cruzi*:

El parásito presenta tres formas celulares diferentes: **(A)** tripomastigote, forma infectante, no proliferativa; **(B)** epimastigote, forma multiplicativa que se sitúa en el tubo digestivo del agente vector y en cultivos; y **(C)** amastigote, que es la forma replicativa intracelular en los mamíferos.

Fuente: Universidad de Texas Arlington. <http://www.uta.edu/chagas/html/bioITcru.html>

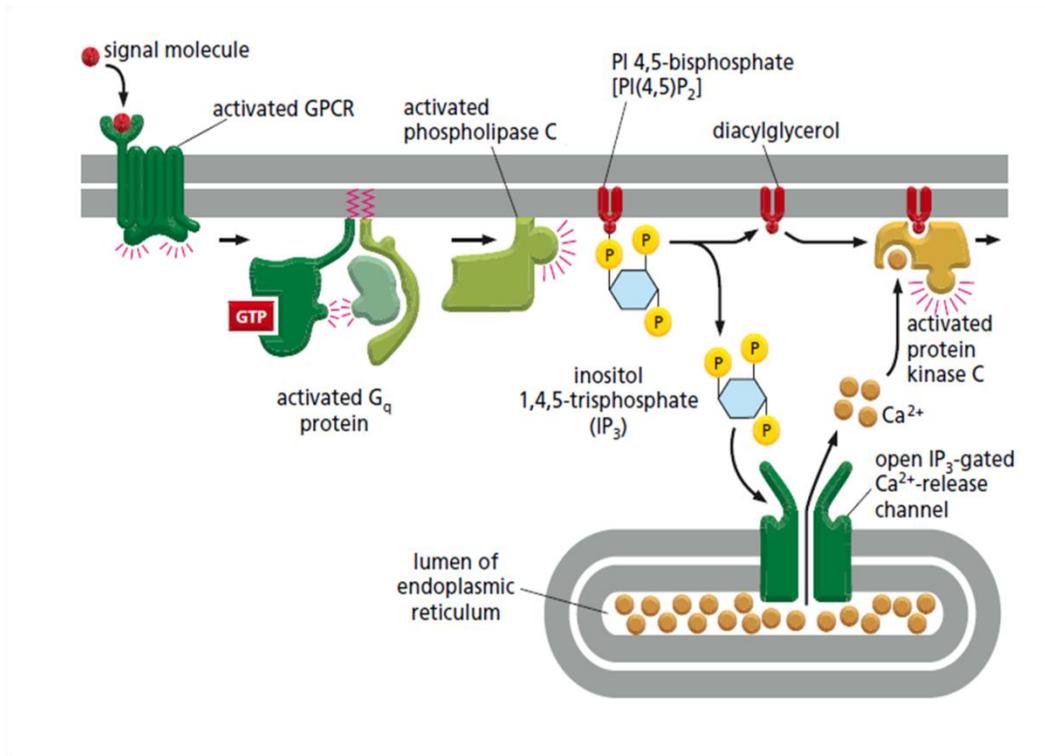
Figura 5



Barrera placentaria:

La barrera placentaria está compuesta por sinciotrofoblasto (ST), citotrofoblasto (CT), tejido conectivo fetal (FCT), capilares fetales (FC) y láminas basales entre el tejido conectivo fetal y trofoblasto (BLT) y alrededor de los capilares fetales (FCBL) (A-D). Después de la semana 20 de gestación, la placenta sufre modificaciones para favorecer el intercambio metabólico. Las células del citotrofoblasto disminuyen, los núcleos del sinciotrofoblasto se agrupan formando nodos y los capilares del tejido conectivo fetal se acercan al trofoblasto, adelgazándose la barrera placentaria (C-D). Fuente: Kemmerling *et al.*, 2010.

