



UNIVERSIDAD DE CHILE

FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS
ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS



ESTUDIO DE LAS ALTERACIONES TISULARES EN PLACENTAS DE MADRES CON ENFERMEDAD DE CHAGAS CRÓNICA ASINTOMÁTICA

ERIKA DANIELA YÁNEZ DEL SOLAR

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

NOTA FINAL:

	NOTA	FIRMA
PROFESOR GUÍA : ULRIKE KEMMERLING
PROFESOR CONSEJERO: NORBEL GALANTI
PROFESOR CONSEJERO: MARIO DUCHENS

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

SANTIAGO, CHILE
2011

INDICE

RESUMEN	1
SUMMARY	2
INTRODUCCIÓN.....	3
REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	4
I. Epidemiología de la enfermedad de Chagas.....	4
Distribución geográfica	5
Incidencia y prevalencia	5
Aspectos económicos	5
Situación epidemiológica en Chile	6
II. Enfermedad de Chagas	7
Ciclo biológico	7
Características del parásito	8
Vías de transmisión de <i>T. cruzi</i>	8
Aspectos clínicos de la enfermedad de Chagas	9
Definición de caso para Chile.....	11
Diagnostico.....	11
III. Enfermedad de Chagas Congénita.....	12
Aspectos clínicos	13
Diagnostico.....	14
Tratamiento.....	15
IV. Mecanismo de invasión e infección congénita	16
La placenta humana	16
Interacción de <i>T. cruzi</i> con la placenta.	17
Alteraciones histopatológicas descritas en placentas chagasicas	19
Infección <i>ex vivo</i> de vellosidades coriónicas placentarias por <i>T. cruzi</i> :	20
HIPÓTESIS	21
OBJETIVO GENERAL	21
OBJETIVOS ESPECIFICOS	21
MATERIALES Y MÉTODOS.....	22
RESULTADOS	28
DISCUSIÓN.....	32
CONCLUSIÓN	38
FIGURAS	39
FIGURA 1	39
FIGURA 2	40

FIGURA 3	41
FIGURA 4	42
FIGURA 5	43
FIGURA 6	44
FIGURA 7	45
FIGURA 8	46
FIGURA 9	47
FIGURA 10	48
FIGURA 11.....	49
TABLA 1.....	50
BIBLIOGRAFÍA	51
ANEXOS	62
ANEXO 1	62
ANEXO 2	64
ANEXO 3	65

RESUMEN

La enfermedad de Chagas, causada por el protozoo *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*) es una parasitosis endémica en Latinoamérica. En los últimos años la transmisión vertical de este parásito ha cobrado cada vez mayor importancia epidemiológica. Sin embargo, los estudios sobre los mecanismos de la infección congénita siguen siendo escasos.

El objetivo de la presente memoria de título fue determinar si en placentas de madres infectadas con *T. cruzi* se observan daños tisulares similares.

Se analizaron 3 placentas de madres chagásicas (diagnosticadas mediante serología) cuyos bebés fueron negativos al examen parasitológico determinado mediante la técnica de microhematocrito post-parto, obtenidas en el Hospital de Illapel, IV Región. Se detectó el parásito en el tejido placentario mediante inmunofluorescencia y PCR. El daño en los distintos compartimentos tisulares fue determinado mediante tinción de hematoxilina eosina (análisis histopatológico), el daño en el tejido conectivo fue determinado histoquímicamente mediante tinción de Picro rojo sirio y tricrómica de Arteta, el daño en las láminas basales fue determinado mediante inmunohistoquímica (Anticuerpos anti-colágeno IV, anti-heparansulfato y anti-fibronectina).

Las placentas de madres chagásicas presentan degradación y destrucción del trofoblasto de las vellosidades coriónicas, destrucción selectiva de las láminas basales y desorganización de colágeno I del tejido conectivo fetal

Las alteraciones tisulares observadas pueden formar parte tanto de los mecanismos de infección como de los posibles mecanismos antiparasitarios placentarios locales. Se concluye que, la remodelación de la MEC de los tejidos placentarios, la carga parasitaria, junto con el estado inmunológico de la madre y el feto, determinan la probabilidad de la transmisión congénita de *T. cruzi*.

SUMMARY

Chagas' disease, produced by the protozoan *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*), is one of the most frequent endemic diseases in Latin America. In spite the fact that in the past few years *T. cruzi* congenital transmission has become of epidemiological importance, studies about this mechanism of infection are scarce. In order to explore some morphological aspects of this infection in the placenta, we analyzed placentas from *T. cruzi* infected mothers by immunohistochemical and histochemical methods. Infection in mothers, newborns, and placentas was confirmed by PCR and by immunofluorescence in the placenta. *T. cruzi* infected placentas present destruction of the syncytiotrophoblast and villous stroma, selective disorganization of the basal lamina, and disorganization of collagen I in villous stroma. Our results suggest that the parasite induces reorganization of this tissue component and in this way may regulate both inflammatory and immune responses in the host. Changes in the ECM of placental tissues, together with the immunological status of mother and fetus, and parasite load may determine the probability of congenital transmission of *T. cruzi*.

INTRODUCCIÓN

La enfermedad de Chagas, también llamada Tripanosomiasis americana, fue descrita en 1909 por el investigador brasileño Carlos Chagas. Esta patología es una zoonosis muy compleja producida por el protozoo hemoflagelado *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*).

Este parásito posee un ciclo de vida indirecto, en el que involucra insectos hematófagos como vectores biológicos (conocidos coloquialmente como vinchucas), y mamíferos, incluido el hombre, como hospederos definitivos. La principal vía de transmisión es la vectorial. Sin embargo, el parásito también puede transmitirse por medio de transfusiones de sangre, por vía placentaria o trasplante de órganos, entre otros.

Gracias a distintos programas de control de vectores, que se han implementado a lo largo de los últimos años, la transmisión vectorial ha ido disminuyendo y en la actualidad otras formas de transmisión, como la transmisión congénita, van adquiriendo mayor importancia epidemiológica.

La fisiopatología exacta de la infección congénita se desconoce. Sin embargo, se sabe que el parásito debe atravesar 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.

Estudios previos del laboratorio han demostrado que durante la infección *ex vivo* de vellosidades coriónicas placentarias humanas, *T. cruzi* induce desprendimiento y destrucción del trofoblasto, desorganización selectiva de los componentes de las láminas basales, del colágeno I en el tejido conectivo fetal así como muerte celular.

El objetivo de la presente tesis fue determinar si las alteraciones tisulares descritas previamente en los distintos compartimentos de las vellosidades coriónicas humanas en explantes infectados *ex vivo* con el parásito, también se observan en placentas de mujeres con enfermedad de Chagas crónica y asintomática.

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

La enfermedad de Chagas, o tripanosomiasis americana es una infección parasitaria causada por el protozoo hemoflagelado *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*). La enfermedad de Chagas es endémico en América Latina. Esta enfermedad fue descrita por primera vez en 1909 por el médico brasileño Carlos Chagas. Los estudios paleoparasitológicos más recientes han revelado la presencia de DNA de *T. cruzi* en el tejido de momias precolombinas de 9.000 años de antigüedad, proporcionando una visión histórica sobre una enfermedad que probablemente ha afectado a los humanos durante miles de años. Esta patología sigue teniendo una importante morbilidad y mortalidad y con esto grandes consecuencias socio-económicas (Parker y Sethi., 2011)

I. Epidemiología de la enfermedad de Chagas

Desde el punto de vista epidemiológico esta enfermedad tiene gran importancia en el ámbito médico y social en el continente americano. En la actualidad es una de las mayores preocupaciones en materia de salud pública para América Latina (Coura, 2007), siendo después de la malaria, la enfermedad ligada a vectores, de mayor prevalencia y mortalidad (World Health Organization, 2010). Adicionalmente, ocupa además, el cuarto lugar de importancia como carga de enfermedad en las Américas, después de las enfermedades respiratorias, las diarreas y el SIDA (Apt et al., 2008)

La Organización Mundial de la Salud (OMS) clasifica la enfermedad de Chagas como una enfermedad tropical abandonada. Esta designación implica que esta patología se asocia a condiciones socioeconómicas desfavorables, afectando principalmente poblaciones vulnerables, incluyendo grupos indígenas y rurales, mujeres, niños y ancianos (Parker y Sethi., 2011)

Las probabilidades de contraer la enfermedad de Chagas están directamente relacionadas con las condiciones de pobreza de la vivienda. Los triatomíneos se guarecen en grietas y tejados, por lo cual viviendas construidas en forma precaria resultan ideales. La constante migración campo-ciudad que ha ido en aumento constante en los últimos cuarenta años, ha cambiado el modelo epidemiológico clásico de la Tripanosomiasis americana asociada a viviendas rurales, convirtiéndola en una enfermedad rural y urbana (World Health Organization, 2010).

Distribución geográfica

Actualmente, la infección se encuentra en forma natural en el continente americano, desde el sur de California paralelo 43 latitud norte, hasta Latinoamérica, región central de Argentina paralelo 49 de latitud sur, zona donde habita el vector biológico (Apt et al.,2008). Se estima que existen por lo menos 28 millones de personas expuestas al riesgo de infección y que alrededor de 10 millones de personas estarían infectadas con *T. cruzi*. Estas personas se encuentran, en su mayoría, en las zonas endémicas de 21 países de América Latina: Argentina, Belice, la República Bolivariana de Venezuela, Brasil, Chile, Colombia, Costa Rica, Ecuador, El Salvador, Guayana francesa, Guatemala, Guyana, Honduras, México, Nicaragua, Panamá, Suriname, Paraguay, Perú, Estado Plurinacional de Bolivia y Uruguay (World Health Organization, 2010)(Figura 1)

Incidencia y prevalencia

Los casos de enfermedad de Chagas nuevos por año en Latinoamérica han disminuido enormemente, desde 700.000 en el año 1990 a 41.000 en el 2006, debido principalmente al control de vectores (triatominos). Sin embargo, los casos de Chagas congénito en 2006 fueron 14.385 (más de un tercio de los casos nuevos en el año 2006) por lo que esta forma de transmisión ha adquirido cada vez más importancia epidemiológica (World Health Organization, 2007, Figura 2), siendo parcialmente responsable de la “globalización de la enfermedad de Chagas”. La migración de personas infectadas desde países endémicos a países no endémicos como Canadá, EEUU, Australia, Japón y países de la comunidad europea ocurre por causas socio-económicas (Schmunis, 2007).

Aspectos económicos

El impacto económico y social de esta enfermedad es alto. 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 la enfermedad (Parker y Sethi, 2011).

Estudios costo/beneficio en diferentes países, demuestran que por cada dólar invertido en prevención, se ahorrarían entre 11 y 17 dólares en el manejo y tratamiento de pacientes en fase crónica sintomática de la enfermedad de Chagas. La decisión de incluir en los esquemas terapéuticos a todas las personas que presenten la infección, independientemente de la etapa de su enfermedad, mejoraría su calidad de vida y disminuiría los días potencialmente perdidos en el área laboral, aumentando así las expectativas de vida de las personas afectadas (Apt et al., 2008)

Situación epidemiológica en Chile

En Chile la transmisión vertical se considera accidental y se estima que hay más de 100.000 personas infectadas (World Health Organization, 2010). El área endémica se extiende desde la I a la VI región, incluyendo la Región Metropolitana. La población expuesta de esta área, corresponde a un 77% de la población total del país. Se estima, que los habitantes en riesgo de adquirir la enfermedad son aproximadamente 850.000 personas incluyendo áreas rurales y peri-urbanas. (Apt et al., 2008)

Según el ministerio de Salud, las tasas de incidencia de la enfermedad de Chagas se han mantenido relativamente constantes entre los años 1995 y 2005 (Figura 3). En el último informe sobre la enfermedad de Chagas en Chile se concluye, que la notificación de esta patología va en aumento, debido básicamente a dos factores:

- a. Desde el año 1986 la notificación y desde el año 1996 el tamizaje en donantes son obligatorios.
- b. 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).

II. Enfermedad de Chagas

T. cruzi es un protozooario hemoflagelado del orden Kinetoplastida, familia Trypanosomatidae, subgénero Schizotrypanum. En su cadena de transmisión intervienen un gran número de reservorios vertebrados y de insectos triatomíneos vectores que hacen imposible su erradicación (Guhl, 2007).

Ciclo biológico

T. cruzi posee un ciclo de vida indirecto, que comprende a varios insectos hematófagos (triatomíneos), como vectores biológicos, y a más de 150 especies de mamíferos, incluido el hombre, como hospederos definitivos. Los principales triatóminos vectores de *T. cruzi* en Sudamérica son *Triatoma infestans* (vinchuca), *Rhodnius prolixus* y *Panstrongylus megistus*. Además de *T. infestans* (ciclo domiciliario), en Chile se encuentran *Mepraia spinolai* y *Mepraia gajardoi* (ciclo silvestre) (World Health Organization, 2007).

Se han descrito tres ciclos de transmisión de la enfermedad: doméstico, peri-doméstico y silvestre. El ciclo doméstico es el de mayor relevancia para el hombre; se presenta en áreas rurales y periurbanas, generalmente por la picadura de un insecto parasitado por *T. cruzi* (Amino *et al.*, 2002).

En el ciclo de transmisión doméstico, perros y gatos son los principales reservorios que contribuyen a la mantención de la infección. En el ciclo peri-doméstico de la infección, los principales reservorios son roedores domésticos junto a aves de corral, ganado caprino, bovino y ovino. En el ciclo silvestre o selvático los principales reservorios son mamíferos del hábitat silvestre. Estos animales, aunque de escaso acceso al humano, son los que permiten la mantención del parásito e impiden la completa erradicación de *T. cruzi* (Tyler y Engman., 2001). Aves y reptiles son refractarios a la infección, se ha observado que luego de la inyección intramuscular o endovenosa de tripomastigotes estos desaparecen inmediatamente y no pueden ser recuperados desde la sangre (Texeira *et al.*, 2006).

El ciclo de vida de *T. cruzi* es complejo, con varias formas celulares tanto en el insecto vector como en los hospederos mamíferos. El insecto vector, a diferencia del hospedero mamífero, parece no sufrir alteraciones causadas por la

infección del parásito. Las formas sanguíneas no-replicativas (tripomastigotes) y las formas replicativas intracelulares (amastigotes) son las formas celulares identificables en el hospedero mamífero, mientras que las formas replicativas extracelulares (epimastigotes) y las formas infectivas no replicativas (tripomastigotes metacíclicos) se encuentran en el vector triatomino (Rassi *et al.*, 2010)

Características del parásito

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

1. **Tripomastigotes**, que miden aproximadamente 20 μm de largo, son fusiformes y presentan un kinetoplasto sub-terminal. No son capaces de multiplicarse y representan la forma infectiva para mamíferos (Figura 4a)
2. **Epimastigotes**, que también miden aproximadamente 20 μm de largo, su kinetoplasto es anterior al núcleo y son fusiformes. Representan la forma de multiplicación del parásito en el intestino del insecto vector (Figura 4b)
3. **Amastigotes**, que representan la forma replicativa intracelular de *T. cruzi*, miden unos 2 μm de diámetro, son redondeados y con flagelo no emergente. Luego de ocho o nueve divisiones celulares se diferencian a tripomastigotes, lisan la célula y se liberan al torrente sanguíneo (Figura 4c)

Vías de transmisión de *T. cruzi*

La transmisión de la enfermedad se produce, principalmente, por la picadura del triatomino parasitado con *T. cruzi* que al alimentarse de sangre de un mamífero deposita sobre la piel deyecciones contaminadas con tripomastigotes metacíclicos infectivos. Éstos ingresan al torrente sanguíneo a través de la piel y mucosas, proceso que es facilitado por las lesiones provocadas por el rascado en la zona de la picadura y por enzimas proteolíticas de la saliva del insecto (Amino *et al.*, 2002). Una vez en el organismo, los tripomastigotes invaden a células presentadoras de antígeno y se diferencian a amastigotes, forma celular de replicación citoplasmática obligada (Coura, 2007). Luego de una

serie de divisiones celulares los amastigotes se diferencian a tripomastigotes, los cuales lisan las células infectadas y son liberados al torrente sanguíneo desde donde pueden invadir cualquier célula nucleada (los principales tejidos blancos son, músculo esquelético, músculo liso visceral, células de la glía del sistema nervioso central y placenta) o ser ingeridos por otra vinchuca (Prata, 2001).

Cuando un insecto vector se alimenta de un mamífero infectado, los tripomastigotes sanguíneos ingresan al tracto digestivo del insecto y en su intestino medio se diferencian a epimastigotes, forma celular de replicación extracelular. Estos epimastigotes, a medida que avanzan en el tracto intestinal, se diferencian a tripomastigotes metacíclicos, completando así el ciclo de vida de *T. cruzi* (Tyler y Engman, 2001) (Figura 5).

