



UNIVERSIDAD DE CHILE.
FACULTAD DE MEDICINA.
ESCUELA DE TECNOLOGÍA MÉDICA.

**EVALUACIÓN DEL EFECTO DE FÁRMACOS
ANTICHAGÁSICOS SOBRE LA FUNCIÓN ENDOTELIAL
EN MODELO *EX VIVO* DE INFECCIÓN POR
TRYPANOSOMA CRUZI.**

TESIS PROFESIONAL PARA OPTAR AL TÍTULO DE TECNÓLOGO MÉDICO CON
MENCION EN BIOANÁLISIS CLÍNICO, HEMATOLOGÍA Y BANCO DE SANGRE.

AUTOR: Alexandra Mackarena Sandoval Vilches

TUTORES: Christian Castillo Rivas

Ulrike Kemmerling Weis

2014

INDICE

RESUMEN	6
SUMMARY	7
INTRODUCCIÓN	8
MARCO TEÓRICO	10
Historia.....	10
<i>Trypanosoma cruzi</i>	10
Características celulares de <i>Trypanosoma cruzi</i>	12
Mecanismos de Transmisión.....	13
Etiopatogenia.....	15
Manifestaciones clínicas	16
Cardiomiopatía chagásica crónica	18
Diagnóstico	19
Tratamiento.....	20
Simvastatina	22
Infección <i>ex vivo</i> de vellosidades coriónicas placentarias humanas con <i>T. cruzi</i>	23
HIPÓTESIS	26
OBJETIVOS	27
Objetivo General	27
Objetivos Específicos	27

MATERIAL Y MÉTODO	28
Cultivos Celulares	28
Obtención de formas infectivas de <i>T. cruzi</i>	28
Obtención de placentas	29
Infección <i>ex vivo</i> de HPCVE con <i>T. cruzi</i>	30
Drogas	30
Metodologías citológicas e histológicas	31
Inmunofluorescencia.....	33
Detección de DNA parasitario mediante PCR en tiempo real.....	34
Análisis estadístico	35
Bioseguridad.....	35
Bioética.....	36
 RESULTADOS	 37
Bz y Simv previenen parcialmente el daño tisular observado en HPCVE infectadas <i>ex vivo</i> con <i>T. cruzi</i>	37
Bz y Simv previenen parcialmente el daño endotelial microvascular producido en HPCVE infectadas <i>ex vivo</i> con <i>T. cruzi</i>	40
Bz sólo y en combinación con Simv disminuyen la carga parasitaria en HPCVE infectadas <i>ex vivo</i> con <i>T. cruzi</i>	42
 DISCUSIÓN	 44
 CONCLUSIONES	 48
 FIGURAS	 49

Figura 1: Distribución Global de la enfermedad de Chagas y flujo de migraciones humanas.....	49
Figura 2: Distribución de vectores triatominos en América Latina	50
Figura 3: Formas celulares de <i>Trypanosoma cruzi</i>	51
Figura 4: Transmisión vectorial y ciclo de vida de <i>Trypanosoma cruzi</i>	52
Figura 5: Drogas utilizadas en el tratamiento de la enfermedad de Chagas.....	54
Figura 6: Barrera placentaria.....	55
Figura 7: Benznidazol y Simvastatina previenen la destrucción y el desprendimiento del sincitiotrofoblasto en vellosidades coriónicas infectadas <i>ex vivo</i> con <i>Trypanosoma cruzi</i>	56
Figura 8: Benznidazol y Simvastatina previenen la desorganización de la lámina basal en las vellosidades coriónicas infectadas <i>ex vivo</i> con <i>Trypanosoma cruzi</i>	57
Figura 9: Benznidazol y Simvastatina previenen la desorganización del colágeno tipo I en las vellosidades coriónicas infectadas <i>ex vivo</i> con <i>Trypanosoma cruzi</i>	58
Figura 10: Benznidazol y Simvastatina disminuyen la expresión de la molécula de adhesión ICAM-1 en las vellosidades coriónicas humanas infectadas <i>ex vivo</i> con <i>Trypanosoma cruzi</i>	60
Figura 11: Benznidazol sólo y en combinación con Simvastatina disminuyen la infectividad en las vellosidades coriónicas humanas infectadas <i>ex vivo</i> con <i>Trypanosoma cruzi</i>	61
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	63
ANEXOS.....	70
Anexo1.....	70

Anexo 2.....	73
Anexo 3.....	74

RESUMEN

La enfermedad de Chagas es causada por el parásito *Trypanosoma cruzi* y constituye un problema de Salud Pública cada vez más relevante en el mundo. Actualmente, las drogas antichagásicas disponibles presentan severos efectos adversos y son particularmente ineficientes durante la fase crónica de la enfermedad.