Figura 6

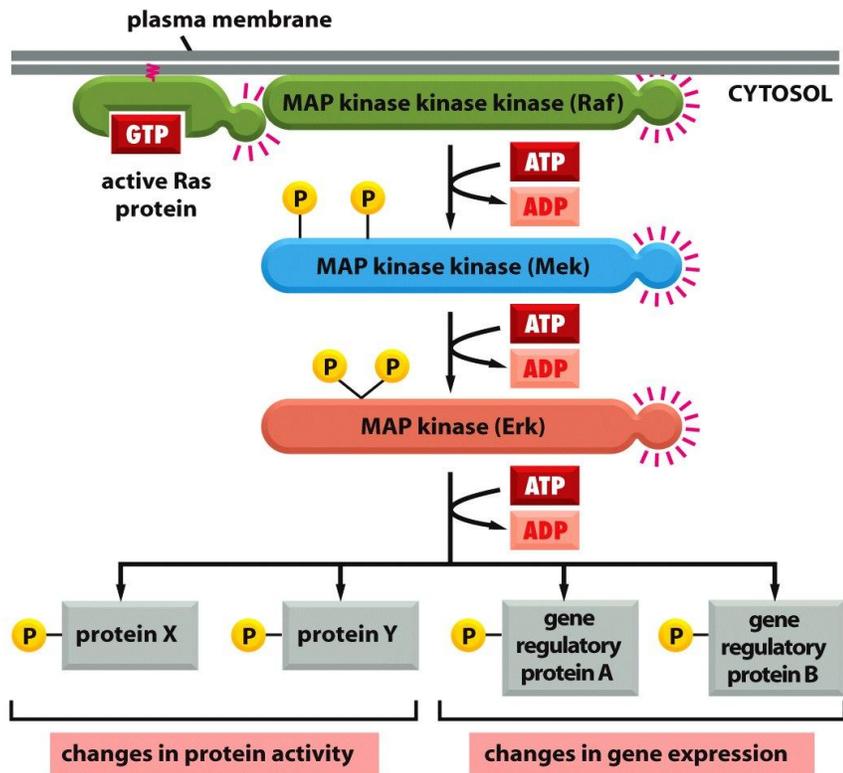


Vía de transducción e señal PLC- γ :

La activación de receptores acoplados a proteínas G (GPCR) inducen la unión de la PLC- γ a la membrana plasmática vía proteína G. PLC- γ hidroliza a PI(4,5)P₂ generándose diacilglicerol (DAG) e inositol 1,4,5-trifosfato (IP₃). IP₃ se une a canales de Ca²⁺ (receptores IP₃) en la membrana del retículo endoplásmico induciendo la apertura de estos canales y la con la consecuente liberación de Ca²⁺ desde el retículo endoplásmico hacia el citoplasma.

Fuente: Molecular Biology of the Cell, 2008

Figura 7

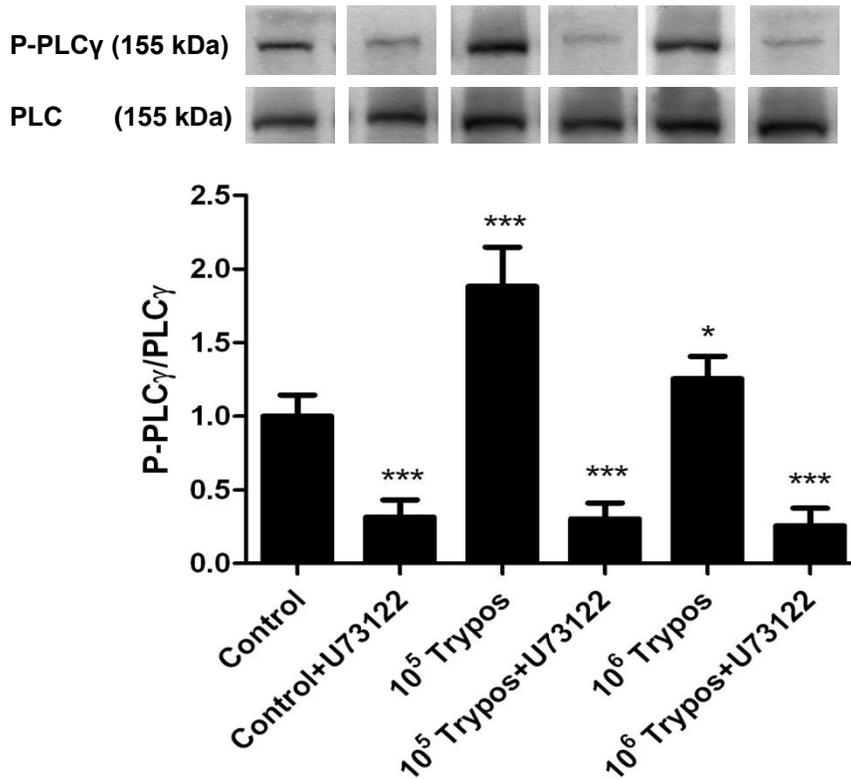


Vía de transducción de señales ERK1/2 MAPK:

La proteína ras activa (unida a GTP) recluta a MAP quinasa quinasa quinasa, (RAF) a la membrana plasmática y la fosforila. Luego RAF fosforila a MAP quinasa quinasa (MEK), que a su vez fosforila a MAPK (ERK). ERK fosforila una variedad de proteínas río abajo, incluyendo otras proteína quinasas, como factores de transcripción. La activación de esta vía induce cambios en la expresión génica y actividad proteica.