Además de la transmisión vectorial existen otras formas de infección como las transfusiones sanguíneas, responsable del 10% de los casos en países como Estados Unidos, donde la creciente inmigración latina ha diseminado la enfermedad (Andrade y Andrews., 2005). El contagio también puede producirse por trasplante de órganos, a través de la ingesta de alimentos y bebidas contaminadas con excrementos de triatomíinos (Jamison *et al.*, 2006) y por transmisión congénita en madres chagásicas (Prata, 2001)

Aspectos clínicos de la enfermedad de Chagas

Dado su evolución, esta enfermedad cursa hacia la cronicidad en personas inmunocompetentes pasando por tres etapas: aguda, latente y crónica, pudiendo causar la muerte en diferentes etapas de la infección (Apt *et al.*, 2008).

1. **Fase aguda:** Esta fase comienza inmediatamente después de la inoculación del parásito. Se caracteriza por una elevada parasitemia, debido a la intensa multiplicación del parásito en células presentadoras de antígenos y la posterior liberación de tripomastigotes a la circulación periférica.

Esta fase es generalmente asintomática. Sin embargo, un porcentaje menor de los pacientes pueden presentar manifestaciones de infección generalizada tales como fiebre, anorexia, linfadenopatías regionales, hepato y esplenomegalia moderada, edema bpalpebral unilateral o signo de Romaña y miocarditis. Esta sintomatología es más frecuente en niños. Sin tratamiento, el 5-10% de los pacientes sintomáticos muere a causa de encefalomielititis o falla cardíaca severa y, raramente, por muerte súbita (Prata, 2001).

2. **Fase de latencia:** Los casos de infección aguda que no presentan manifestaciones clínicas pasan a una fase de latencia que puede extenderse por meses e incluso años. 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 (Texeira *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 permanecen en esta fase, de los cuales el 70% de los infectados no muestran ninguna manifestación detectable de la enfermedad de Chagas. (Texeira *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)

3. **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; Texeira *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).

Los signos clínicos más frecuentes encontrados en los pacientes sintomáticos son: hepatomegalia, esplenomegalia, hepatoesplenomegalia, meningoencefalitis, insuficiencia cardíaca y anemia. Por ello, la hepatomegalia y la esplenomegalia deben ser tenidas en cuenta en zonas endémicas para sospechar la enfermedad, y más aún si existen antecedentes maternos (Moya y Moretti., 1997).

Definición de caso para Chile

1. *Caso sospechoso agudo*. Persona con fiebre sin otra explicación y/o hepato-esplenomegalia y/o chagoma de inoculación que: (Apt et al., 2008)
 - Es residente en zona endémica o tiene el antecedente de haber estado en dichas zonas en los últimos seis meses.
 - Ha tenido contacto con sangre de terceros a través de transfusiones, uso de drogas intravenosas o accidentes laborales u otro material biológico.
2. *Caso confirmado*. Caso clínicamente compatible, que es ratificado por el laboratorio. (Apt et al., 2008)
 - Enfermedad de Chagas congénita: RN hijo de madre infectada con *T. cruzi*, que presenta reacción de polimerasa en cadena (PCR) para *T. cruzi* positiva, y cuyos exámenes directos son positivos, demostrando la presencia de parásitos viables en la sangre.
 - Donante de sangre positivo: Persona con serología positiva para *T. cruzi*, (ELISA IgG), confirmada por inmunofluorescencia indirecta (IFI IgG).

Diagnostico

Puede ser realizado por diferentes técnicas. El diagnóstico parasitológico directo, puede ser a través de la Observación microscópica al fresco, Gota gruesa, Método de concentración: MicroStrout, Xenodiagnóstico, Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y la Biopsia (Apt et al., 2008).

El diagnóstico serológico se realiza generalmente mediante pruebas convencionales: Inmunofluorescencia indirecta (IFI), enzima inmuno ensayo (ELISA) y hemaglutinación indirecta (HAI). (Bern et al., 2008).

Son utilizados 2 criterios para el diagnóstico:

- Historia compatible con la epidemiología de la enfermedad.
- Estudios parasitológicos realizado mediante al menos 2 metodologías positivas diferentes (parasitológicas directas y/o indirectas) (Gascon et al., 2007).

III. Enfermedad de Chagas Congénita

A nivel mundial la transmisión congénita cobra cada vez mayor importancia epidemiológica. La seroprevalencia en mujeres embarazadas puede llegar hasta un 80% y las tasas de infección congénita varían entre un 1-21% (Kemmerling et al., 2010). En Brasil la tasa de transmisión congénita es de un 1% y en Argentina, Bolivia, Chile y Paraguay varía entre un 4–12%. En Chile la tasa de transmisión congénita en regiones endémicas es de un 8,4 % (Jercic et al 2010). En nuestro país, se reportan anualmente 800–1000 casos de enfermedad de Chagas congénita (Lorca *et al.*, 2006). La transmisión congénita no puede ser prevenida debido a que las drogas disponibles para el tratamiento de la enfermedad de Chagas pueden ser teratogénicas (Castro *et al.*, 2006). Sin embargo, la detección temprana y el tratamiento de la infección congénita alcanzan tasas de cura cercanas al 100% (World Health Organization, 2010).

Estudios sugieren que la vivienda en las zonas de alta densidad vectorial, se asocia a una mayor parasitemia materna y a un severo aumento del riesgo de casos graves y mortales de enfermedad de Chagas congénita. (Torrico et al., 2006).

Es posible que las mujeres en la fase aguda chagásica tengan mayores probabilidades de transmitir la infección, teniendo en cuenta la intensidad de la parasitemia en estos casos asociada a una reducción de la producción de IFN- γ . En la fase crónica, la baja parasitemia podría reducir al mínimo las posibilidades de transmisión transplacentaria (Fragata et al., 2008).

Se ha asociado el número de parásitos en madres infectadas, las cepas implicadas, factores placentarios, y / o la inmunidad materna con el riesgo de la transmisión congénita de *T. cruzi* (Riera et al., 2006). Sin embargo, no se ha establecido una posible asociación de este modo de transmisión con factores tales como la edad materna, número partos anteriores, o el origen geográfico (Sánchez et al., 2005). Se ha descrito infecciones congénitas en embarazos sucesivos, como también en gemelos, incluso se ha descrito infección congénita de segunda generación (Lillyan et al., 2009).

La infección congénita implica una transmisión prenatal o “*in utero*” o una transmisión perinatal (al momento del parto) de parásitos vivos que persisten después del nacimiento. Se excluye la transmisión post natal de parásitos (principalmente a través de la leche materna), la transmisión de parásitos muertos, DNA parasitario, u otras moléculas liberadas de los parásitos a la madre que pueden ser encontradas en sangre fetal (Carlier y Truyens., 2010).

El término “infección congénita con *T. cruzi*” se refiere tanto a los casos sintomáticos como asintomáticos de infección, mientras que el término “enfermedad de Chagas congénita” debería ser utilizado solo para los casos sintomáticos (Carlier y Truyens., 2010).

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

- a) Madre serológica y/o parasitológicamente positiva
- b) Parásitos detectados en el momento del nacimiento, o después del mismo si se puede descartar otra vía de transmisión
- c) Anticuerpos detectados después de los 9 - 12 meses de vida, cuando se puede asegurar que no son de origen materno y se descarta otra vía de transmisión. (Carlier, 2005).

Aspectos clínicos

Los casos de enfermedad de Chagas congénita son en su mayoría asintomáticos o monosintomáticos y afectan gravemente a la supervivencia del recién nacido (Gürtler et al., 2003). El recién nacido sintomático presenta manifestaciones clínicas similares a otras etiologías del síndrome de TORCH (estas siglas engloban 4 infecciones: Toxoplasmosis, Rubéola, Citomegalovirus y Herpes que comparten características clínicas semejantes) y debe considerarse esta infección dentro del diagnóstico diferencial de este síndrome (Lillyan et al., 2009).

El recién nacido puede ser prematuro o de término, pequeño para la edad gestacional, destacándose los signos clínicos de: hepatoesplenomegalia, ictericia, anemia, neumonía intersticial, compromiso variable del SNC (que puede manifestarse incluso sólo por alteraciones histoquímicas en el LCR), miocarditis,

compromiso del fondo de ojo y de la piel. La ausencia de síntomas al nacer no implica ausencia de infección y de enfermedad a futuro; por el contrario, ese niño puede presentar, al igual que en la forma adquirida vectorialmente, meses o años después, manifestaciones de la etapa crónica de la enfermedad (Lillyan et al., 2009).

La transmisión de *T. cruzi* durante el embarazo no se puede evitar. Sin embargo, el diagnóstico precoz en recién nacidos es indispensable para que se proceda al tratamiento etiológico que puede ser administrado y ser 100% eficaz (Flores et al., 2008)

Lamentablemente, como el “screening” de la enfermedad de Chagas en las mujeres embarazadas y en los recién nacidos no se realiza habitualmente en la mayoría de los países endémicos, la magnitud de la transmisión congénita de este agente patógeno continúa siendo un problema de salud pública (Gürtler et al., 2003).

Diagnostico

La infección materna por *T. cruzi* se evalúa con hemaglutinación indirecta y/o inmunofluorescencia. (Torrico et al., 2004). En los recién nacidos, la detección directa de *T. cruzi* por microhematocrito (o micro-Strout) es más indicada. El examen histopatológico de la placenta, el xenodiagnóstico y el hemocultivo son más costosos y consumen mayor tiempo que otros métodos directos (Blanco et al., 2000).

El diagnóstico serológico rutinario de *T. cruzi* en recién nacidos de madres seropositivas tiene un bajo valor predictivo positivo porque la presencia de anticuerpos de tipo IgG contra *T. cruzi* en la mayoría de los casos se debe a la transferencia pasiva de anticuerpos IgG de origen maternal. En el bebé no infectado, estos anticuerpos normalmente desaparecen entre los 5 y 7 meses de edad (Schijman et al., 2003). Por el contrario, la detección de anticuerpos IgM contra el parásito en el bebé se considera evidencia concluyente de una infección por *T. cruzi*, a menos que dichos anticuerpos se hallasen presentes en la madre con anterioridad (Lillyan et al., 2009).

Desafortunadamente, la detección de anticuerpos IgM contra *T. cruzi* en el bebé en ausencia de infección comprobada ocurre a menudo cuando se utilizan epimastigotes de *T. cruzi* como antígeno, pero no cuando se usan antígenos recombinantes. Los anticuerpos de tipo IgM contra *T. cruzi* en el bebé no siempre son detectables al nacimiento, quizás porque la infección es muy reciente, o la transmisión ocurrió en el primer trimestre del embarazo, o existe un exceso de IgG materna que suprime la síntesis fetal de IgM específica, o que el bebé no tenga una respuesta inmune normal. Por lo tanto, la falta de anticuerpos IgM contra antígenos derivados de epimastigotes de *T. cruzi* no excluye la posibilidad que el bebé se halle cursando una infección (Lillyan et al., 2009). También se han desarrollado pruebas que detectan IgA contra *T. cruzi* en el bebé, pero su sensibilidad requiere ser mejorada (Blanco et al., 1999)

La técnica de PCR es una herramienta muy útil combinada con las técnicas convencionales de diagnóstico a la hora de evaluar parasitemia, pero esto depende en gran medida de que el parásito este en circulación sanguínea en el momento de la toma de muestra destinada a la extracción de DNA para PCR, lo cual es más probable en pacientes con infecciones recientes o agudas o reinfecciones (Lucero et al., 2005)

Tratamiento

Las drogas comúnmente aceptadas para el tratamiento de la enfermedad de Chagas son Nifurtimox (Lampit®, Bayer) y el Benznidazol (Radanil®, Roche). Ambas tienen efecto tripanocida, actuando contra las tres formas celulares de *T. cruzi*. Lamentablemente, la efectividad de tratamiento es limitada, siendo mayor en la fase aguda. Adicionalmente, ambas drogas pueden presentar severos efectos secundarios adversos, entre ellos efectos teratógenos (Maya et al., 2006).

Afortunadamente, Benznidazol y Nifurtimox son bien tolerados en infantes, (Bern et al., 2007) por lo que el diagnóstico temprano de la infección por *T. cruzi* en recién nacidos, es de gran importancia para optimizar el tratamiento (García et al., 2008)

IV. Mecanismo de invasión e infección congénita

La fisiopatología exacta de la infección congénita no se conoce (World Health Organization, 2007). Se ha sugerido que el parásito alcanza al feto vía sanguínea atravesando la barrera placentaria. Se postula que la enfermedad de Chagas congénita deriva de una compleja interacción entre la respuesta inmune materna, factores placentarios y características del parásito. (Carlier, 2005; Kemmerling *et al.*, 2010).

La placenta humana

La placenta es el lugar principal de intercambio de nutrientes y gases entre la madre y el feto (Moore y Perseaud., 2008). La circulación materno-fetal humana es de tipo hemocorial (la sangre materna baña una capa celular de tejido fetal que transporta los nutrientes y excreta los desechos procedentes de la sangre del feto) y es la base de la nutrición al feto y la excreción de componentes de desecho de la sangre fetal (Acevedo *et al.*, 2008). La placenta juega adicionalmente un rol importante en la síntesis de hormonas, péptidos y esteroides fundamentales para un embarazo exitoso (Syme *et al.*, 2004). La placenta se compone de una porción fetal desarrollada a partir del corión frondoso y una porción materna o decidua basal que procede del endometrio (Moore Y Perseaud, 2004; Cross, 2006). La membrana o barrera placentaria está formada por tejidos extrafetales que separan la sangre materna de la fetal. Esta barrera se compone hasta las 20 semanas del trofoblasto (epitelio bi-estratificado compuesto por sincitiotrofoblasto y citotrofoblasto), tejido conectivo de las vellosidades coriónicas libres y endotelio de los capilares fetales además de las láminas basales presentes entre los distintos compartimentos tisulares. Posterior a las 20 semanas la placenta sufre adaptaciones que mejoran el intercambio metabólico, las células del citotrofoblasto disminuyen, los núcleos del sincitiotrofoblasto se acumulan formando nodos y los capilares fetales se acercan al trofoblasto (Kemmerling *et al.*, 2010Figura. 6). 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 Perseaud., 2004; Kemmerling *et al.*, 2010). La muerte celular programada de tipo apoptosis juega un rol importante en la re-estructuración placentaria, facilitando la rápida eliminación de células no deseadas sin inflamación (Belkacemi *et al.*, 2009).

La barrera placentaria actúa solamente como tal 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 Perseaud., 2008).

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

El traspaso de sangre materna se vuelve continuo y difuso en toda la placenta, solo después de la semana 12 de gestación. La ausencia de malformaciones en recién nacidos vivos infectados congénitamente con *T. cruzi* sugiere que no existe transmisión de los parásitos en estadios tempranos de la organogénesis en el embrión (Jauniaux *et al.*, 2003).

La infección transplacentaria puede ocurrir en cualquier fase de la enfermedad materna, aunque el riesgo es mayor en la fase aguda debido al gran número de parásitos circulantes (Bittencourt A, 1992).

Interacción de *T. cruzi* con la placenta.

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

Se ha postulado que el tripomastigote invade trofoblasto y macrófagos del tejido conectivo fetal. El parásito se diferenciaría intracelularmente a amastigote formando nidos parasitarios. La presencia del parásito induciría una respuesta inflamatoria y necrosis del tejido placentario. Los tripomastigotes liberados desde

las células infectadas o que hayan atravesado la barrera placentaria pueden alcanzar la circulación fetal causando infección congénita (Kemmerling et al., 2010).

Los tejidos se forman de células y MEC. La MEC presenta un componente fibrilar compuesto por fibras colágenas y elásticas y un componente no fibrilar o sustancia fundamental. La sustancia fundamental está compuesta por glicoaminoglicanos (GAGs), proteoglicanos y glicoproteínas. Los GAGs y proteoglicanos son responsables de la viscosidad de la MEC, debido que son macromoléculas polianiónicas y por ende altamente hidrofílicas. Las glicoproteínas son moléculas adhesivas con una gran capacidad de interactuar con receptores celulares y otros elementos de la MEC. La MEC también forma las láminas basales, estructuras que se ubican entre tejidos epiteliales y conectivos.

Las láminas basales son componentes altamente estructuradas de la MEC, compartimentalizan tejidos, unen el epitelio al tejido conectivo vecino, regulan la concentración de moléculas señalizadoras como hormonas y factores de crecimiento y participan en procesos de cicatrización y reparación tisular, entre otros. (Junqueira y Carneiro., 2005). Otra función muy importante es de modular la concentración y actividad de citocinas y quimiocinas durante la respuesta inmune e inflamatoria (Kumar *et al.*, 2005).