La cardiomiopatía chagásica es una de las principales y más graves manifestaciones clínicas de la enfermedad de Chagas crónica. Se caracteriza por presentar disfunciones endoteliales microvasculares, que generan un estado endotelial activado, vasoconstrictor y protrombótico, en el cual el endotelio expresa tromboxano y moléculas de adhesión vasculares tales como ICAM-1.

Las estatinas como la Simvastatina, actúan mediante la inducción de lipoxinas accionadas por aspirina como 15-epi-lipoxina que tienen un efecto anti-agregante plaquetario y vasodilatador.

El efecto de Simvastatina sola y en combinación con Benznidazol fue estudiado en un modelo de infección **ex vivo** en explantes de vellosidades coriónicas placentarias humanas (HPCVE) infectadas con *Trypanosoma cruzi*.

Simvastatina sola y en combinación con Benznidazol previenen parcialmente el daño tisular y la disfunción endotelial causado por *T. cruzi*. Además su combinación, disminuye la carga parasitaria del tejido placentario.

SUMMARY

Chagas disease is caused by the parasite *Trypanosoma cruzi* constituting a public health problem of increasing relevance in the world. Unfortunately, the available antichagasic drugs present severe adverse effects and are particularly inefficient during the chronic phase of the disease.

Chagasic cardiomyopathy is the major and most serious clinical manifestations of chronic Chagas disease. It is characterized by microvascular endothelial dysfunctions, such as an activated endothelium, vasoconstriction and a prothrombotic state, in which endothelium expresses thromboxane and vascular adhesion molecules such as ICAM-1.

Statins, such as Simvastatin, act through induction of aspirin-triggered lipoxins. Between them, 15-epi-lipoxin mediates anti-platelet, anti-inflammatory and vasodilator effects.

Here, the effect of simvastatin alone and in combination with benznidazole was studied in **ex vivo** infected human placental chorionic villi explants model (HPCVE) with *Trypanosoma cruzi*.

Simvastatin alone and in combination with Benznidazole partially prevent placental tissue damage and endothelial dysfunction caused by *T. cruzi*. Furthermore combination decreases the parasitic load of the placental tissue.

INTRODUCCIÓN

La enfermedad de Chagas corresponde a una infección parasitaria crónica causada por el protozoo hemoflagelado *Trypanosoma cruzi* (*T.cruzi*). Esta patología es endémica de América Latina, sin embargo, debido a migraciones, actualmente se detecta fuera de nuestro continente y constituye un problema de Salud Pública cada vez más relevante.^(1, 2) **(Fig. 1)**

El parásito posee un ciclo de vida indirecto, cuyos vectores biológicos son insectos hematófagos del género *Triatominae* (comúnmente conocidos como vinchucas), y sus hospederos definitivos corresponden a mamíferos, incluido el ser humano.

La vía de transmisión más importante de esta enfermedad es la vectorial. Sin embargo, el parásito también puede transmitirse mediante transfusiones sanguíneas, trasplante de órganos, consumo de alimentos contaminados y por vía transplacentaria.⁽³⁾ La transmisión congénita, vía placenta, es la principal responsable de la “globalización” de la enfermedad de Chagas.⁽⁴⁾

T. cruzi adopta tres formas morfológicas durante su ciclo biológico, las que se caracterizan por su tamaño y posiciones relativas del flagelo, kinetoplasto y núcleo. Dentro de estas formas celulares encontramos al amastigote que es la forma replicativa intracelular en células mamíferas, el epimastigote que es la forma replicativa en el tracto

digestivo de los insectos vectores, y el tripomastigote que es la forma infectiva para el mamífero.⁽⁵⁾