Fuente: Molecular Biology of the Cell, 2008

Figura 8

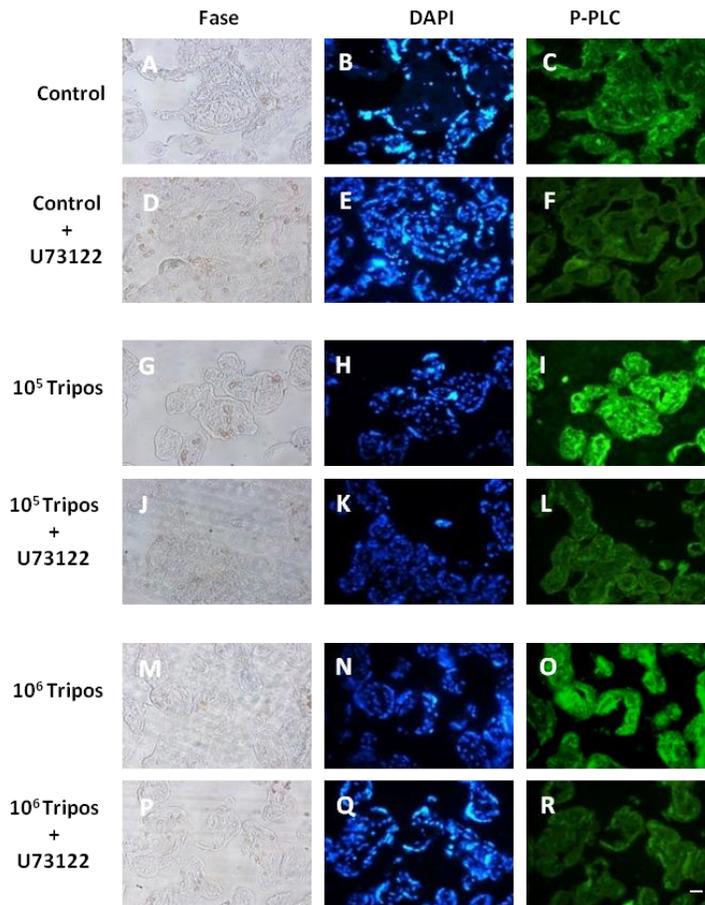


***T. cruzi* induce la activación de la vía PLC- γ en vellosidades coriónicas placentarias humanas infectadas *ex vivo*:**

Vellosidades coriónicas fueron incubadas en presencia y ausencia de 10⁵ y 10⁶ tripomastigotes de la cepa Dm28c durante 24 horas a 37°C y en presencia y ausencia de U73122 (100 μ M).

Se observan los niveles de la fosforilación de PLC- γ detectadas mediante Western blot, que se expresan como razón P-PLC- γ /PLC- γ obtenida mediante análisis densitométrico. Las muestras incubadas con 10⁵ y 10⁶ tripomastigotes presentan un mayor nivel de fosforilación de PLC- γ respecto al control. Se utilizó el test estadísticos ANOVA seguido por "Dunnett's post test". * p \leq 0,05 *** p \leq 0,001.

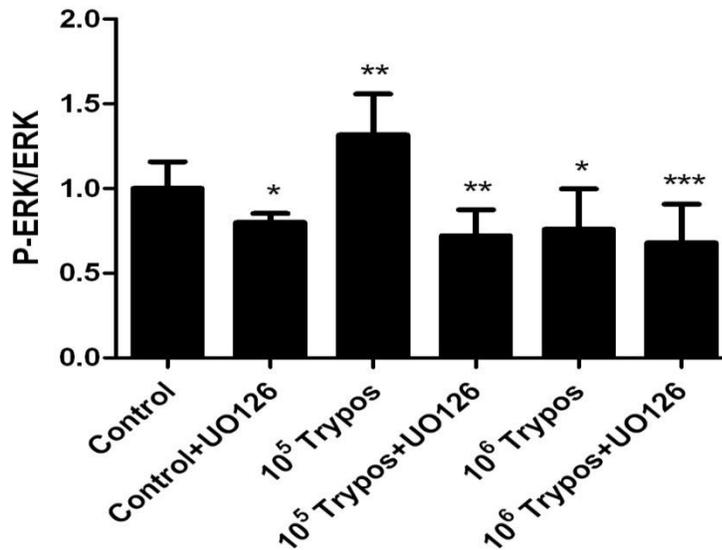
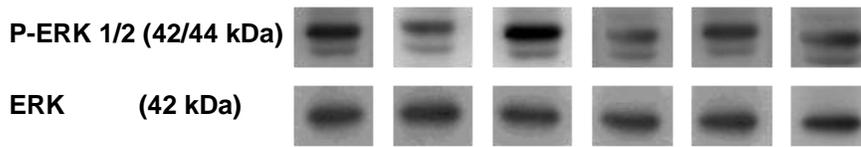
Figura 9