Durante la invasión tisular parasitaria, la interacción entre *T. cruzi* y moléculas de la MEC es fundamental. El parásito debe atravesar la membrana basal ubicada entre los distintos epitelios y tejido conectivo adyacente, y movilizarse dentro del mismo. Glicoproteínas de la superficie del parásito son capaces de unirse a moléculas de la MEC.

Entre las moléculas de la MEC a las cuales se puede unir *T. cruzi* se ha descrito a glicoproteínas de la membrana basal como laminina y fibronectina (Merino et al., 2003), glicosaminoglicanos sulfatados como el heparansulfato (Lima *et al.*, 2002). Existen evidencias que la fibronectina promueve la adhesión y endocitosis del parásito por parte de macrófagos y fibroblastos (Marino *et al.*, 2003).

Durante el proceso de transmisión congénita el parásito debe atravesar la barrera placentaria alterando o destruyendo los componentes de ella (Duaso *et al.*, 2010, Kemmerling *et al.*, 2010).

Alteraciones histopatológicas descritas en placentas chagasicas

Existen algunos pocos estudios que describen las lesiones histopatológicas de placentas de madres transmisoras y no transmisoras de Enfermedad de Chagas. Estos análisis se hicieron con técnicas histológicas de rutina (tinción hematoxilina-eosina) y las lesiones placentarias fueron descritas como “corionitis”, “corioamnionitis” y “edema de cordón” (Fernández-Aguilar *et al.*, 2005). Lamentablemente no se aplicaron técnicas histoquímicas ni inmunohistoquímicas para determinar con mayor certeza presencia de parásitos, así como alteraciones moleculares o celulares a nivel de las vellosidades coriónicas.

En otro estudio se clasificaron las células inflamatorias presentes en placentas infectadas por *T. cruzi*, encontrándose un predominio de macrófagos CD68+, linfocitos T (razón CD4+:CD8+ entre 0,04 y 0,38) algunas células NK (natural killer) y casi nula o nula presencia de LB (Altemani *et al.*, 2000). El predominio de células mononucleares es característico de cualquier respuesta inflamatoria crónica a un agente infeccioso (Kumar *et al.*, 2005). Podría llamar la atención la razón CD4+:CD8+; sin embargo, el predominio de los linfocitos citotóxicos se podría explicar por una respuesta hacia un patógeno intracelular (Kumar *et al.*, 2005). En este estudio no diferencian entre madres chagásicas transmisoras y no transmisoras y tampoco se describe en mayor detalle la histopatología de las placentas. Se diferencian las placentas obtenidas a partir de partos con recién nacidos vivos y otras a partir de partos con mortinatos. En los casos de mortinatos se observaron extensas áreas de necrosis y abundantes parásitos, comparado con los casos de nacidos vivos (Altemani *et al.*, 2000).

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

La inducción de alteraciones celulares y la interacción con la MEC durante la infección con *T. cruzi* han sido estudiados principalmente en cultivos de células de mamífero. En diversos laboratorios, incluido el nuestro, se ha establecido un modelo de infección *ex vivo* de explantes de vellosidades coriónicas humanas, obtenidas placentas en alumbramientos en partos por cesárea, en el cual se pueden estudiar los mecanismos de infección tisular del parásito (Sartori *et al*, 2003; Lin *et al*, 2004; Lujan *et al*, 2004; Sartori *et al*, 2005; Shippey III *et al*, 2005; Mezzano *et al*, 2005, Triquel 2009, Duaso *et al.*, 2010).

Durante la infección *ex vivo* de explantes de vellosidades coriónicas humana se han descrito alteraciones en los microfilamentos de actina en el sincitiotrofoblasto (Sartori *et al*, 2003), aumento de la expresión de fosfatasa alcalina placentaria (Sartori *et al*, 2005; Mezzano *et al*, 2005) y disminución del receptor para el factor de crecimiento epidérmico (Lin *et al*, 2004).

Adicionalmente, en nuestro laboratorio hemos descrito que *T. cruzi* induce degradación y destrucción del sincitiotrofoblasto de las vellosidades coriónicas, destrucción selectiva de las láminas basales y desorganización de colágeno I del tejido conectivo fetal (Duaso *et al.*, 2010) así como muerte celular (Duaso *et al* 2011a).

Sin embargo, es fundamental estudiar si estas alteraciones tisulares placentarias causadas por el parásito en la infección *ex vivo* de vellosidades coriónicas humanas también se observan en placentas de madres chagásicas.

HIPÓTESIS

Vellosidades coriónicas, provenientes de placentas de madres con enfermedad de Chagas crónica asintomática presentan destrucción y desprendimiento del trofoblasto, destrucción selectiva de las membranas basales, y desorganización del colágeno I en el estroma vellositario.

OBJETIVO GENERAL

Estudiar las posibles alteraciones histopatológicas de placentas de madres chagásicas crónica asintomática.

OBJETIVOS ESPECIFICOS

Determinar en placentas de madres con enfermedad de Chagas crónica asintomática:

1. Presencia del parásito *Trypanosoma cruzi*
2. Alteraciones histopatológicas en los distintos compartimentos de las vellosidades coriónicas humanas.
3. Degradación y destrucción de la matriz extracelular en las vellosidades coriónicas de placenta humana, específicamente:
 - a) Degradación y desorganización de componentes de las láminas basales presentes en las vellosidades coriónicas:
 - fibronectina
 - colágeno IV
 - heparansulfato
 - b) Degradación y desorganización de colágeno de la MEC del estroma vellositario

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Obtención de placentas

a) Placentas de madres con enfermedad de Chagas crónica asintomática

Se obtuvieron tres placentas provenientes de madres con enfermedad de Chagas derivadas del Servicio de Obstetricia y Ginecología del Hospital de Illapel, Servicio de Salud Coquimbo, IV Región. Las pacientes que donaron sus placentas firmaron el formulario de Consentimiento informado¹, que fue aprobado por el Comité de Ética Humana de la Facultad de Medicina, Universidad de Chile². Los datos clínicos de las madres y los recién nacidos se muestran en la Tabla 1.

b) Placentas de madres sanas

Se obtuvieron tres placentas de término desde el Servicio de Obstetricia y Ginecología del Hospital San José, Servicio de Salud Metropolitano Norte. Todas las pacientes que donaron sus placentas firmaron el formulario de Consentimiento informado¹, que fue aprobado por el Comité de ética Humana de la Facultad de Medicina, Universidad de Chile².

Estas placentas, utilizadas como control, fueron obtenidas en alumbramientos por parto vaginal o cesárea. Las placentas provenían de madres sanas con embarazos únicos y fetos con crecimiento normal. Los criterios de exclusión para la obtención de placentas fueron cualquier patología materna, fetal o placentaria.

1 Anexo 1

2 Anexo 2

Posteriormente las muestras fueron procesadas en el laboratorio para métodos histológicos o de biología molecular.

2. Métodos histológicos

Las vellosidades coriónicas fueron fijadas en formaldehído 4% preparado en un tampón fosfato pH 7,3 durante 24 horas. Posteriormente se lavaron en agua corriente durante 2 horas, se deshidrataron mediante inmersión en concentraciones crecientes de etanol (80%, 90%, 95%, 100%, 100%, 100%) por 10 minutos cada vez, fueron aclaradas en xilol 100% 3 veces durante 15 minutos e incluidas en parafina fundida a 60°C. Se obtuvieron cortes de 5 µm de espesor para técnicas histológicas de rutina e histoquímicas, y de 8 µm de espesor para las reacciones inmunohistoquímicas. Los cortes se colocaron en portaobjetos silanizados con carga positiva (Superfrost® plus, Thermo Scientific). Posteriormente fueron desparafinados en xilol 100% tres veces por 15 minutos, e hidratados en concentraciones decrecientes de etanol (100%, 100%, 100%, 95%, 80%, 70% y agua destilada) por 10 minutos cada vez. Los preparados se sometieron a diferentes métodos de tinción, descritos más abajo, y luego fueron montados con Entellan (Merck®) y observados en un microscopio (Nikon, Optiphot-2), las imágenes fueron capturadas con un equipo de digitalización (Canon Powershot SX100 15). Los preparados sometidos a inmunofluorescencia o TUNEL fueron observados en un microscopio de epifluorescencia Nikon Eclipse E400 (Tokio, Japón) y las imágenes fueron capturadas con una cámara Nikon Digital Sight y procesadas con el software ImageJ 1.43. (Duaso *et al.*, 2010).

a) Tinción Hematoxilina-eosina

Este método fue utilizado para el análisis histológico de rutina. La hematoxilina es un colorante básico que tiene la capacidad de teñir estructuras basófilas de color azul-violeta oscuro y la eosina es un colorante ácido que tiñe estructuras acidófilas de color rojo o rosado.

Las muestras fueron teñidas por dos minutos en hematoxilina de Mayer, luego fueron lavadas en agua corriente por cinco minutos, seguido de lavados en agua

destilada por dos minutos, posteriormente fueron teñidas con eosina acuosa al 10% acidificada con ácido acético glacial por tres minutos para luego ser enjuagadas con agua destilada (Duaso *et al.*, 2010) y procesados según lo descrito anteriormente.

b) Tinción de ácido periódico-schiff (PAS)

Este método se utilizó para identificar moléculas altamente glicosiladas en el tejido placentario. El ácido periódico oxida los grupos hidroxilo de hexosas neutras a aldehídos, que son visualizados con el reactivo de Schiff resultando un color rojo-fucsia. Las membranas basales presentan macromoléculas con una alta proporción de hidratos de carbono, por lo cual se tiñen bien mediante la reacción de PAS y otros colorantes histológicos que detecten glicoaminoglicanos (GAGs) (Duaso *et al.*, 2010).

Se utilizó el kit de tinción PAS (kit PERIODIC ACID-SCHIFF (PAS) STAINING SYSTEM) de Sigma-Aldrich®, según las instrucciones dadas por el fabricante. Los cortes fueron desparafinados e hidratados como se detalló más arriba, luego se sumergieron en agua deionizada tres veces por cinco minutos cada vez, luego fueron sumergidos en solución de ácido periódico, durante cinco minutos a temperatura ambiente, lavados al menos 10 veces en agua destilada cambiando el agua cada vez, sumergidos en reactivo de Schiff, durante quince minutos a temperatura ambiente y lavados durante cinco minutos en agua corriente. El contraste nuclear se realizó mediante tinción nuclear con hematoxilina de Gill por 90 segundos (Duaso *et al.*, 2010).

c) Tinción tricrómica de Arteta

Este método histoquímico se utilizó para determinar la presencia de los distintos tipos de colágeno de la MEC. Las muestras fueron teñidas con una solución eritrosina-Orange G al 0,5% durante 10 minutos, lavadas en agua destilada durante dos minutos, tratadas con ácido fosfotúngstico al 0,5% durante dos a tres minutos, enjuagadas en agua destilada y teñidas con azul de anilina al 0,5% (Cabrera *et al.*, 2010).

d) Tinción de picro rojo sirio

Este método histoquímico se utilizó para determinar los elementos fibrilares de la MEC, específicamente colágeno I y III. El rojo sirio es un colorante fuertemente aniónico que tiñe a las fibras de colágeno mediante sus grupos de ácido sulfónico con residuos básicos presentes en las moléculas de colágeno. La molécula de rojo sirio es alargada y se une en forma paralela a las moléculas de tropocolágeno. Esta asociación paralela entre colorante y tropocolágeno resulta en un aumento de la birrefringencia, que se aprecia en un microscopio óptico con luz polarizada. El colágeno I se observa de color rojo o naranja mientras que el colágeno III se observa de color verde.

Las muestras fueron teñidas por ocho minutos con hematoxilina de Mayer, lavadas con agua corriente por 10 minutos, sumergidas en una solución de picro rojo sirio (0,5g Direct red 80 (Sigma-Aldrich®), en 500 ml. de solución acuosa sobresaturada de ácido pícrico (Sigma-Aldrich®)) por una hora, lavadas dos veces con agua destilada acidificada al 0,5% con ácido acético glacial, y finalmente lavadas con agua destilada 3 veces cambiando el agua cada vez (Duaso *et al.*, 2010).

3. Inmunohistoquímica

Las muestras fueron procesadas para técnicas inmunohistoquímicas de rutina (Duaso *et al.*, 2010). Se utilizó el kit ABC-R.T.U Vectastain Universal® (ScyTek, ACA) para la técnica de inmunoperoxidasa, para la detección de los diversos antígenos en los cortes de las vellosidades coriónicas provenientes de placentas sanas y de madres chagásicas.

Los cortes desparafinados se incubaron con bloqueador de peroxidasas endógenas (ScyTek, ACA) y suero normal equino R.T.U al 2,5% (ScyTek, ACA).

La dilución de los anticuerpos primarios, tiempo y T° de incubación fueron:

- Anti-fibronectina (ABR® MA1-83176) en una dilución 1:50 v/v durante toda la noche a 4 °C
- Anti-heparan sulfato (Novocastra® NCL-CD44-2), dilución 1:40 v/v durante toda la noche a 4 °C
- Anti-colageno IV (Novocastra® NCL-COLL-IV), dilución 1:100 v/v durante toda la noche a 4 °C

Posteriormente, las muestras fueron incubadas con un anticuerpo secundario biotinilado (Kit RTU Vectastain (ScyTek, ACA)) y el complejo antígeno-anticuerpo revelado con el cromógeno diamino benzidina (DAB). El contraste nuclear se realizó con Hematoxilina de Mayer. Los controles negativos de la técnica inmunohistoquímica fueron realizados mediante la sustitución de los anticuerpos primarios con PBS. (Duaso *et al.*, 2010).

4. Reacción de polimerasa en cadena (PCR)

La presencia de DNA parasitario en las placentas humanas fue determinado mediante PCR. Se extrajo DNA genómico desde tejidos incluidos con parafina con el kit NucleoSpin® Tissue (Machery-Nagel). Se amplificó un fragmento de 384 pares de bases correspondiente a DNA de minicírculos de *T. cruzi* (Zulantay *et al.*, 2004). Las secuencias de los partidores usados fueron:

S35: 5'-AAATAATGTACGGGKGAGATGCAT-3';

S36: 5'-GGGTTCGATTGGGGTTGGTGT-3'.

Para un volumen total de de 50 µL se mezclaron 500 pg de DNA genómico, 25µl de SapphireAmp® Fast PCR Master Mix (Takara Bio Inc., Japón) y 10 nanomoles de cada uno de los partidores. Los ciclos termales fueron: 2 ciclos de denaturación de 1 min a 98°C y 2 minutos a 64°C, seguidos de 30 ciclos de 1 minuto a 94°C y 1 minuto a 64°C. La extensión final fue de 10 min a 72°C. Los amplificadores de DNA se separaron en geles de agarosa al 1% preparados en tampón Tris-borato-EDTA y se tiñeron con el colorante de ácidos nucleicos GelRed® (Biotium, EE.UU.) según instrucciones del fabricante (Duaso *et al* 2010).

5. Inmunofluorescencia

La presencia de antígenos parasitarios en las placentas fue determinada mediante inmunofluorescencia (Duaso *et al* 2010). Este método se usó además para ver su localización en los distintos compartimentos tisulares de las vellosidades coriónicas.

Los cortes desparafinados fueron incubados con “bloqueador de reacciones inespecíficas” (Pro-Blok (ScyTek, ACA)) por cinco minutos, luego se lavaron tres

veces con PBS por cinco minutos cada vez y posteriormente fueron incubados con suero normal equino R.T.U al 2,5% (ScyTek, ACA) por 20 minutos. El anticuerpo primario monoclonal mAb25 (Anti-*T. cruzi* “flagellar calcium binding protein” (Gentileza Dr. Sergio Schenkman, Departamento de Microbiología, Inmunología y Parasitología, Universidad Federal de Sao Paulo, SP. Brasil) fue aplicado en una dilución 1:100 v/v durante toda la noche a 4° C. Posteriormente, las muestras se lavaron tres veces con PBS por cinco minutos cada vez, y fueron incubadas con anticuerpo secundario fluorescente (1:400 v/v) (Fluorescein Anti-Mouse IgG (H+L) VECTOR (ScyTek, ACA)) durante una hora y luego lavadas con PBS como se explicó anteriormente. Luego las muestras fueron teñidas con DAPI (4',6- diamidino-2-fenilindol dicloridrato, PIERCE ®; 1 µg/ml) por cinco minutos, lavadas dos veces en PBS por tres minutos cada vez, y montadas con medio para fluorescencia (VECTASHIELD ® VECTOR (ScyTek, ACA)). Los controles negativos de la técnica inmunofluorescencia se realizaron mediante la sustitución de los anticuerpos primarios con PBS. Todo el proceso se realizó en una cámara húmeda y en ausencia de luz. Las muestras se observaron posteriormente en un microscopio de epifluorescencia (Duaso *et al.*, 2010).