Actualmente se utilizan dos drogas para el tratamiento de la enfermedad de Chagas: Nifurtimox (Nx) y Benznidazol (Bz). Sin embargo, ambas drogas tienen una eficacia limitada, particularmente en la fase crónica, y se han descrito diversos efectos secundarios adversos, que van desde trastornos digestivos hasta neuropatías. Debido a lo anterior es necesaria la búsqueda de otras estrategias terapéuticas que puedan superar las dificultades que tiene el tratamiento vigente.⁽²⁾

Las disfunciones endoteliales microvasculares constituyen parte de los mecanismos etiopatogénicos de la enfermedad de Chagas. Estas disfunciones microvasculares se caracterizan por un estado endotelial activado y vasoconstrictor, así como también protrombótico, en el cual el endotelio expresa tromboxano y moléculas de adhesión vasculares tales como ICAM-1 (molécula de adhesión intercelular-1), VCAM-1 (molécula de adhesión de células vasculares-1) y E-Selectina.⁽⁶⁾ Las estatinas como la Simvastatina, actúan mediante la inducción de lipoxinas accionadas por aspirina (ATLs ó 15-epi-lipoxina) y tienen un efecto anti-agregante plaquetario y vasodilatador.

En esta memoria de título se estudia el efecto combinado de Simvastatina con Benznidazol en un modelo ya estandarizado de infección *ex vivo* de explantes de vellosidades coriónicas placentarias humanas.⁽⁴⁾

MARCO TEÓRICO

Historia

La enfermedad de Chagas es una infección parasitaria crónica causada por el protozoo hemoflagelado *T. cruzi*. Esta patología fue descubierta por Carlos Chagas (1879-1934), médico brasileño que describió tanto al agente etiológico, el vector, los principales reservorios, el mecanismo de infección, así como las manifestaciones clínicas agudas de la enfermedad.⁽⁷⁾

Trypanosoma cruzi

T. cruzi es un parásito hemoflagelado que posee un ciclo de vida indirecto, cuyos vectores biológicos son insectos hematófagos del género *Triatominae* (comúnmente conocidos como vinchucas), y donde los mamíferos corresponden a hospederos definitivos, incluido el ser humano.⁽¹⁾

La vía de transmisión más importante de esta enfermedad es la vectorial. Se han descrito tres ciclos de transmisión vectorial: domiciliario, peridomiciliario y silvestre siendo el domiciliario el ciclo más relevante en la infección del ser humano.⁽¹⁾

En la transmisión vectorial tipo domiciliaria, perros y gatos son los principales reservorios que contribuyen a la mantención de la infección, mientras que en el peridomiciliario son los roedores domésticos junto con el ganado caprino, bovino y ovino. En el ciclo silvestre los principales reservorios son mamíferos del hábitat silvestre. Estos animales son los que permiten la mantención del *T. cruzi* e impiden la completa erradicación del parásito.⁽⁸⁾

Los principales vectores en América del Sur son *Triatoma infestans*, *Triatoma brasiliensis* y *Panstrongylus megistus*, mientras que *Rhodnius prolixus* y *Triatoma dimidiata* se localizan principalmente en el norte de Sudamérica y América Central.⁽⁹⁾

(Fig. 2)

En Chile se encuentran tres vectores: *Triatoma infestans* que participa principalmente en el ciclo domiciliario y peridomiciliario; además de *Mepraia spinolai* y *Mepraia gajardoi* que participan mayoritariamente en el ciclo silvestre.⁽¹⁰⁾

Características celulares de *Trypanosoma cruzi*

T. cruzi adopta tres formas morfológicas durante su ciclo biológico, las que se caracterizan por tamaño y por las posiciones relativas del flagelo, kinetoplasto y núcleo.⁽⁵⁾

Dentro de estas formas celulares encontramos al amastigote, el cual mide aproximadamente 2-4 micrómetros de diámetro, es de forma esférica u ovalada y no presenta flagelo emergente. Corresponde a la forma replicativa intracelular en células mamíferas. Antes de su liberación desde las células del hospedero, los amastigotes se diferencian a tripomastigotes, los cuales circulan por sangre periférica y son capaces de difundir la infección, sustentando el ciclo vital del parásito. **(Fig. 3A)**