***T. cruzi* induce la activación de la vía PLC- γ en vellosidades coriónicas placentarias humanas infectadas *ex vivo*:**

Vellosidades coriónicas fueron incubadas en presencia y ausencia de 10^5 y 10^6 tripomastigotes de la cepa Dm28c durante 24 horas a 37°C y en presencia y ausencia de U73122 ($100\mu\text{M}$). Se observa un franco aumento de la inmunoreactividad para P-PLC- γ en las vellosidades incubadas con 10^5 (G-I) y 10^6 (M-O) tripomastigotes respecto al control (A-C) o en presencia del inhibidor (D-F; J-L; P-R). Las muestras fueron procesadas para inmunofluorescencia de rutina, Barra: $25\mu\text{m}$.

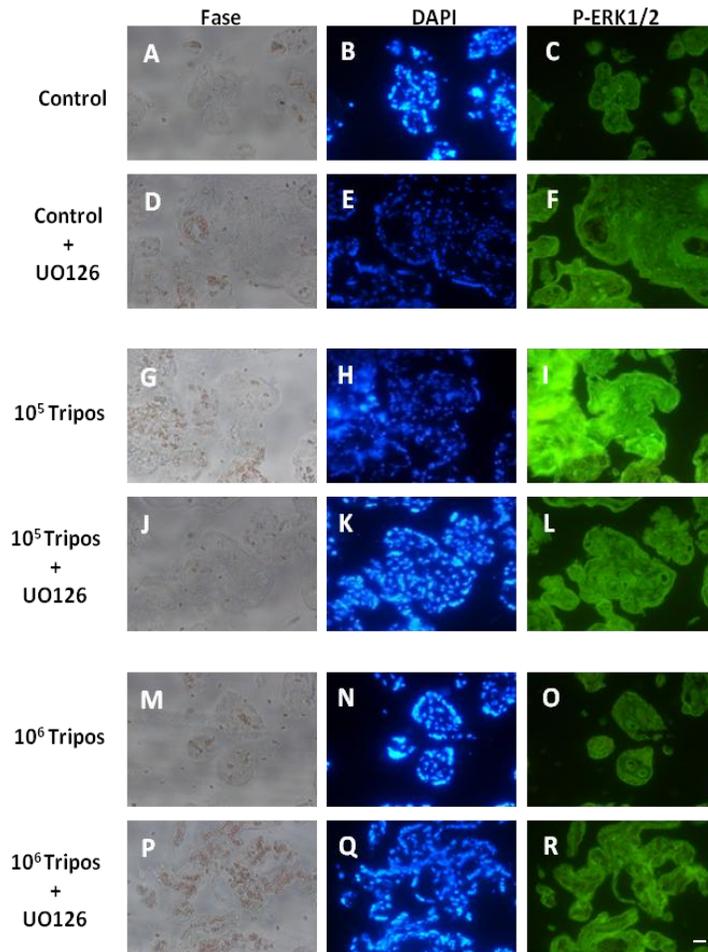
Figura 10



Modulación de la vía ERK1/2 MAPK por *T. cruzi* en vellosidades coriónicas placentarias humanas infectadas *ex vivo*

Vellosidades coriónicas fueron incubadas en presencia y ausencia de 10⁵ y 10⁶ tripomastigotes de la cepa Dm28c durante 24 horas a 37°C y en presencia y ausencia de UO126 (10µM). Se observan los niveles de la fosforilación de ERK1/2 detectadas mediante Western blot, que se expresan como razón P-ERK/ERK obtenida mediante análisis densitométrico. Las muestras incubadas con 10⁵ tripomastigotes presentan un mayor nivel de fosforilación de ERK respecto al control. Por el contrario, las muestras incubadas con 10⁶ tripomastigotes presentan menor nivel de fosforilación de ERK1/2 respecto al control. Se utilizó el test estadístico ANOVA seguido por “Dunnett’s post test”. * p≤0,05 ** p≤0,01 *** p≤0,001.