6. Bioética

Este estudio cuenta con la aprobación del “Comité de Ética Humana de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile” ²

7. 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" ³

2 Anexo 2
3 Anexo 3

RESULTADOS

Durante el proceso de transmisión congénita el parásito debe atravesar la barrera placentaria alterando o destruyendo los componentes de ella (Duaso et al, 2010, Kemmerling et al., 2010).

Se ha demostrado que *T. cruzi* induce degradación y destrucción del sincitiotrofoblasto de las vellosidades coriónicas, destrucción selectiva de las láminas basales y desorganización de colágeno I del tejido conectivo fetal en un modelo de infección *ex vivo* de explantes de vellosidades coriónicas humanas con tripomastigotes de *T. cruzi* (Duaso et al., 2010).

Detección de *T. cruzi* en vellosidades coriónicas humanas en placentas de madres chagásicas.

El diagnóstico de la enfermedad de Chagas de las tres madres que participaron en nuestro estudio se realizó previamente mediante técnicas serológicas (**Tabla 1**). Después del parto, muestras de sangre de las madres y cordones umbilicales de los recién nacidos respectivos fueron procesadas para la detección del DNA del parásito por PCR. La sangre de los recién nacidos fue adicionalmente sometida a un examen parasitológico directo mediante el método de microhematocrito. Los exámenes parasitológicos directos de los recién nacidos fueron todos negativos. Sin embargo, dos madres y sus recién nacidos dieron resultados positivos para PCR (Tabla 1; Figura. 7, carriles 5, 7, 8,10). Por otra parte, la tercera madre con su recién nacido fueron negativos para PCR (Tabla 1; Figura.7, carriles 11 y 13). En todas las placentas fue posible detectar DNA parasitario mediante PCR (Tabla 1; Figura.7, carriles 6, 9, 12) así como antígeno parasitario mediante inmunofluorescencia (Figura. 8 G-H).

Interesantemente, la madre 3 y su hijo recién nacido fueron negativos para el método de detección de DNA parasitario mediante PCR (Figura. 7 carriles 11 y 13), pero la placenta fue positiva (Figura. 7 carril 12). Los resultados negativos del PCR, para la detección de DNA parasitario tanto para la madre como para el hijo, se puede deber a una carga parasitaria muy baja, característica de la fase

asintomática y crónica de de la enfermedad de Chagas. Durante esta fase, la sensibilidad de las técnicas depende de la variable concentración de parásitos en la sangre infectadas (World Health Organization, 2010). Por esta razón, los resultados negativos no indican necesariamente la ausencia de parásitos en la sangre o la ausencia de infección. Por otra parte, las tres madres fueron positivas al diagnóstico serológico (Zulantay et al., 2004; Marcon et al., 2002).

Adicionalmente se detectó la presencia del parásito mediante inmunofluorescencia (Figura. 8). En placentas de madres con enfermedad de Chagas es posible detectar antígenos parasitario en el tejido conectivo fetal (Figura. 8 E-H), los que no se detectan en vellosidades coriónicas provenientes de madres sanas (Figura 8 A-D). Llama la atención que la cantidad parásitos que se detecta en el tejido placentario es relativamente baja y que los parásitos no forman nidos de amastigotes como está descrito en otros tejidos como por ejemplo el miocardio (Faúndez et al., 2008; Coura, 2007). La limitada presencia del protozoo se puede deber a una baja parasitemia, característica de la fase crónica asintomática que presentan las madres del estudio. Otra explicación para este hecho puede ser la presencia de un mecanismo antiparasitario local, como es el aumento de óxido nítrico, que tiene propiedades anti-*T. cruzi* (Triquell et al., 2009). La misma escasa presencia del parásito así como su localización en el tejido conectivo fetal se observa en explantes de vellosidades coriónicas infectadas *ex vivo* (Duaso et al., 2010).

Placentas de madres con enfermedad de Chagas crónica asintomática presentan alteraciones histopatológicas severas.

Las muestras provenientes de vellosidades coriónicas obtenidas de placentas de madres con enfermedad de Chagas presentan un daño tisular severo (Figura. 9), que se manifiesta en una destrucción y desprendimiento del trofoblasto así como desorganización del tejido conectivo fetal en el estroma (Figura. 9 B). Interesantemente, no se observa infiltrado inflamatorio en las vellosidades coriónicas provenientes de madres chagásicas (Figura 9 B). Las placentas de mujeres sanas muestran vellosidades coriónicas intactas (Figura. 9 A).

Vellosidades coriónicas de placentas de madres con enfermedad de Chagas presentan desorganización y destrucción de la matriz extracelular.

Durante la invasión tisular el parásito debe atravesar la barrera placentaria formada por trofoblasto, láminas basales y tejido conectivo localizado entre las láminas basales ubicadas entre trofoblasto y endotelio fetal.

La MEC es el componente no celular presente en todos los tejidos y órganos, y no sólo proporciona estructura física esencial para los constituyentes celulares, si no también inicia importantes señales bioquímicas y biomecánicas requeridas para diferentes funciones tisulares (Frantz, et al., 2010)

La MEC se compone de fibras de colágeno y elásticas, glicoaminoglicanos (GAGs), proteoglicanos y glicoproteínas que forman una compleja red tridimensional entre las células de diferentes tejidos (Järveläinen et al., 2009).

Las glicoproteínas, GAGs y proteoglicanos son altamente glicosilados y especialmente abundantes en la lámina basal (Alberts et al., 2008). *T. cruzi* induce en vellosidades coriónicas infectadas ex vivo desorganización de las láminas basales (Duaso et al., 2010)

Las placentas de madres chagásicas así como de mujeres sanas fueron analizadas histoquímicamente (Figura. 10). Las moléculas glicosiladas fueron analizadas mediante el método de ácido peryódico de Schiff (PAS) la presencia de moléculas glicosiladas. En las placentas de mujeres chagasicas (Figura. 10 D) se observó una disminución en la reacción de PAS en las vellosidades coriónicas respecto a las placentas sanas (Figura 10 A). Esta reducción de la reactividad de PAS es particularmente evidente en las láminas basales (Figura.10 D flechas).

Las fibras de colágeno fueron analizadas mediante el método de Arteta y las fibras de colágeno I y III además con el método de Picro rojo sirio.

Se observó una menor tinción positiva para el método de Arteta en vellosidades coriónicas en placentas de madres con enfermedad de Chagas (Figura. 10 E) respecto a los controles (Figura. 10 B). Además las fibras de colágeno son menos gruesas y se distribuyen en forma más irregular. Adicionalmente, las fibras de colágeno I presentan menor birrefringencia en las placentas provenientes de las madres chagásicas (Figura. 10 F) que en las madres sanas (Figura. 10 C).

La menor reactividad para los métodos histoquímicos indica que tanto la MEC de tipo fibrilar (colágenos) así como la no fibrilar (proteoglicanos, GAGs y glicoproteínas) estaría desorganizada o re-organizada en respuesta a la presencia del parásito.

Vellosidades coriónicas de placentas de madres con enfermedad de Chagas presentan desorganización y destrucción selectiva de las láminas basales

Las láminas basales son estructuras altamente especializadas de la MEC que se ubican entre tejidos epiteliales y tejidos conectivos. Colágeno IV, el proteoglicano heparán sulfato y la glicoproteína fibronectina forman parte de las láminas basales (Alberts et al, 2008). En las vellosidades coriónicas las láminas basales se ubican entre el trofoblasto y tejido conectivo fetal y alrededor de los endotelios de los capilares fetales. Forma parte de la barrera placentaria que los parásitos deben atravesar para invadir el tejido conectivo fetal. Por otra parte, se ha descrito que el parásito utiliza a componentes de las láminas basales como receptores para la invasión tisular.

Los análisis histoquímicos previos con los métodos PAS y Arteta mostraron la presencia de alteraciones en la lamina basal (Figura. 10 D, E).

Se analizó en forma más específica mediante inmunohistoquímica a colágeno IV, el heparansulfato y fibronectina. El parásito induce en vellosidades coriónicas infectada *ex vivo* disminución de la inmunoreactividad del heparán sulfato y colágeno IV. En cambio, no altera la inmunoreactividad de la fibronectina (Duaso et al., 2010).

Placentas de madres chagásicas muestran resultados similares a las placentas infectadas *ex vivo*. Así se pierde la inmunoreactividad de heparansulfato (Figura. 11 D), disminuye la de colágeno IV (Figura 11 E) y no se altera la de fibronectina (Figura 11 F), comparada a las placentas sanas (Figura 11 A-C).

T. cruzi presenta moléculas de superficie que pueden unirse a la laminina (Marino et al., 2003; Giordano et al., 1999), la fibronectina (Marino et al., 2003), y heparansulfato (Lima et al., 2002). Por otro lado, el parásito induce la expresión y actividad de metaloproteasas de la matriz (Gutierrez et al., 2008) y secreta proteasas como cruzipaína que puede degradar los diversos componentes de la MEC (Mezzano et al., 2005).

DISCUSIÓN

Durante infección congénita con *T. cruzi*, el parásito es capaz de atravesar la barrera placentaria para alcanzar los capilares fetales (Duaso et al., 2010; Kemmerling et al., 2010; Carlier y Truyens., 2010). El parásito llega al espacio intervelloso con la sangre materna. La primera barrera la constituye el trofoblasto, formado por sinciciotrofoblasto (capa más superficial) y citotrofoblasto, luego debe atravesar la lámina basal que separa al trofoblasto del tejido conectivo fetal. Posteriormente debe atravesar al tejido conectivo fetal, la lámina basal que rodea a los capilares fetales y finalmente al endotelio fetal (Kemmerling et al., 2010).

Se ha postulado que la transmisión congénita de la enfermedad de Chagas depende de factores de parásito, de la placenta y de la respuesta inmune tanto de la madre como del feto y recién nacido (Kemmerling et al 2010, Carlier y Truyens 2010). Durante el embarazo existe en la respuesta inmune celular un predominio Th2 sobre Th1, lo que favorece la tolerancia inmunológica hacia el feto (Raghupathy, 2001; Lin et al., 2005; Raghupathy y Kalinka., 2008), pero también aumenta la susceptibilidad hacia algunas enfermedades autoinmunes e infecciones intracelulares (Guilbert et al., 1993; Lin et al., 2005). Entre las infecciones intracelulares que muestran una exacerbación durante el embarazo se cuentan el síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA) (Derrien et al., 2005.) infecciones asociadas al SIDA (Margono et al., 1994), malaria (Gamain et al., 2007) y toxoplasmosis (Biedermann et al., 1995).

En relación a la transmisión placentaria de *T. cruzi* se han realizado estudios sobre el estado inmunológico tanto de la madre como el feto. Así, en recién nacidos no infectados de madres chagásicas se observa una alta activación de su respuesta inmune innata con una mayor capacidad de sus monocitos de producir citoquinas pro-inflamatorias (IL1- β , IL-6, TNF- α) y anti-inflamatorias (IL-10) y receptores para TNF- α respecto a recién nacidos infectados o recién nacidos sanos de madres sanas (Hermann et al., 2004; Carlier, 2005; Truyens et al., 2005; Hermann et al., 2006). Por lo tanto los recién nacidos no infectados de madres chagásicas son capaces de montar una respuesta inmune de células T CD8+ similar a un adulto (Hermann et al., 2002). A

su vez las madres transmisoras presentan una mayor carga parasitaria asociada a parasitemias más altas, una menor capacidad de células mononucleares sanguíneas de producir IFN- γ , incapacidad de producir IL-2 en respuesta específica al parásito (Hermann *et al.*, 2004; Carlier, 2005; Alonso-Vega *et al.*, 2005), una mayor capacidad de producir IL-10 (citoquina anti-inflamatoria) (Alonso-Vega *et al.*, 2005) y bajos niveles de TNF circulantes (García *et al.*, 2008). Por el contrario, las madres chagásicas no transmisoras presentan una alta activación monocitaria (Alonso-Vega *et al.*, 2005; Carlier 2005; Hermann *et al.*, 2006) y altos niveles de TNF circulantes (García *et al.*, 2008).

Existen algunos pocos estudios que describen las lesiones histopatológicas de placentas de madres transmisoras y no transmisoras de Enfermedad de Chagas. Estos análisis se hicieron con técnicas histológicas de rutina (tinción hematoxilina-eosina) y las lesiones placentarias fueron descritas como “corionitis”, “corioamnionitis” y “edema de cordón” (Fernández-Aguilar *et al.*, 2005). Lamentablemente no se aplicaron técnicas histoquímicas ni inmunohistoquímicas para determinar con una mayor seguridad presencia de parásitos, alteraciones moleculares o celulares a nivel de las vellosidades coriónicas. En otro estudio se clasificaron las células inflamatorias presentes en placentas infectadas por *T. cruzi*, encontrándose un predominio de macrófagos CD68+, linfocitos T (razón CD4+:CD8+ entre 0,04 y 0,38) algunas células NK (natural killer) y casi nula o nula presencia de LB (Altemani *et al.*, 2000). El predominio de células mononucleares es característico de cualquier respuesta inflamatoria crónica a un agente infeccioso (Kumar 2005). Podría llamar la atención la razón CD4+:CD8+, sin embargo, el predominio de los linfocitos citotóxicos se podría explicar por una respuesta hacia un patógeno intracelular (Hermann *et al.*, 2002). En este estudio no diferencian entre madres chagásicas transmisoras y no transmisoras y tampoco se describe en mayor detalle la histopatología. Se diferencia sí, entre placentas obtenidas a partir de partos con recién nacidos vivos y otras a partir de partos con mortinatos. En los casos de mortinatos se observaron extensas áreas de necrosis y abundantes parásitos comparado con los casos de nacidos vivos (Altemani *et al.*, 2000).

Interesantemente, las placentas analizadas en el presente estudio no presentaron infiltrado inflamatorio. La ausencia de una respuesta inflamatoria se

podría deber a una baja parasitemia y escasa presencia del parásito en los tejidos placentarios.

La parasitemia es uno de los factores asociados al riesgo de la transmisión congénita. Una parasitemia elevada, como se ha detectado en la fase aguda de la infección, se correlaciona con una mayor capacidad de transmisión de alrededor del 50%. Por otro lado, los pacientes en fase crónica de la enfermedad, presentan una parasitemia muy baja, siendo la tasa de transmisión congénita en esta fase entre 1-21% (Morettiet al.,2005). Esta tasa de transmisión es relativamente baja, por lo que postular que deben existir mecanismos antiparasitarios placentarios locales parece razonable.

Recientemente, se han reportado varios trabajos que apoyan la hipótesis de que existen mecanismos antiparasitarios locales. La síntesis de óxido nítrico en el tejido de la placenta (Triquellet al.,2009) y la presencia de agentes "termosensibles" (Luján et al.,2004) podrían formar parte de estos posibles mecanismos locales de defensa de la placenta.

La remodelación de la MEC es otro factor que podría formar parte de estos mecanismos antiparasitarios locales y de los mecanismos de invasión tisular del parásito. La MEC es una estructura dinámica que interactúa con las células y genera señales a través de ciclos de retroalimentación para controlar el comportamiento de las células. De este modo, las macromoléculas de la MEC son bioactivas y modulan los eventos celulares como la adhesión, migración, proliferación, diferenciación y supervivencia (Daley et al., 2008). Además, las moléculas de MEC están altamente organizadas y esta organización determina la bioactividad de la MEC. Incluso alteraciones menores, como una sustitución de aminoácido en un único componente de MEC puede conducir no sólo a la modificación de las propiedades fisicoquímicas de los tejidos, sino también a los cambios en el fenotipo celular y las interacciones célula-matriz (Järveläinen et al., 2009). Se ha propuesto que estos cambios en la estructura de MEC y bioactividad en función de los tejidos finalmente conducen al desarrollo de la enfermedad (Järveläinen et al., 2009).

Se ha propuesto que las alteraciones producidas en la MEC por *T. cruzi* no sólo promueve la entrada y movilidad del parásito a las células del tejido, sino también

se altera la presencia de citoquinas y quimioquinas, lo cual permite al parásito modular y escapar tanto de la respuesta inflamatoria como de la respuesta inmune (Duaso et al., 2010; Marino et al., 2003). Por otra parte, estos cambios en la función MEC pueden ser parte de los mecanismos locales de defensa de la placenta, lo que podría explicar porqué sólo unos pocos parásitos pueden ser detectados en la placenta.

Durante la invasión de los tejidos, *T. cruzi* es capaz de interactuar con diferentes elementos de la MEC. El parásito presenta moléculas de superficie, tales como gp85 (Marino et al, 2003) y gp83 (Nde, P. N 2006), que se unen a las glicoproteínas laminina y fibronectina (Marino et al, 2003; Nde, P. N 2006), así como a proteoglicanos como el heparansulfato (Lima et al, 2002). El parásito puede inducir la expresión de las moléculas de la MEC o disminuir su presencia (Marino et al, 2003). La explicación más obvia para la disminución de las moléculas de la MEC es que el parásito secreta proteasas como la cruzipaina (Duaso et al., 2010; Scharfstein y Morrot., 1999), pero otra posibilidad es que el *T. cruzi* disminuya la expresión de estas moléculas a través de la modulación de las vías de transducción de señales o reorganización del citoesqueleto.

La infección con *T. cruzi* disminuye la expresión de la fibronectina en cultivo de cardiomiocitos. Por el contrario, los niveles de expresión de la proteína laminina no se modifican, pero la distribución de este componente de la MEC cambia drásticamente en este tipo de cultivo celular (Calvet, 2009). Moléculas de las láminas basales han sido estudiadas también en otros tejidos, tales como bazo y ganglios linfáticos. En estos tejidos se observa un aumento de expresión de laminina (Marino *et al.*, 2003). Estos estudios se han efectuado en modelos murinos y las diferencias se pueden deber a diferencias de especies. Se ha propuesto que el parásito induce un aumento de expresión de laminina para unirse a estas moléculas de la MEC, poder invadir a las células inmersas en la MEC y luego debe destruir esta misma para moverse en el tejido (Marino *et al.*, 2003). La presencia de laminina es fundamental para una infección efectiva, ya que el silenciamiento del gen de la laminina inhibe la invasión celular del parásito (Nde, 2006).

En el laboratorio se ha demostrado previamente, que en explantes de vellosidades coriónicas humanas infectadas *ex vivo* con el parásito, la inmunoreactividad para heparansulfato disminuye o desaparece por completo de manera parásito-concentración dependiente. Por otra parte, fibronectina no presenta modificaciones en su inmunorreactividad o en su patrón de distribución (Duaso et al., 2010). En el presente estudio se confirman estos resultados en las placentas de madres con la enfermedad de Chagas crónica asintomática.

En la infección *ex vivo* de las vellosidades coriónicas, la inmunoractividad para el colágeno IV disminuyó en la lámina basal contigua al trofoblasto, no así en las láminas basales que rodean al endotelio de los capilares fetales (Duaso et al., 2010). En las placentas de mujeres chagásicas, la inmunoreactividad del colágeno IV en ambas láminas basales se reduce. Es probable que la exposición crónica al parásito durante todo el embarazo genere un cambio más severo en la MEC a diferencia de lo que ocurrió en los explantes infectados *ex vivo* en tan solo 24 horas.

El parásito posee proteasas tales como la cruzipaina que es capaz de degradar el colágeno IV y fibronectina y otros componentes de la MEC, facilitando así la exposición de nuevos epítopos a los que *T. cruzi* se puede unir (Scharfstein y Morrot., 1999).

Entre el trofoblasto y capilares fetales, el tejido conectivo fetal es otro obstáculo importante para el parásito. En la infección *ex vivo* de vellosidades coriónicas humanas con el parásito se observa una severa desorganización de moléculas de colágeno en general como de colágeno I en particular como lo demuestran las tinciones histoquímicas de Arta y picro rojo sirio-hematoxilina, respectivamente. (Duaso et al., 2010).

La degradación del colágeno se debe probablemente a la presencia de cruzipaina (Scharfstein y Morrot., 1999) o a la secreción de metaloproteinasas tipo gelatinasas B que son capaces de degradar al colágeno I (Nogueira *et al.*, 2010). Las metaloproteinasas, específicamente las MMP-2 y MMP-9 pueden ser

inducidas en el tejido por el parásito, cómo se ha observado en el miocardio en ratones con enfermedad de Chagas aguda. La inhibición de estas enzimas reduce la miocarditis y mejora la supervivencia durante la fase aguda de la infección en este modelo (Gutiérrez *et al.*, 2008). En nuestro laboratorio hemos determinado que el parásito induce tanto la expresión como la actividad de las MMP-2 y MMP-9 en las vellosidades coriónicas infectadas *ex vivo* (Memoria de título en preparación, Sr. Christian Castillo). En otros tejidos, específicamente en tejido conectivo que forma la lámina propia de los túbulos seminíferos de ratones, la infección por *T. cruzi*, también induce la desorganización del colágeno I (Carvalho *et al.*, 2009). Otro punto importante a considerar es que el colágeno es un componente fundamental de la red tridimensional que forma la MEC. Esta red tridimensional está formada por los distintos tipos de colágenos, fibras elásticas, glicoaminoglicanos, proteoglicanos y glicoproteínas (Junqueira y Carneiro., 2005). Si se destruye este "esqueleto básico" de la MEC, la conformación normal de MEC y el tejido se desorganiza, condición que facilitaría la movilización del parásito dentro de ellos. Además, se ha propuesto que las alteraciones de MEC producidas por la presencia del parásito no sólo promueven su movilidad en los tejidos y su entrada en las células, sino también alteran la presencia de citoquinas y quimioquinas, que a su vez permite a *T. cruzi* para modular y evadir la respuesta inmune (Marino *et al.*, 2003; Mendes-da-Silva *et al.*, 2006).

Esta memoria de título constituye el primer estudio histopatológico e histoquímico de las alteraciones tisulares presentes en placentas de madres con enfermedad de Chagas asintomática. Adicionalmente, los datos obtenidos en el presente estudio validan el modelo de infección *ex vivo* de vellosidades coriónicas humanas con el parásito.

CONCLUSIÓN

T. cruzi es capaz de infectar al tejido placentario *in vivo* e induce:

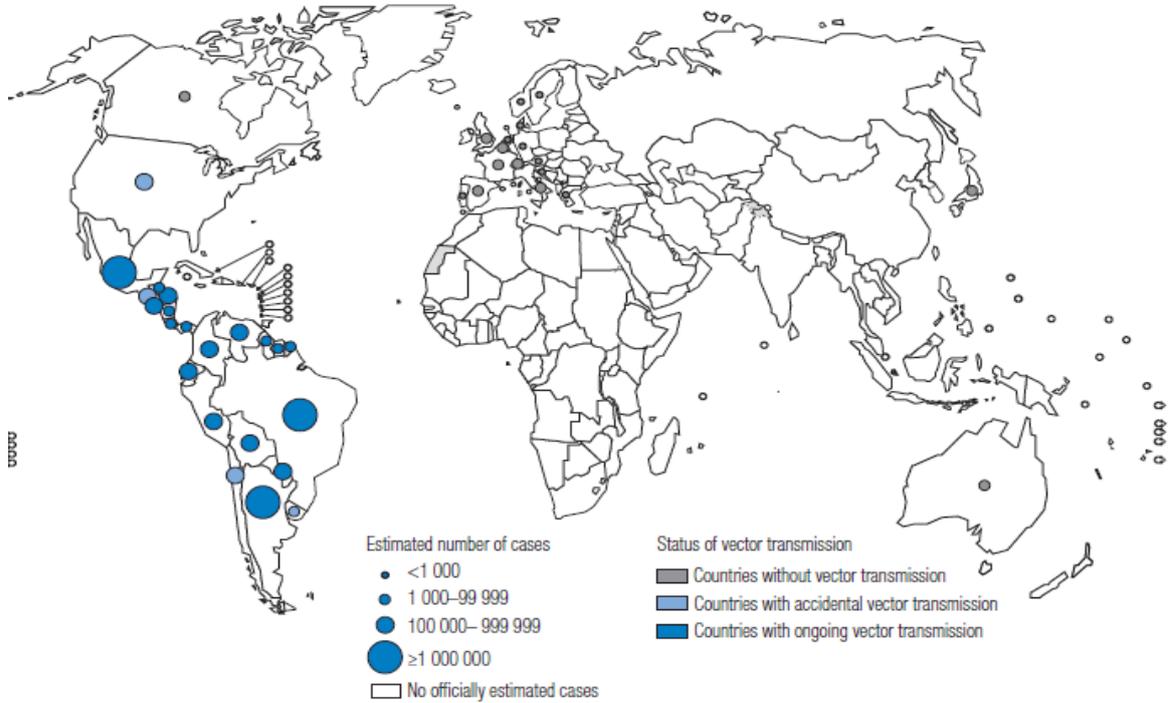
- a. Destrucción y desprendimiento del trofoblasto
- b. Desorganización del tejido conectivo fetal
- c. Desorganización selectiva de las láminas basales
- d. Desorganización de la matriz extracelular del tejido conectivo fetal, especialmente colágeno I

Las severas alteraciones histopatológicas que induce *T. cruzi* en las vellosidades coriónicas placentarias de mujeres con enfermedad de Chagas crónica asintomática y la ausencia de respuesta inflamatoria, indican que el parásito efectivamente es capaz de provocar una reorganización del tejido placentario y que regula además la respuesta inflamatoria e inmune en el huésped.

Se concluye que, la remodelación de la MEC de los tejidos placentarios, la carga parasitaria, junto con el estado inmunológico de la madre y el feto, determinan la probabilidad de la transmisión congénita de *T. cruzi*.

FIGURAS

FIGURA 1



Distribución geográfica a nivel mundial de casos de *Trypanosoma cruzi*, basado en las estimaciones oficiales y estado de la transmisión vectorial.

Fuente: World Health Organization, 2010.

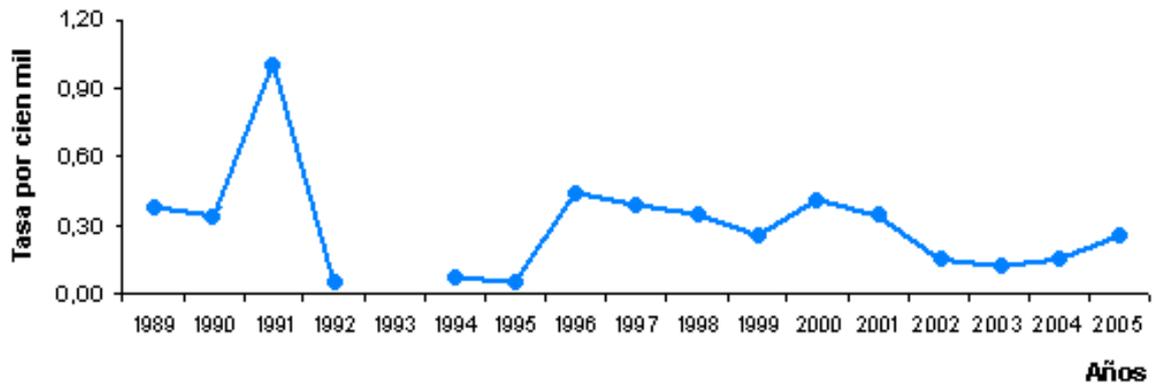
FIGURA 2

Parámetros Epidemiológicos	1990	2000	2006
Muertes anuales	➤ 45.000	21.000	12.500
Casos humanos de infección	30 millones	18 millones	15 millones
Nuevos casos anuales	700.000	200.000	41.200
Población en riesgo	100 millones	40 millones	28 millones
Distribución	21 países	21 países	21 países

Cambios en los parámetros epidemiológicos, por la interrupción de la transmisión y descenso de la incidencia de la enfermedad de Chagas, 1990-2000-2006.

Fuente: TDR/WHO; PAHO; WHO

FIGURA 3

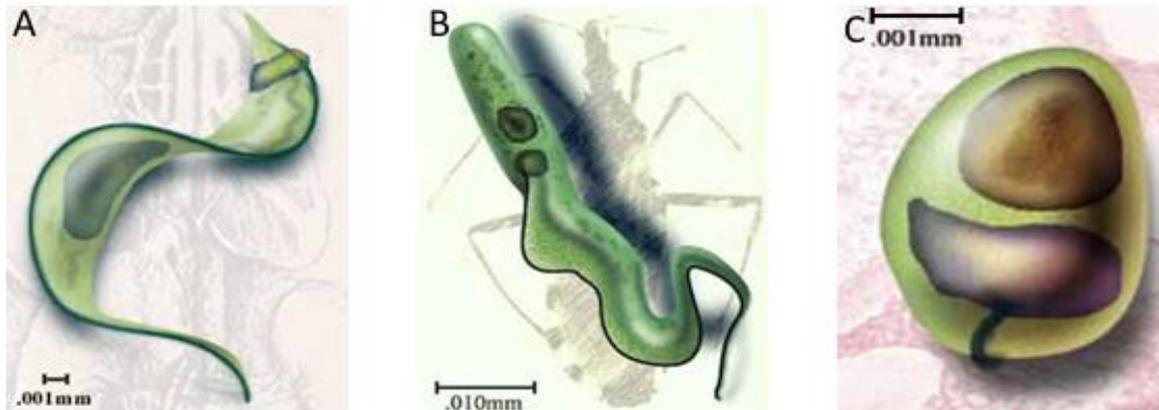


Tasa de incidencia de la enfermedad de Chagas en Chile.

*No existen datos para 1993.

Fuente: Ministerio de Salud

FIGURA 4



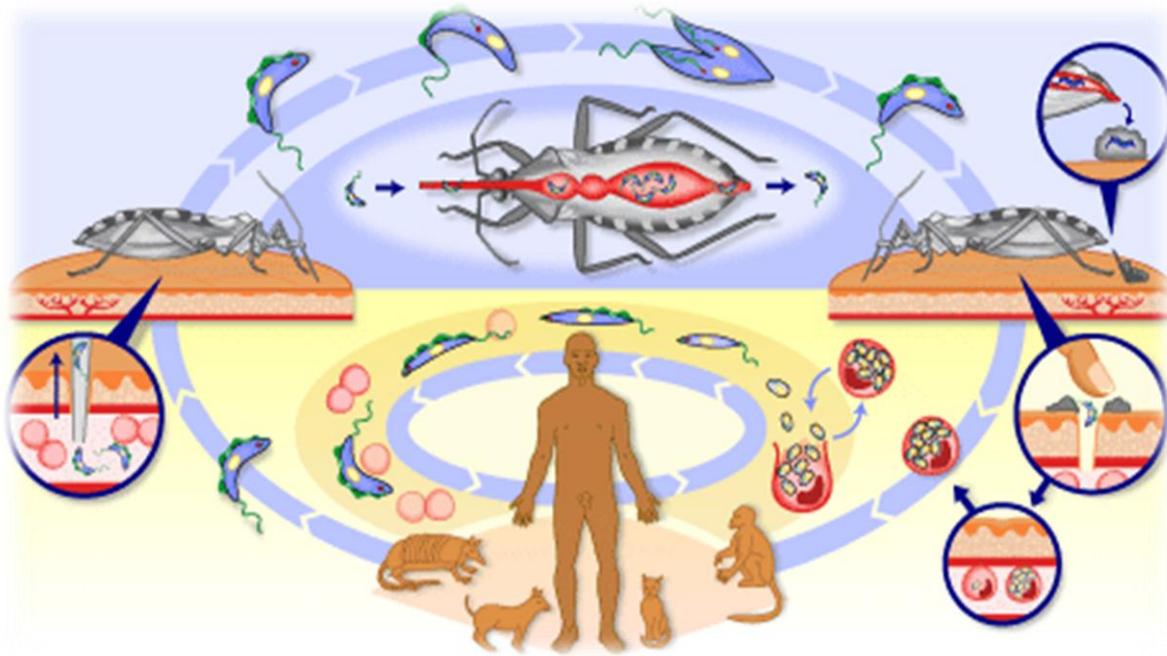
Formas celulares de *Trypanosoma cruzi*:

El parásito presenta tres formas celulares: (A) tripomastigote, forma infectante, no proliferativa; (B) epimastigote, forma replicativa ubicada en el tubo digestivo del agente vector y (C) amastigote, forma replicativa intracelular en los mamíferos.

Fuente: Universidad de Texas Arlington.