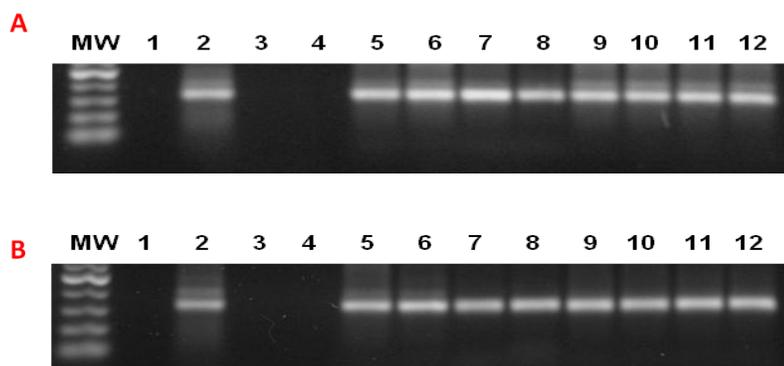
Figura 11



Modulación de la vía ERK1/2 MAPK por *T. cruzi* en vellosidades coriónicas placentarias humanas infectadas *ex vivo*

Vellosidades coriónicas fueron incubadas en presencia y ausencia de 10^5 y 10^6 tripomastigotes de la cepa Dm28c durante 24 horas a 37°C y en presencia y ausencia de UO126 ($10\mu\text{M}$). Se observa un franco aumento de la inmunoreactividad para P-ERK en las vellosidades incubadas con 10^5 tripomastigotes (**G-I**) respecto al control (**A-C**) o en vellosidades incubadas con la mayor concentración de parásitos (**M-O**) o en presencia del inhibidor (**D-F; J-L, P-R**). Las muestras fueron procesadas para inmunofluorescencia de rutina, Barra: $25\mu\text{m}$.

Figura 12



El uso de inhibidores de las vías de transducción de señales PLC- γ o ERK1/2 MAPK no impide la infección *ex vivo* de vellosidades coriónicas con *T. cruzi*:

Vellosidades coriónicas fueron incubadas en presencia y ausencia de 10^5 y 10^6 tripomastigotes de la cepa Dm28c durante 24 horas a 37°C y en presencia y ausencia del inhibidor U73122 (100 μ M) en panel **A** ó UO126 (10 μ M) en panel **B**.

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

S35: 5'-AAATAATGTACGGGKGAGATGCAT-3';

S36: 5'-GGGTTTCGATTGGGGTTGGTGT-3'.

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

MW: Marcadores de peso molecular

- 1: Control negativo (sin DNA)
- 2: DNA de tripomastigotes
- 3: DNA de vellosidades coriónicas sin infectar
- 4: DNA de vellosidades coriónicas sin infectar e incubada con U73122 (100 μ M) en A ó UO126 (10 μ M) en B
- 5-6: DNA de vellosidades coriónicas infectadas *ex vivo* con 10^5 tripomastigotes
- 7-8: DNA de vellosidades coriónicas infectadas *ex vivo* con 10^5 tripomastigotes e incubada con U73122 (100 μ M) en A ó UO126 (10 μ M) en B
- 9-10: DNA de vellosidades coriónicas infectadas *ex vivo* con 10^6 tripomastigotes
- 11-12: DNA de vellosidades coriónicas infectadas *ex vivo* con 10^6 tripomastigotes e incubada con U73122 (100 μ M) en A ó UO126 (10 μ M) en B