<<http://www.uta.edu/chagas/html/biolTcru.html>>

FIGURA 5



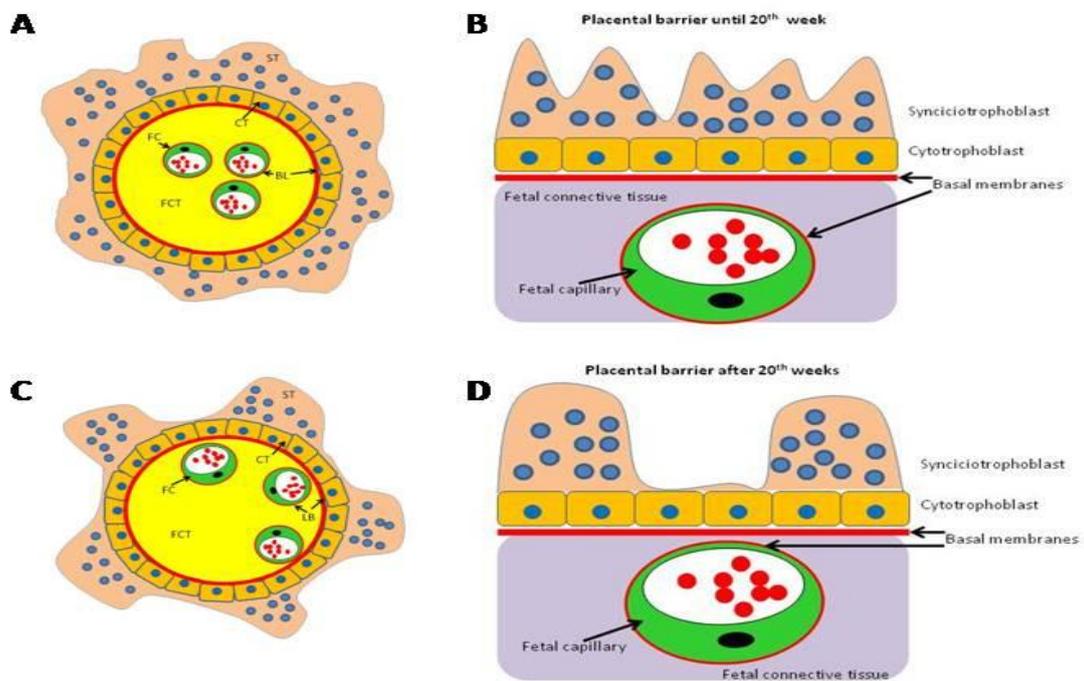
Ciclo de vida de *Trypanosoma cruzi*:

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

Fuente: Organización Mundial de la Salud

<<http://www.who.int/tdroid/diseases/chagas/lifecycle.htm>>

FIGURA 6

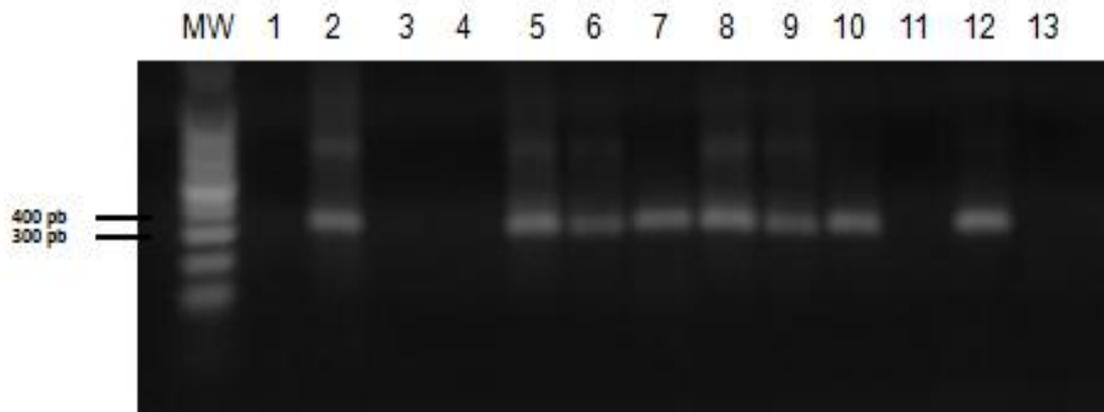


Barrera placentaria:

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.*, Biological Research, 2010

FIGURA 7



Detección de DNA de *T. cruzi* en madres, recién nacidos y

placentas mediante PCR: 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®

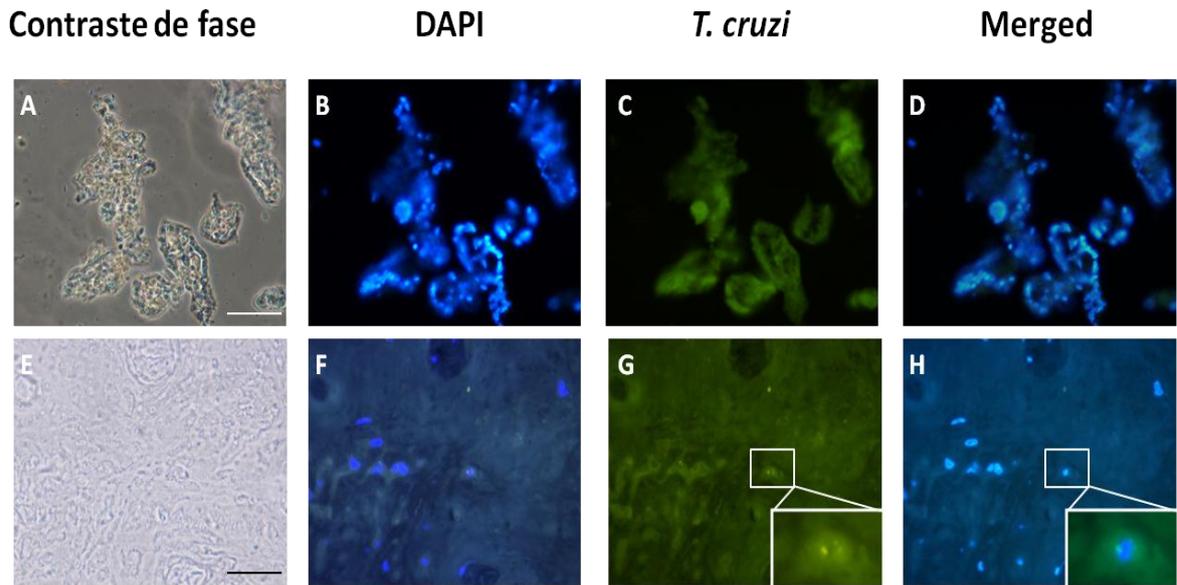
Carriles:

MW: Marcadores de peso molecular

1. Control negativo (sin DNA)
2. DNA de epimastigotes
3. DNA de sangre periférica sin enfermedad de Chagas
4. DNA de placenta de madre sana sin enfermedad de Chagas
5. DNA de sangre periférica de madre 1
6. DNA de placenta de madre 1
7. DNA de cordón umbilical de recién nacido de madre 1
8. DNA de sangre periférica de madre 2
9. DNA de placenta de madre 2
10. DNA de cordón umbilical de recién nacido de madre 2
11. DNA de sangre periférica de madre 3
12. DNA de placenta de madre 3
13. DNA de cordón umbilical de recién nacido de madre 3

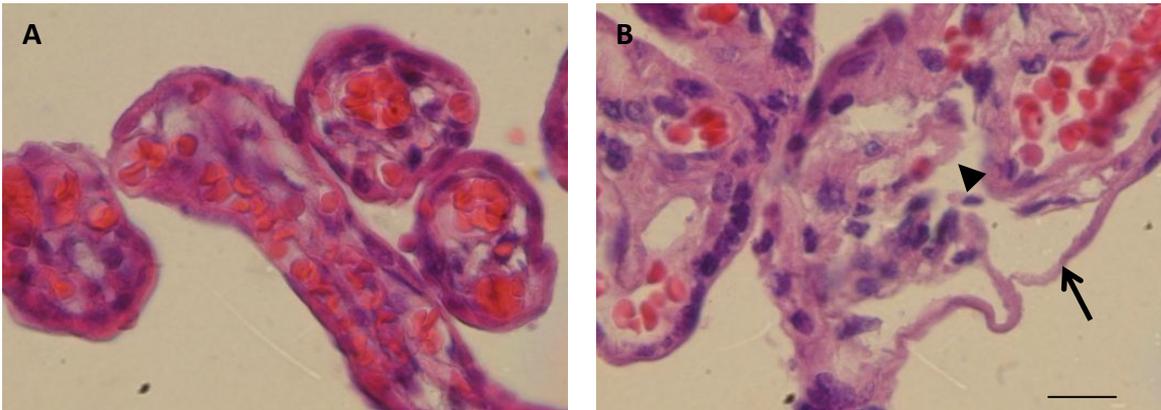
Nótese que en el tercer caso, DNA parasitario sólo puede ser detectado en la placenta.

FIGURA 8



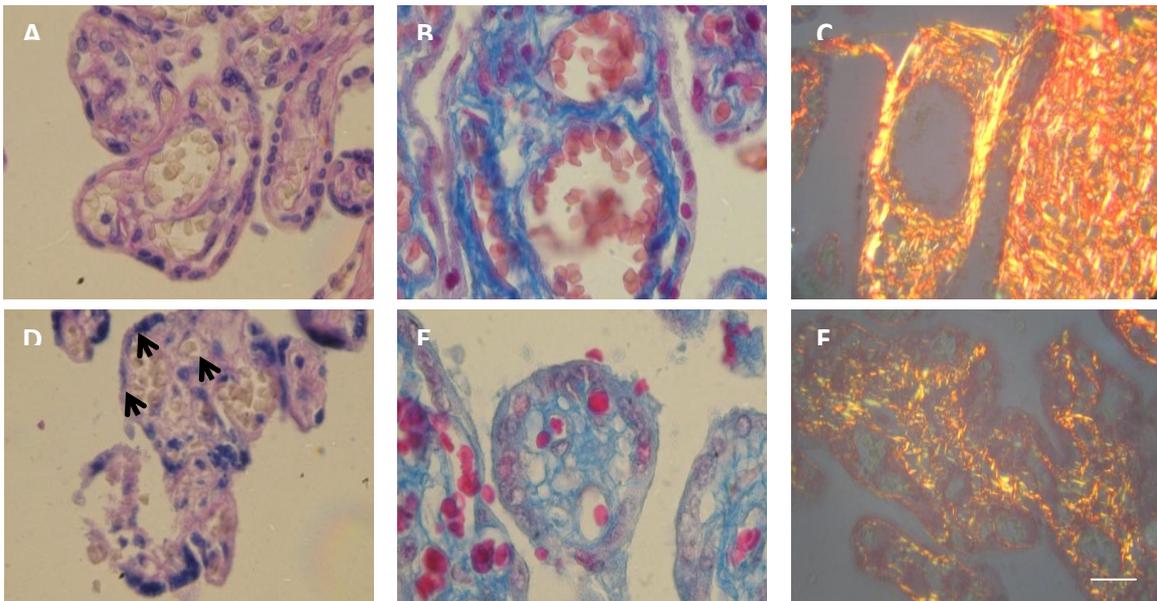
Detección de *T. cruzi* mediante inmunofluorescencia: Muestras obtenidas de madres con enfermedad de Chagas (E-H) presentan inmunoreactividad para el parásito en el tejido conectivo fetal (Anticuerpo monoclonal (m25 Ab) específico para: “*T. cruzi* flagellar calcium-binding protein” (1:100 v/v)). A-D muestran vellosidades coriónicas obtenidas de madres sin enfermedad de Chagas. Las muestras fueron procesadas para inmunofluorescencia de rutina. Barras de aumento: 50µm (A-D); 25µm (E-H).

FIGURA 9



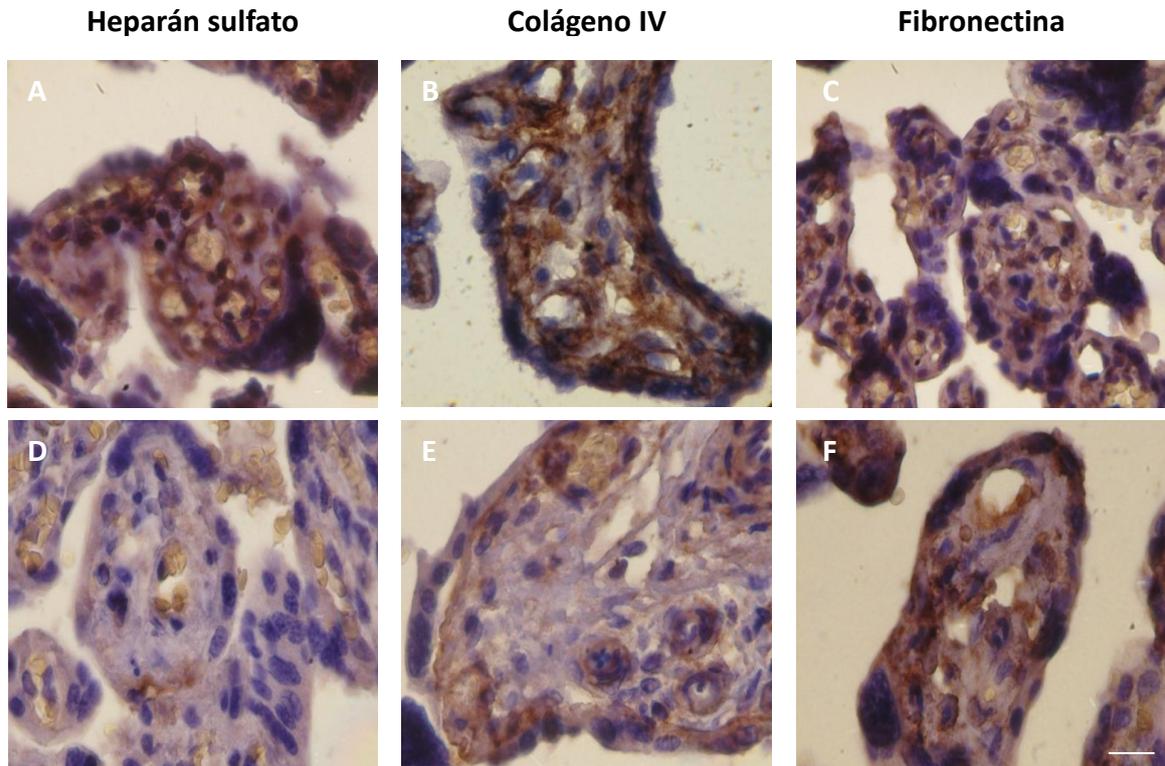
Análisis histopatológico de vellosidades coriónicas provenientes de madres con enfermedad de Chagas crónica asintomática: Vellosidades coriónicas humanas provenientes de placentas de madres con enfermedad de Chagas (B) muestran un marcado daño tisular respecto a las vellosidades controles (A). Se observa separación y desorganización del sinciciotrofoblasto así como daño en el tejido conectivo fetal. Las vellosidades coriónicas fueron procesadas mediante técnicas histológicas convencionales y teñidas con hematoxilina-eosina. Barra de aumento: 25 μm .

FIGURA 10



Vellosidades coriónicas de placentas de madres con enfermedad de Chagas presentan severa desorganización de la MEC: Vellosidades coriónicas humanas obtenidas de placentas de madres con enfermedad de Chagas (D-F) muestran un marcado daño tisular respecto a las vellosidades controles (A-C). Se observa una marcada disminución para moléculas glicosiladas (D) para colágenos en general (E), colágeno I (F) respecto a los controles (A-C). Las vellosidades coriónicas fueron procesadas mediante técnicas histológicas convencionales y teñidas con las técnicas de PAS (A-C), Arteta (B, E) y picro rojo sirio (C, F). Barra de aumento. 20 μ m.

FIGURA 11



Vellosidades coriónicas de placentas de madres con enfermedad de Chagas presentan desorganización selectiva de componentes de láminas basales:

Vellosidades coriónicas de placentas de madres chagásicas presentan pérdida de inmunoreactividad para heparansulfato (D) y disminución para colágeno IV (E) respecto a los controles (A-B). No se observa cambios en la inmunoreactividad para fibronectina (C; F). Las vellosidades coriónicas fueron procesadas mediante técnicas inmunohistoquímicas convencionales y la reacción antígeno anticuerpo fue revelado con DAB-H₂O₂. Barra de aumento. 20 μm.