BIBLIOGRAFÍA

- ALBERTS, B.; JOHNSON, A.; LEWIS J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WALTER, P.** 2008. *Molecular Biology of the Cell*; Fifth Edition; Garland Science; New York.15: 909-931p.
- ANDRADE, LO.; ANDREWS, NW.** 2005. The *Trypanosoma cruzi*-host-cell interplay: location, invasion, retention. *Nat. Rev. Microbiol.* 3(10):819-23.
- ANDREWS, NW.** 1995. Lysosome recruitment during host cell invasion by *Trypanosoma cruzi*. *Trends in Biology*, 5: 133-137.
- AMINO, R.; MARTINS, RM.; PROCOPIO, J.; HIRATA, IY.; JULIANO, MA.; TRIALYSIN.** 2002. A novel pore-forming protein from saliva of hematophagous insects activated by limited proteolysis. *J BiolChem* 277:6207-6213
- APT, W.; ARRIBADA, A.; ZULANTAY, I.** 2009. Centennial of chagas disease (1909-2009). *Rev Méd Chile* 2009; 137: 719-722
- AUFDERHEIDE, AC.; SALO, W.; MADDEN, M.; STREITZ, J.; BUIKSTRA, J.; GUHL, F.; ARRIAZA, B.; RENIER, C.; WITTMERS, LE JR.; FORNACIARI, G.; ALLISON, M.** 2004. A 9,000-year record of Chagas' disease. *Proc. Nat.l Acad. Sc.i USA.* 101(7):2034-9.
- BANCROFT, J.; GAMBLE, M.** 2008. *Theory and practice of histological techniques.* 6^a ed. Churchill Livingstone. Philadelphia, USA. 21:433-473.
- BURLEIGH, BA.; ANDREWS, NW.** 1995. The mechanisms of *Trypanosoma cruzi* invasion of mammalian cells. *Annu. Rev. Microbiol.* 49:175-200.
- BURLEIGH, BA.; WOOLSEY, AM.** 2002. Cell signalling and *Trypanosoma cruzi* invasion. *Cell Microbiol.* 4(11):701-11.
- 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.
- CARLIER, Y.; TRUYENS, C.** 2010. Maternal-fetal transmission of *Trypanosoma cruzi* to congenital chagas disease: definitions and limits. *In:* *American trypanosomiasis Chagas disease: One hundred years of research.* Elsevier Insights. Londres, Inglaterra. pp. 539-582.

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

COURA, JR. 2007. Chagas disease: what is known and what is needed: a background article. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* Oct 30;102 Suppl 1:113-22.

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

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

CHUENKOVA, MV.; PEREIRA, MA. 2001. The *T. cruzi* trans-sialidase induces PC12 cell differentiation via MAPK/ERK pathway. *Neuroreport.* 12(17):3715-8.

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

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

DUASO, J.; ROJO, G.; CABRERA, G.; GALANTI, N.; BOSCO, C.; MAYA, JD.; MORELLO, A.; KEMMERLING, U. 2010. *Trypanosoma cruzi* induces tissue disorganization and destruction of chorionic villi in an *ex vivo* infection model of human placenta. *Placenta* 31: 705-711.

DUASO, J.; ROJO, G.; JAÑA, F.; GALANTI, N.; CABRERA, J.; BOSCO, C.; LÓPEZ-MUÑOZ, R.; MAYA, JD.; FERRERIRA, J.; KEMMERLING, U. 2011a. *Trypanosoma cruzi* induces apoptosis in *ex vivo* infected human chorionic villi. *Placenta* 32 (2011): 356-361

DUASO, J.; YANEZ, E.; CASTILLO, C.; GALANTI, N.; CABRERA, G.; CORRAL, G.; MAYA, J.D.; ZULANTAY, I.; APT, W.; KEMMERLING, U. 2011b. Reorganization of extracellular matrix in placentas from women with asymptomatic Chagas' disease:

Mechanism of parasite invasion, or local placental defense? . J TropMed .
doi:10.1155/2012/758357.

FAVORETO, S.; DORTA, ML.; YOSHIDA, N. 1998. *Trypanosoma cruzi* 175-kDa protein tyrosine phosphorylation is associated with host cell invasion. *Experimental Parasitology*, 89: 188-194.

FRIEDMAN, JF.; MITAL, P.; KANZARIA, HK.; OLDS, GR.; KURTIS, JD. 2007. Schistosomiasis and pregnancy. *Trends Parasitol.* 23(4):159-64.

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

HILL, C.; TREISMAN, R. 1995. Transcriptional regulation by extracellular signals: mechanisms and specificity. *Cell* 80, 199-211.

HUPPERTZ, B.; KINGDOM, JC. 2004. Apoptosis in the trophoblast--role of apoptosis in placental morphogenesis. *J Soc. Gynecol. Investig. Sep;*11 (6) :353-62.

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.

KEMMERLING, U.; BOSCO, C.; GALANTI, N. 2010. Infection and invasion mechanism of *Trypanosoma cruzi* in the congenital transmission of Chagas' disease: A proposal. *Biol Res* 46(3): 307-316.

KEMMERLING, U.; MUÑOZ, P.; MULLER, M; SÁNCHEZ, G.; AYLWIN, ML.; KLANN, E.; CARRASCO, MA.; HIDALGO, C. 2007. Calcium release by ryanodine receptors mediates hydrogen peroxide-induced activation of ERK and CREB phosphorylation in N2a cells and hippocampal neurons. *Cell Calcium.* 41(5):491-502

KIERNAN, J.A. 2008. *Histological and histochemical methods : theory and practice*, 4th. Scion publishing Ltd. Oxfordshire, U.K.