TABLA 1

	Madre 1	Madre 2	Madre 3
Edad de la madre (años)	42	32	39
Edad de gestación (meses)	38	36	40
Tipo de parto	Normal	Cesárea	Normal
Peso al nacimiento (gr)	2880	2690	3550
Diagnóstico de la enfermedad de Chagas de la madre	ELISA/IFI +	ELISA/IFI +	ELISA/IFI +
Detección del parásito en el recién nacido mediante el examen parasitológico directo	Negativo	Negativo	Negativo
Detección de DNA parásitario en la madre por PCR	Positivo	Positivo	Negativo
Detección de DNA parásitario en el recién nacido por PCR	Positivo	Positivo	Negativo
Detección de DNA parásitario en la placenta por PCR	Positivo	Positivo	Positivo

BIBLIOGRAFÍA

- **ACEVEDO, S.; ESPINO S.; GALLARDO JM.; VELÁSQUEZ B.; CAMARGO L.; GUZMÁN M. 2008.** La placenta humana: Revisión. *Perinatol Reprod Hum* 2008; 22: 230-245 [en línea]; URL disponible en: <http://www.medigraphic.com/pdfs/inper/ip-2008/ip083g.pdf> [consulta: 15-08-2011].
- **ALBERTS, B., JOHNSON, A., LEWIS J., RAFF, M., ROBERTS, K., WALTER, P. 2008.** *Molecular Biology of the Cell*, Fifth Edition, Garland Science; New York
- **ALONSO-VEGA, C.; HERMANN, E.; TRUYENS, C.; RODRIGUEZ, P.; TORRICO, MC.; TORRICO, F.; CARLIER, Y. 2005.** Immunological status of mothers infected with *Trypanosoma cruzi*. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 38 Suppl 2:101-4.
- **ALTEMANI, AM; BITTENCOURT, AL; LANA, AM. 2000.** Immunohistochemical characterization of the inflammatory infiltrate in placental chagas´disease: A cualitative and quantitative analysis. *Am J. Trop. Med. Hyg.* 62(2): 319-324
- **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 Biol Chem* 277:6207-6213
- **ANDRADE, LO.; ANDREWS, NW. 2005.** The *Trypanosoma cruzi*-host-cell interplay: location, invasion, retention. *Nat Rev Microbiol.* 3(10):819-23.
- **APT, WB.; HEITMANN, IG.; JERCIC, MIL.; JOFRÉ, LM.; MUÑOZ, PCV.; NOEMÍ, IH.; SAN MARTÍN, AMV.; SAPUNAR, JP; TORRES, MH.; ZULANTAY, IA. 2008** Guía clínica de enfermedad de Chagas: Diagnóstico de laboratorio. *Revista Chilena de Infectología* [en línea]; 25 (5): 380-383. URL disponible en: <http://www.scielo.cl/pdf/rci/v25n5/art12.pdf> [consulta: 30-11-2011].
- **BELKACEMI, C.; CHEN, C.H.; ROSS, M.G.; DESAI M. 2009.** Increased Placental Apoptosis in Maternal Food Restricted Gestations: Role of the Fas Pathway. *Placenta* 30: 739–751
- **BERN, C.; RODRIGUES COURA, J.; GOLDENBERG, S.; GUHL, F.; VERISSIMO JUNQUEIRA, AC.; LORCA, M.; LUQUETTI, AO.; SÁEZALQUEZAR, A.; TORRICO, F.; SETSU UMEZAWA, E.; WARD, B.; ALBAJAR VIÑAS, P.; CHAVES, G.; FLEVAUD, L.; GOIRI, J.; GUILLERM, M.; KARUNAKARA, UK.; LOTROWSKA, M.; ROCHA, S.; USDIN, M. 2008.** International meeting: new diagnostic tests are urgently needed to treat patients with Chagas disease. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* [en línea]; 41 (3): 315-319. URL disponible en: <http://www.scielo.br/pdf/rsbmt/v41n3/a20v41n3.pdf> [consulta: 30-11-2011].

- **BERN, C.; MONTGOMERY, SP.; HERWALDT, BL. 2007** Evaluation and Treatment of Chagas Disease in the United States: A Systematic Review. *Journal of the American Medical Association* [en línea]; 298 (18): 2171-2181. URL disponible en: <http://jama.ama-assn.org/cgi/reprint/298/18/2171> [consulta: 17-10-2011].
- **BIEDERMANN, K.; FLEPP, M.; FIERZ, W.; JOLLER-JEMELKA, H.; KLEIHUES, P. 1995.** Pregnancy, immunosuppression and reactivation of latent toxoplasmosis. *J. Perinat. Med.* 23(3):191-203.
- **BITTENCOURT, A. 1992.** Possible risk factors for vertical transmission of chagas' disease. *rev. inst. med. trop. Sao Paulo* 34, 403-408.
- **BLANCO, SB.; SEGURA, EL.; CURA, EN.; CHUIT, R.; TULIÁN, L.; FLORES, I.; GARBARINO, G.; VILLALONGA, JF., GÜRTLER, RE. 2000.** Congenital transmission of *Trypanosoma cruzi*: an operacional outline for detecting and treating infected infants in northwestern Argentina *Tropical Medicine and International Health* [en línea]; 5 (4): 293–301. URL disponible en: <http://www3.interscience.wiley.com/cgi-bin/fulltext/119190741/PDFSTART?CRETRY=1&SRETRY=0> [consulta: 17-10-2011].
- **BLANCO, SB.; SEGURA, EL.; GÜRTLER RE.1999.** El Control de la transmisión congénita de *Trypanosoma Cruzi* en la Argentina *Medicina (Buenos Aires)* [en línea]; 59 (2): 138-142. URL disponible en: http://www.medicinabuenosaires.com/revistas/vol59-99/supl2/v59_s2_138_142.pdf [consulta: 19-10-2011].
- **CABRERA, G.; ESPINOZA, I.; KEMMERLING, U.; GALANTI, N. 2010.** *Mesocestoides corti*: morphological features and glycogen mobilization during in vitro differentiation from larva to adult worm. *Parasitology.* 2010 Mar; 137 (3):373-84.).
- **CALVET, C. M.; OLIVEIRA, F. O. R.; ARAÚJO-JORGE, T. C.; PEREIRA, M. C. S. 2009.** "Regulation of extracellular matrix expression and distribution in *Trypanosoma cruzi*-infected cardiomyocytes.," *Int J Med Microbiol* (299:4), pp. 301--312.
- **CARLIER, Y. 2005.** Factors and mechanisms involved in the transmission and development of congenital infection with *Trypanosoma cruzi* *Rev Soc Bras Med Trop.* 38(2):105-7.
- **CARLIER, Y.; TRUYENS, C. 2010.** Maternal-fetal transmission of *Trypanosoma cruzi* to congenital chagas disease: definitions and limits. In: *American trypanosomiasis Chagas disease: One hundred years of research.* Elsevier Insights. Londres, Inglaterra. pp. 539-582.
- **CARVALHO, LO.; ABREU-SILVA, AL.; HARDOIM, DDE J.; TEDESCO, RC.; MENDES, VG.; DA COSTA, SC.; CALABRESE, KS. 2009.** *Trypanosoma cruzi* and

myoid cells from seminiferous tubules: interaction and relation with fibrous components of extracellular matrix in experimental Chagas' disease. *Int. J. Exp. Pathol.* 90(1):52-7.

- **CASTRO, JA.; DE MECCA, MM.; BARTEL, LC. 2006** Toxic side effects of drugs used to treat Chagas' disease (American trypanosomiasis). *Hum Exp Toxicol.* 25(8):471-9.
- **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.*102 (1):113-22.
- **CROSS, JC. 2006.**Placental function in development and disease. *Reprod Fertil Dev.* 18(1-2):71-6.
- **DALEY, W. P.; PETERS, S. B.; LARSEN, M. 2008.** "Extracellular matrix dynamics in development and regenerative medicine.," *J Cell Sci* (121:Pt 3),pp. 255--264.
- **DE SOUZA, EM.; ARAFFLJO-JORGE, TC.; BAILLY ,C.; LANSIAUX, A.; BATISTA, MM.; OLIVEIRA, GM.; SOEIRO, MN. 2003.** Host and parasite apoptosis following *Trypanosoma cruzi* infection in *in vitro* and *in vivo* models. *Cell. Tissue. Res.* 314:223–235.
- **DE SOUZA, EM.; MEUSER-BATISTA, M.; BATISTA, DG.; DUARTE, BB.; ARAÚJO-JORGE, TC.; SOEIRO, MNC. 2008.***Trypanosoma cruzi*: Alpha-2-macroglobulin regulates host cell apoptosis induced by the parasite infection *in vitro*. *Experimental Parasitology* 118: 331–337.
- **DE SOUZA, W. 2002.** From the cell biology to the development of new chemotherapeutic approaches against trypanosomatids: dreams and reality. *Kinetoplastid Biol. Dis.* 31;1(1):3.
- **DERRIEN, M.; FAYE, A.; DOLCINI, G.; CHAOUAT, G.; BARRÉ-SINOUSSE, F.; MENU, E. 2005.** Impact of the placental cytokine-chemokine balance on regulation of cell-cell contact-induced human immunodeficiency virus type 1 translocation across a trophoblastic barrier *in vitro*. *J. Virol.* 79(19):12304-10.
- **DUASO, J.; ROJO, G.; JAÑA, F.; GALANTI, N.; CABRERA, J.; BOSCO, C.; LÓPEZ-MUÑOZ, R.; MAYA, J.D.; FERRERIRA, J.; KEMMERLING, U. 2011a.** *Trypanosoma cruzi* induces apoptosis in *ex vivo* infected human chorionic villi. *Placenta* 32: 356-361

- **DUASO, J.; ROJO, G.; CABRERA, G.; GALANTI, N.; BOSCO, C.; MAYA, J. D. 2010.** "*Trypanosoma cruzi* induces tissue disorganization and destruction of chorionic villi in an *ex vivo* infection model of human placenta.," *Placenta* (31:8), pp. 705--711.
- **FAÚNDEZ, M.; LÓPEZ-MUÑOZ, R.; TORRES, G.; MORELLO, A.; FERREIRA, J.; KEMMERLING, U. 2008.**"Buthionine sulfoximine has anti-*Trypanosoma cruzi* activity in a murine model of acute Chagas' disease and enhances the efficacy of nifurtimox.," *Antimicrob Agents Chemother* (52:5), pp. 1837--1839.
- **FERNANDEZ-AGUILAR, S.; LAMBOT, MA.; TORRICO, F.; ALONSO-VEGA, C.; CÓRDOBA, M.; SUAREZ, E.; NOËL, JC.; CARLIER Y. 2005** Placental lesions in human *Trypanosoma cruzi* infection. *Rev Soc Bras Med Trop.* 38 Suppl 2:84-6.
- **FLORES CHÁVEZ, M.; FAEZ, Y.; OLALLA, JM.; CRUZ, I.; GÁRATE, T.; RODRÍGUEZ, M.; BLANC, P.; CAÑAVATE, C. 2008** Fatal congenital Chagas' disease in a non-endemic area: a case report. *Cases Journal* [en línea]; 1:302. URL disponible en: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/picrender.fcgi?artid=2585580&blobtype=pdf> [consulta: 18-10-2011].
- **FRAGATA, AA J.; CORREIA, EB.; BORGES, R JR.; VASCONCELOS, MO.; JANCZUK, D.; MARTINS, CSS. 2008.** Seqüência de transmissões não habituais da infecção chagásica em uma mesma família: transfusional para a mãe e congênita para o filho, de cepa de *Trypanosoma cruzi* resistente ao tratamento. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* [en línea]; 41 (1): 73-75. URL disponible en:<http://www.scielo.br/pdf/rsbmt/v41n1/a14v41n1.pdf> [consulta: 06-09-2011].
- **FRANTZ, C.; STEWART, K. M.; WEAVER, V. M. 2010.** "The extracellular matrix at a glance.," *J Cell Sci* (123:Pt 24), pp. 4195--4200
- **FRIEDMAN, JF.; MITAL, P.; KANZARIA, HK.; OLDS, GR.; KURTIS, JD. 2007.** Schistosomiasis and pregnancy. *Trends Parasitol.* 23(4):159-64.
- **GAMAIN, B.; SMITH, JD.; VIEBIG, NK.; GYSIN, J.; SCHERF, A. 2007.** Pregnancy-associated malaria: parasite binding, natural immunity and vaccine development. *Int. J. Parasitol.* 37(3-4):273-83
- **GARCÍA, MM.; DE RISSIO, AM.; VILLALONGA, X.; MENGONI, E.; CARDONI, RL. 2008.** Soluble tumor necrosis factor (TNF) Receptors (sTNF-R1 and -R2) in pregnant women chronically infected with *Trypanosoma cruzi* and their children. *Am. J .Trop. Med. Hyg.* 78(3):499-503.
- **GASCÓN, J.; ALBAJAR, P.; CAÑAS, E.; FLORES, M.; GÓMEZ, I PRAT, J.; HERRERA, RN.; LAFUENTE, CA.; LUCIARDI, HL.; MONCAYO, A.; MOLINA, L.; MUÑOZ, J.; PUENTE, S.; SANZ, G.; TREVIÑO, B.; SERGIO SALLES, X. 2007.** Diagnosis, Management, and Treatment of Chronic Chagas' Heart Disease in Areas

Where *Trypanosoma cruzi* Infection Is Not Endemic. Rev Esp Cardiol. Tropical [en línea]; 60 (3): 285-93. URL disponible en: http://www.revespcardiol.org/watermark/ctl_servlet?_f=10&pident_articulo=13100645&pident_usuario=0&pident_revista=255&fichero=255v60n03a13100645pdf001.pdf&ty=164&accion=L&origen=cardioeng&web=www.revespcardiol.org&lan=en [consulta: 20-10-2011].

- **GIORDANO, R.; FOUTS, D. L.; TEWARI, D.; COLLI, W.; MANNING, J. E.; ALVES, M. J. 1999.** "Cloning of a surface membrane glycoprotein specific for the infective form of *Trypanosoma cruzi* having adhesive properties to laminin.," *J Biol Chem* (274:6), pp. 3461--3468.
- **GUHL, F. 2007.** Chagas disease in Andean countries. Mem Inst Oswaldo Cruz. 102 (Suppl 1):29-38.
- **GUILBERT, L.; ROBERTSON, SA.; WEGMANN, TG. 1993.** The trophoblast as an integral component of a macrophage-cytokine network. Immunol. Cell. Biol. 71 (Pt 1):49-57.
- **GÜRTLER, RE.; SEGURA, EL.; COHEN, JE. 2003.** Congenital Transmission of *Trypanosoma cruzi* Infection in Argentina. Emerging Infectious Diseases [en línea]; 9 (1). URL disponible en: <http://www.cdc.gov/ncidod/EID/vol9no1/pdfs/02-0274.pdf> [consulta: 19-10-2011].
- **GUTIERREZ, F. R. S.; LALU, M. M.; MARIANO, F. S.; MILANEZI, C. M.; CENA, J.; GERLACH, R. F.; SANTOS. 2008.** "Increased activities of cardiac matrix metalloproteinases matrix metalloproteinase (MMP)-2 and MMP-9 are associated with mortality during the acute phase of experimental *Trypanosoma cruzi* infection.," *J Infect Dis* (197:10), 2008, pp. 1468--1476.
- **HERMANN, E.; ALONSO-VEGA, C.; BERTHE, A.; TRUYENS. C.; FLORES, A.; CORDOVA, M.; MORETTA, L.; TORRICO, F.; BRAUD, V.; CARLIER, Y. 2006.** Human congenital infection with *Trypanosoma cruzi* induces phenotypic and functional modifications of cord blood NK cells. *Pediatr. Res.* 60(1):38-43
- **HERMANN, E.; BERTHE, A.; TRUYENS, C.; ALONSO-VEGA, C.; PARRADO, R.; TORRICO, F.; CARLIER, Y.; BRAUD, V. M. 2010.** Killer cell immunoglobulin-like receptor expression induction on neonatal CD8⁺ T cells *in vitro* and following congenital infection with *Trypanosoma cruzi*. *Immunology*, 129: 418–426.
- **HERMANN, E.; TRUYENS, C.; ALONSO-VEGA, C.; RODRIGUEZ, P.; BERTHE, A.; TORRICO, F.; CARLIER, Y. 2004.** Congenital transmission of *Trypanosoma cruzi* is associated with maternal enhanced parasitemia and decreased production of interferon- gamma in response to parasite antigens. *J. Infect. Dis.* 189(7):1274-81

- **HERMANN, E.; TRUYENS, C.; ALONSO-VEGA, C.; EVEN, J.; RODRIGUEZ, P.; BERTHE, A.; GONZALEZ-MERINO, E.; TORRICO, F.; CARLIER, Y. 2002.** Human fetuses are able to mount an adultlike CD8 T-cell response. *Blood*. 100(6):2153-8.
- **HEUSSLER, VT.; KÜENZI, P.; ROTTENBERG, S. 2001.** Inhibition of apoptosis by intracellular protozoan parasites. *International Journal for Parasitology* 31: 1166-1176
- **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)
- **JÄRVELÄINEN, H.; SAINIO, A.; KOULU, M.; WIGHT, T. N.; PENTTINEN, R. 2009.** "Extracellular matrix molecules: potential targets in pharmacotherapy." *Pharmacol Rev* (61:2), pp. 198--223.
- **JAUNIAUX E.; GULBIS B.; BURTON G.J. 2003.** The human first trimester gestational sac limits rather than facilitates oxygen transfer to the foetus a review. *Placenta* 24 (Suppl. A), S86-S93.
- **JERCIC, MI.; MERCADO, R.; VILLARROEL, R. 2010.** Congenital *Trypanosoma cruzi* infection in neonates and infants from two regions of Chile where Chagas' disease is endemic. *J Clin Microbiol*. 2010 Oct;48(10):3824-6. Epub 2010 Aug 4. PubMed PMID: 20686091;PubMed Central PMCID: PMC2953114
- **JUNQUEIRA, LC.; CARNEIRO, J. 2005.** *Basic Histology: Text and Atlas* 11 edition McGraw-Hill Company
- **KEMMERLING, U.; BOSCO, C.; GALANTI, N. 2010.** Infection and invasion mechanism of *Trypanosoma cruzi* in the congenital transmission of Chagas' disease: A proposal. *Biol Res* 46(3): 307-316.
- **KIERNAN, JOHN ALAN. 2008.** *Histological and histochemical methods : theory and practice*, fourth edition, scion publishing ltd.
- **KOI H.; ZHANG J.; PARRY S. 2001.** The Mechanisms of Placental Viral Infection. *Ann N Y Acad Sci*. 943:148-56.
- **KUMAR V.; ABBAS AK.; FAUSTO N.; ROBBINS.; COTRAN. 2005.** *Pathologic Basis of Disease*. 7th ed. St. Louis, Mo: WB Saunders.
- **LILLYAN G.; ALMIRÓN J.; RENÉ J.; FIDEL M. 2009.** Chagas congénito: revisión de una enfermedad curable y subestimada. *Revista de Posgrado de la VIª Cátedra de Medicina*. N° 193 – Junio 2009 [en línea]; URL disponible en: http://med.unne.edu.ar/revista/revista193/4_193.pdf [consulta: 14-10-2011].
- **LIMA, AP.; ALMEIDA, PC.; TERSARIOL, IL.; SCHMITZ, V.; SCHMAIER, AH.; JULIANO, L.; HIRATA, IY.; MÜLLER-ESTERL, W.; CHAGAS, JR.; SCHARFSTEIN,**

- J. 2002** Heparan sulfate modulates kinin release by *Trypanosoma cruzi* through the activity of cruzipain. *J Biol Chem.* 277(8):5875-81
- **LIN, S.; SARTORI, MJ.; MEZZANO, L.; DE FABRO, SP. 2004** Epidermal growth factor (EGF) in the human placental infection with *Trypanosoma cruzi*. *Placenta.* 25(4):283-6.
 - **LIN, S.; SARTORI, MJ.; MEZZANO, L.; DE FABRO, SP. 2005.** Placental alkaline phosphatase (PLAP) enzyme activity and binding to IgG in Chagas' disease. *Placenta.* 26(10):789-95.
 - **LORCA, M.; SOTO, P.; RUIZ, M.; CONTRERAS, MDEL C.; SALINAS, P.; GUERRA, A.; IRRIBARRA, N.; BODOR, P.; VIVANCO, P.; ARREDONDO, A.; TRINCADO, A.; RAPHAEL, T.; EGAÑA, M.; PAVLETIC, C.; PARRA, A. 2006** Serological study for Chagas disease in children younger than 10 years old from Valparaiso and San Antonio, Chile. *Rev Med Chil.* 134(10):1345-6.
 - **LUCERO, RH.; BRUSÉS, BL.; FABRE, A.; ALONSO, JM. 2005** Infección Oculta por *T. Cruzii* en Áreas de Alta Prevalencia Chagásica. *Boletín del Instituto de Medicina Regional* ISSN 0325-9528.
 - **LUJÁN, CD.; TRIQUELL, MF.; SEMBAJ, A., GUERRERO, CE.; FRETES, RE. 2004** *Trypanosoma cruzi*: productive infection is not allowed by chorionic villous explant from normal human placenta in vitro. *Exp Parasitol.* 108(3-4):176-81
 - **MARCON, G. E. B.; ANDRADE, P. D.; DE ALBUQUERQUE, D. M.; DA SILVA WANDERLEY, J.; DE ALMEIDA, E. A.; GUARIENTO, M. E. 2002** "Use of a nested polymerase chain reaction (N-PCR) to detect *Trypanosoma cruzi* in blood samples from chronic chagasic patients and patients with doubtful serologies.," *Diagn Microbiol Infect Dis* (43:1), pp. 39--43.
 - **MARGONO, F.; MROUEH, J.; GARELY, A.; WHITE, D.; DUERR, A.; MINKOFF, HL. 1994.** Resurgence of active tuberculosis among pregnant women. *Obstet. Gynecol.* 83(6):911-4.
 - **MARINO, AP.; SILVA, AA.; PINHO, RT.; LANNES-VIEIRA, J. 2003.** *Trypanosoma cruzi* infection: a continuous invader-host cell cross talk with participation of extracellular matrix and adhesion and chemoattractant molecules. *Braz J Med Biol Res.* 36(8):1121-33.
 - **MAYA, J.D.; CASSELS, B.K.; ITURRIAGA-VÁSQUEZ, P.; FERREIRA, J.; FAÚNDEZ, M.; GALANTI, N.; FERREIRA, A.; MORELLO, A. 2006** Mode of action of natural and synthetic drugs against *Trypanosoma cruzi* and their interaction with the mammalian host *Comparative Biochemistry and Physiology, Part A* 146, 601–620.
 - **MENDES-DA-CRUZ, DA.; SILVA, JS.; COTTA-DE-ALMEIDA, V.; SAVINO, W. 2006.** Altered thymocyte migration during experimental acute *Trypanosoma cruzi*

infection: combined role of fibronectin and the chemokines CXCL12 and CCL4. *Eur. J. Immunol.* 36(6):1486-93.

- **MEZZANO, L.; SARTORI, MJ.; LIN, S.; REPOSSI, G.; DE FABRO, SP. 2005** Placental alkaline phosphatase (PLAP) study in diabetic human placental villi infected with *Trypanosoma cruzi*. *Placenta.* 26(1):85-92.
- **MOORE, KL.; PERSEAUD T.** 2004. *The Developing Human, Clinically Oriented Embryology* 7^o edition Elsevier. Pp. 215.
- **MOORE, KL; PERSEAUD, TVN;** 2008. *The Developing Human, Clinically Oriented Embryology* 8^o edition Elsevier. 111p
- **MORETTI, E.; BASSO, B.; CASTRO, I.; PAEZ, M. C.; CHAUL, M.; BARBIERI, G. 2005.** "Chagas' disease: study of congenital transmission in cases of acute maternal infection.," *Rev Soc Bras Med Trop* (38:1), pp. 53—55.
- **MOYA, P.; MORETTI, E. 1997.** Doença de Chagas congenita. In: Pinto Dias, J., Coura, J.R. (Eds.), *Clinica e terapeutica da doença de Chagas. Uma abordagem pratica para o clínico geral.* Editora Fiocruz, Rio de Janeiro, pp. 383_410.
- **NDE, P. N.; SIMMONS, K. J.; KLESHCHENKO, Y. Y., PRATAP, S.; LIMA, M. F.; VILLALTA, F. 2006.** "Silencing of the laminin gamma-1 gene blocks *Trypanosoma cruzi* infection.," *Infect Immun* (74:3), pp. 1643--1648.
- **NOGUEIRA, AC.; DE SOUZA, EP.; ELIAS, CG.; DOS SANTOS, AL.; BRANQUINHA, MH.; D'AVILA-LEVY, C.; DOSREIS, FC.; COSTA, TF.; LIMA, AP.; DE SOUZA, MC.; MEIRELLES, MN.; VERMELHO, AB. 2010.** Detection of matrix metallopeptidase-9-like proteins in *Trypanosoma cruzi*. *Exp. Parasitol.* 125(3):256-63.
- **OLEA. 1998.** Situación epidemiológica de la enfermedad de Chagas en Chile. Departamento de epidemiología. MINSAL. <http://epi.minsal.cl/epi/html/public/chagaschile.htm> [consulta: 21-11-2011].
- **PARKER, E.; SETHI, A. 2011.** Chagas disease: coming to a place near you. *Derm clin,* 29(1): 53-62.
- **PRATA, A. 2001.** Clinical and epidemiological aspects of Chagas disease. *Lancet Infect Dis.* Sep; 1(2):92-100.
- **RAGHUPATHY, R. 2001.** Pregnancy: success and failure within the Th1/Th2/Th3 paradigm. *Semin. Immunol.* 13(4):219-27.
- **RAGHUPATHY, R.; KALINKA, J. 2008** Cytokine imbalance in pregnancy complications and its modulation. *Front. Biosci.* 1;13:985-94
- **RASSI JR, A.; RASSI, A.; MARIN-NETO, J. A. 2010.** Chagas disease. *The Lancet,* 375(9723):1388-1402.
- **RIERA, C.; GUARRO, A.; EL KASSAB, H.; JORBA, JM.; CASTRO, M.; ANGRILL, R., GÁLLEGO M.; FISA, R.; MARTIN, C.; LOBATO A., PORTÚS M. 2006**

- Congenital Transmission of *Trypanosoma Cruzi* in Europe (Spain): A Case Report. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* [en línea]; 75 (6): 1078-1081. URL disponible en: <http://www.ajtmh.org/cgi/reprint/75/6/1078> [consulta: 14-10-2011].
- **ROCHA, G.; MARTINS, A.; GAMA, G.; BRANDÃO, F.; ATOUGUIA J. 2004** Possible cases of sexual and congenital transmission of sleeping sickness. *Lancet*. 17;363(9404):247
 - **RODRIGUES COURA, J. 2007** Chagas disease: what is known and what is needed – A background article. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* [en línea]; 102 (I): 113-122. URL disponible en: http://www.scielo.br/pdf/mioc/v102s1/cd_18.pdf [consulta: 11-10-2011].
 - **ROGERSON, SJ.; HVIID, L.; DUFFY, PE.; LEKE, RF.; TAYLOR, DW. 2007** Malaria in pregnancy: pathogenesis and immunity. *Lancet Infect Dis* 7(2):105-17
 - **SÁNCHEZ NEGRETTE, O.; MORA, MC.; BASOMBRÍO, MA. 2005.** High Prevalence of Congenital *Trypanosoma cruzi* Infection and Family Clustering in Salta, Argentina. *Pediatrics* [en línea]; 115 (6): 668-672. URL disponible en: <http://pediatrics.aappublications.org/cgi/reprint/115/6/e668> [consulta: 18-10-2011].
 - **SARTORI, MJ.; MEZZANO, L.; LIN, S.; REPOSSI, G., FABRO, SP. 2005** Cellular components and placental alkaline phosphatase in *Trypanosoma cruzi* infection *Rev Soc Bras Med Trop*. 38 Suppl 2:87-91.
 - **SARTORI, MJ.; PONS, P.; MEZZANO, L.; LIN, S.; DE FABRO, SP. 2003** *Trypanosoma cruzi* infection induces microfilament depletion in human placenta syncytiotrophoblast. *Placenta*. 24(7):767-71.
 - **SCHARFSTEIN, J.; MORROT, A. 1999.** "A role for extracellular amastigotes in the immunopathology of Chagas disease.," *Mem Inst Oswaldo Cruz* (94 Suppl 1), pp. 51-63.
 - **SCHIJMAN, AG.; ALTCHER, J.; BURGOS, JM.; BIANCARDI, M.; BISIO, M.; LEVIN, MJ.; FREILIJ, H. 2003** Aetiological treatment of congenital Chagas' disease diagnosed and monitored by the polymerase chain reaction *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* [en línea]; 52 (3): 441–449. URL disponible en: <http://jac.oxfordjournals.org/cgi/reprint/52/3/441> [consulta: 06-09-2011].
 - **SCHMUNIS, G. 2007.** Epidemiology of Chagas disease in non-endemic countries: the role of international migration. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 102 Suppl (PAHO 2006): 75-85.
 - **SEEHO, SK.; PARK, JH.; ROWE, J.; MORRIS, JM.; GALLERY, ED. 2008** Villous explant culture using early gestation tissue from ongoing pregnancies with known normal outcomes: the effect of oxygen on trophoblast outgrowth and migration. *Hum*

Reprod. PMID: 18325889

- **SHIPPEY, SH III.; ZAHN, CM.; CISAR, MM.; WU, TJ.; SATIN, AJ. 2005** Use of the placental perfusion model to evaluate transplacental passage of *Trypanosoma cruzi*. *Am J Obstet Gynecol.* 192(2):586-91.
- **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. *Clin Pharmacokinet.* 43(8):487-514.
- **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.
- **TEIXEIRA, A.; NASCIMENTO, R.; STURM, N. 2006.** Evolution and pathology in chagas disease, a review. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 101(5): 463-91.
- **TORRICO, F., ALONSO VEGA, C.; SUAREZ, E.; RODRIGUEZ, P.; TORRICO, MC.; LE DRAMAIX, M.; TRUYENS, C.; CARLIER, Y.2004.** Maternal *Trypanosoma Cruzi* Infection, Pregnancy Outcome, Morbidity, and Mortality of Congenitally Infected and Noninfected Newborns in Bolivia. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, [en línea]; 70 (2): 201–209. URL disponible en: <http://www.ajtmh.org/cgi/reprint/70/2/201> [consulta: 06-09-2011].
- **TORRICO, F.; ALONSO, VEGA C.; SUAREZ, E.; TELLEZ, T.; BRUTUS, L.; RODRIGUEZ, P.; TORRICO, MC.; SCHNEIDER, D.; TRUYENS, C.; CARLIER, Y. 2006** Are maternal re-infections with *Trypanosoma cruzi* associated with higher morbidity and mortality of congenital Chagas disease. *Tropical Medicine and International Health* [en línea]; 11 (5): 628–635. URL disponible en: <http://www3.interscience.wiley.com/cgi-bin/fulltext/118598756/PDFSTART> [consulta: 05-09-2011].
- **TRIQUELL MARÍA, F.; CINTIA DÍAZ-LUJÁN.; HECTOR, FREILIJ.; PATRICIA, PAGLINI.; RICARDO, E. FRETES. 2009.** Placental infection by two subpopulations of *Trypanosoma cruzi* is conditioned by differential survival of the parasite in a deleterious placental medium and not by tissue reproduction. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* en prensa.
- **TRUYENS, C.; HERMANN, E.; ALONSO-VEGA, C.; RODRIGUEZ, P.; VEKEMANS, J.; TORRICO, F.; CARLIER, Y. 2005.** Immune responses of non-infected neonates of mothers infected with *Trypanosoma cruzi*. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 38 Suppl 2:96-100.

- **TYLER, K.; ENGMAN, D. 2001.** Invited Review. The life cycle of *Trypanosomacruzi* revisited. *International Journal for Parasitology*; 31: 472-81.
- **WERNER, APT B.; INGRID, HEITMANN G.; M. ISABEL, JERCIC L.; LEONOR JOFRÉ, M.; PATRICIA MUÑOZ, C. DEL V.; ISABEL NOEMÍ, H.; ANA M., SAN MARTÍN V.; JORGE SAPUNAR P.; MARISA TORRES H.; INÉS ZULANTAY A. 2008.** Guías clínicas de la enfermedad de Chagas: Parte I. Introducción y epidemiología. *Rev. Chil Infectol.* 25 (3): 189-193.
- **WORLD HEALTH ORGANIZATION. 2007.** Reporte del grupo de trabajo científico sobre la enfermedad de Chagas. Programa Especial de Investigación y enseñanza sobre enfermedades tropicales (TDR). [World Health Organ Tech Rep Series. En línea] <<http://apps.who.int/tdr/svc/publications/tdr-research-publications/reporte-enfermedad-chagas>> [consulta: 19-07-2011]. [consulta: 05-09-2011].
- **WORLD HEALTH ORGANIZATION. 2010** First report on neglected tropical diseases: working to overcome the global impact of neglected tropical diseases.
- **YOSHIDA, N. 2006.** Molecular basis of mammalian cell invasion by *Trypanosoma cruzi*. *An Acad Bras Cienc.* 78(1):87-111
- **ZULANTAY, I.; HONORES, P.; SOLARI, A.; APT, W.; ORTIZ, S.; 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), pp. 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
-------------------------------	----------------	----------------

<u>Ulrike Kemmerling</u> Nombre del investigador	<u>Ulrike Kemmerling</u> Firma	<u>26/6/08</u> 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 Paz**
Directora Unidad de Prevención de Riesgos y Bioseguridad



* Se adjunta anexo IX.1 Proyecto Fondecyt

c.c.

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

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

ANEXO 3



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE MEDICINA

COMITÉ DE ÉTICA DE INVESTIGACIÓN EN SERES HUMANOS



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

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

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

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

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

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

Notificación oportuna de reacciones adversas: No es necesaria.

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

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

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



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE MEDICINA

COMITÉ DE ÉTICA DE INVESTIGACIÓN EN SERES HUMANOS

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

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



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

25 JUN. 2008

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

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