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

LI, K.; WANG, A.; SAH, R. 2003. Microenvironment regulation of extracellular signal-regulated kinase activity in chondrocytes: effects of cultura configuration, interleukin-1, and compressive stress. *Arthritis Rheum.* 48, 689-699.

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.

MALLIMACI, M.C.; SOSA-ESTANI, S.; RUSSOMANDO, G.; SANCHEZ, Z.; SIJVARGER, C.; ALVAREZ, IM.; BARRIONUEVO, L.; LOPEZ, C.; SEGURA, E. 2010. Early diagnosis of congenital *Trypanosoma cruzi* infection, using shedacute phase antigen, in Ushuaia, Tierra del Fuego, Argentina. *Am J Trop Med Hyg* 82(1): 55-9.

MARSHALL, C. 1995. Specificity of receptor tyrosine quinasa signalling: transient versus sustained extracelular signal-regulated kinase activation. *Cell* 80, 179-185.

MOORE, KL.; PERSAUD, T. 2004. Embriología clínica: El Desarrollo Del Ser Humano. 7ª Edición. Elsevier. Madrid, España. 7:120-131.

MORELLO, A.; LETELIER, ME.; 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.

MOTT A.; LENORMAND G.; COSTALES J.; FREDBERG JJ.;BURLEIGH BA. 2009. Modulation of host cell mechanics by *Trypanosoma cruzi*. *J Cell Physiol.* 218(2):315-22.

MUKHERJEE, S.; HUANG, H.; PETKOVA, SB.; ALBANESE, C.; PESTELL, RG.; BRAUNSTEIN, VL.; CHRIST, GJ.; WITTNER, M.; LISANTI, MP.; BERMAN, JW.; WEISS, LM.; TANOWITZ, HB. 2004. *Trypanosoma cruzi* infection activates extracellular signal-regulated kinase in cultured endothelial and smooth muscle cells. *Infect Immun.* 72(9):5274-82.

NAGAJYOTHI, F.; DESRUISSEAUX, M.; BOUZAHZAH, B.; WEISS, LM.; ANDRADE DDOS, S.; FACTOR, SM.; SCHERER, PE.; ALBANESE, C.; LISANTI, MP.; TANOWITZ, HB. 2006. Cyclin and caveolin expression in an acute model of murine Chagasic myocarditis. *Cell Cycle* 5(1):107-12.

NONG, L.; YIN, G.; REN, K.; TANG, J.; FAN, W. 2010. Periodic mechanical stress enhances rat chondrocyte area expansion and migration through Src-PLC- γ 1-ERK 1/2 signaling. *Cell* 89, 705-711.

OLEA. 1998. Situación Epidemiológica de la Enfermedad de Chagas en Chile. [en línea] <<http://epi.minsal.cl/epi/html/public/chagaschile.htm>> [consulta: 02-10-2011].

PARKER, E.; SETHI, A. 2011. Chagas disease: coming to a place near you. *Dermclin*, 29(1): 53-62.

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

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

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

RODRIGUEZ, A.; RIOULT, MG.; ORA, A.; ANDREWS, N. 1995. A *trypanosome*-soluble factor induces IP₃ formation, intracellular Ca²⁺ mobilization and microfilament rearrangement in host cells. *Journal of Cell Biology*, 129: 1263-1273.

ROGERSON, SJ.; HVIID, L.; DUFFY, PE.; LEKE, RF.; TAYLOR, DW. 2007. Malaria in pregnancy: pathogenesis and immunity. *Lancet. Infect. Dis.* 7(2):105-17

SALAS, C.; TAPIA, RA.; CIUDAD, K.; ARMSTRONG, V.; ORELLANA, M.; KEMMERLING, U.; FERREIRA, J.; MAYA, JD.; MORELLO, A. 2008. *Trypanosoma cruzi*: activities of lapachol and alpha- and beta-lapachone derivatives against epimastigote and trypomastigote forms. *Bio org. Med. Chem.* 15;16(2):668-74.

SCHMUNIS, GA. 2007. Epidemiology of Chagas disease in non-endemic countries: the role of international migration. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 30;102 Suppl 1:75-85.

SOARES, MB.; 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.

SYME M.; PAXTON J.; KEELAN JA. 2004. Drug transfer and metabolism by the human placenta. *ClinPharmacokinet.* 43(8):487-514.

TARDIEUX I, NATHANSON MH & ANDREWS NW. 1994. Role in host cell invasion of *Trypanosoma cruzi*-induced cytosolic free Ca^{2+} transient. *Journal of Experimental Medicine*, 179: 1017-1022.

TARDIEUX, I.; WEBSTER, P.; RAVESLOOT, J.; BORON, W.; LUNN, JA.; HUSER, JE.; ANDREWS, NW. 1992. Lysosome recruitment and fusion are early events required for *Trypanosoma* invasion of mammalian cells. *Cell*, 71: 1117-1130.

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

TEIXEIRA, A.; HECHT M.; GUIMARO M.; SOUSA A.; NITZ N. 2011. Pathogenesis of chagas' disease: parasite persistence and autoimmunity. *Clin Microbiol Rev.* 24(3):592-630.

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

VIEITES, M.; OTERO, L.; SANTOS, D.; OLEA-AZAR, C.; NORAMBUENA, E.; AGUIRRE, G.; CERECETTO, H.; GONZÁLEZ, M.; KEMMERLING, U.; MORELLO, A.; MAYA, JD.; GAMBINO, D. 2009. Platinum-based complexes of bioactive 3-(5-nitrofuryl) acroleine thiosemicarbazones showing anti-*Trypanosoma cruzi* activity. *J. Inorg. Biochem.* 103(3):411-8.

VILLALTA, F.; ZHANG, Y.; BIBB, KE.; BURNS, JM JR; LIMA, MF. 1998. Signal transduction in human macrophages by gp83 ligand of *Trypanosoma cruzi*: trypomastigote gp83 ligand up-regulates trypanosome entry through the MAP kinase pathway. *Biochem Biophys Res Commun.* 249(1):247-52.

VINCENT, T.; HERMANSSON, M.; HANSEN, U.; AMIS, A.; SAKLATVALA, J. 2004. Basic fibroblast growth factor mediates transduction of mechanical signals when articular cartilage is loaded. *Arthritis Rheum.* 50, 526-533.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. 2007. Proyecto “World Health Organization on behalf of the Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases: Reporte del grupo de trabajo científico sobre la enfermedad de Chagas”. Buenos Aires, Argentina. World Health Organization. 104p.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. 2007. Reporte del grupo de trabajo científico sobre la enfermedad de chagas. Programa Especial de Investigación y enseñanza sobre enfermedades tropicales (TDR).[World Health Organ Tech Rep Series. En línea] <<http://apps.who.int/tdr/svc/publications/tdr-research-publications/reportes-enfermedad-chagas>>[consulta: 06-11-2011].

WORLD HEALTH ORGANIZATION. 2002. Control of Chagas' disease. Report of the WHO Expert Committee. World Health Organ Tech. Rep. Series. 120p

YOSHIDA, N. 2006. Molecular basis of mammalian cell invasion by *Trypanosoma cruzi*. An Acad Bras Cienc. 78(1):87-111.

YOSHIDA, N. 2008. *Trypanosoma cruzi* infection by oral route How the interplay between parasite and host components modulates infectivity. Parasitol Int 57(2):105-9.

YOSHIDA, N.; FAVORETO, S JR.; FERREIRA, A.; MANQUE, P. 2000. Signal transduction induced in *Trypanosoma cruzi* metacyclic trypomastigotes during the invasion of mammalian cells. Braz J Med Biol Res vol.33 n.3

ZULANTAY I.; HONORES P.; SOLARI A.; APT W.; OSUNA A. 2004. Use of polymerase chain reaction (PCR) and hybridization assays to detect *Trypanosoma cruzi* in chronic chagasic patients treated with itraconazole or allopurinol. Diagn Microbiol Infect Dis 48 (4): 253–257.

ANEXOS

ANEXO 1



CONSENTIMIENTO INFORMADO

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

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

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

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

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

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

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

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



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

Voluntariedad: Su participación en esta investigación es totalmente voluntaria

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

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

Investigador:

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

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

Conclusión:

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

Nombre del sujeto

Firma

Fecha

Nombre de informante

Firma

Fecha

Ulrike Kemmerling

Nombre del investigador

Ulrike Kemmerling

Firma

26/6/08

Fecha

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

ANEXO 2



UNIDAD DE BIOSEGURIDAD
FACULTAD DE MEDICINA
UNIVERSIDAD DE CHILE

Santiago, 30 de Abril 2008.-

Señores
PROGRAMA FONDECYT
PRESENTE

Estimados señores

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

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

Tomé conocimiento: Profesora **Ulrike Kemmerling Weis**

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



* Se adjunta anexo IX.1 Proyecto Fondecyt

c.c.

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

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



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: 9786169 Email: ceiha@med.uchile.cl





UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE MEDICINA

COMITÉ DE ÉTICA DE INVESTIGACIÓN EN SERES HUMANOS

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

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



[Handwritten signature]
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*