El epimastigote es la forma replicativa en el tracto digestivo de los insectos vectores, mide aproximadamente 20-25 micrómetros de largo, tiene forma fusiforme, un flagelo libre y su kinetoplasto se encuentra anterior al núcleo central.⁽¹¹⁾ Esta forma también se encuentra en los medios de cultivo axénicos. **(Fig. 3B)**

El tripomastigote es la forma no-replicativa y extracelular en los mamíferos. Es una célula que mide aproximadamente 25-27 micrómetros de largo, de forma fusiforme, que posee un kinetoplasto subterminal o posterior al núcleo, un flagelo libre y una membrana ondulante a lo largo de su cuerpo.⁽¹¹⁾ Se encuentran tanto en la sangre de los mamíferos, como en el intestino posterior de los triatomíneos. Constituye la forma infectiva para el mamífero y la forma celular que disemina la infección por vía sanguínea. **(Fig. 3C)**

Mecanismos de Transmisión

T. cruzi presenta un ciclo biológico indirecto, en el cual los triatominos se infectan al alimentarse con sangre de mamíferos que contienen tripomastigotes. En su aparato digestivo anterior y medio, estos tripomastigotes se diferencian a epimastigotes, los cuales se replican y avanzan hacia el intestino posterior del insecto, donde se diferencian a tripomastigotes metacíclicos que corresponden a la forma infectiva para los mamíferos, incluidos humanos. Los triatominos cuando vuelven a alimentarse, inmediatamente depositan sobre la piel del individuo sus deyecciones contaminadas con tripomastigotes metacíclicos. Las formas infectivas ingresan al individuo a través de piel y mucosas, que es facilitado por rascarse o frotarse la zona de la picadura y por enzimas proteolíticas de la saliva de los insectos. En el hospedero mamífero los tripomastigotes metacíclicos son fagocitados por células presentadoras de antígenos y se diferencian a amastigotes, la forma de replicación intracelular. Tras varias divisiones, los amastigotes se diferencian a tripomastigotes que provocan la lisis de las células infectadas, ingresan a la circulación sanguínea e infectan a nuevas células de tejidos blanco, como miocardio, músculo esquelético, músculo liso visceral, células de la glía del sistema nervioso y placenta.^(1, 3) **(Fig. 4)**

Existen otros mecanismos de transmisión de la enfermedad de Chagas como la transfusión sanguínea, donde el riesgo de adquirir la enfermedad luego de ser transfundido con una unidad de sangre corresponde a un 10%.⁽¹²⁾

También se puede transmitir la enfermedad por ingerir bebidas o alimentos contaminados con *T. cruzi* la cual es infrecuente, pero altamente mortal.⁽¹³⁾

Otra vía de transmisión documentada es el trasplante de órganos sólidos y de médula ósea.

La transmisión congénita es la principal responsable de la “globalización” de la enfermedad de Chagas. La frecuencia de su transmisión varía entre un 1–21% en la población ⁽¹⁴⁾, siendo más frecuente en las regiones endémicas.^(15, 16) En dos regiones endémicas de Chile, la IV y la V, las tasas de transmisión congénita corresponden a un 4,6% ⁽¹⁷⁾ y 7,9% ⁽¹⁸⁾, respectivamente.

Etiopatogenia

El daño en los órganos y tejidos que ocurre en la fase aguda es producto tanto de la presencia del parásito como de la respuesta inflamatoria que se origina en el hospedero.⁽¹⁹⁾

La producción de citoquinas proinflamatorias es necesaria para el control del parásito, mientras que las citoquinas anti-inflamatorias como Interleuquina 10 (IL-10) y Factor de Crecimiento Transformante β (TGF- β) promueven la replicación del parásito, puesto que inhiben la actividad de los macrófagos con función tripanocida.⁽²⁰⁻²²⁾

En la infección crónica, si el sistema inmune del hospedero es ineficiente para controlar al parásito y en consecuencia existe una alta carga parasitaria, se produce un aumento de daño en los tejidos tanto por la presencia del parásito como por la presencia de una respuesta inflamatoria. Por el contrario, si hay una buena respuesta inmune, capaz de mantener una baja carga parasitaria, se reduce tanto la inflamación como el daño en los tejidos del hospedero.⁽²³⁾

Las disfunciones endoteliales microvasculares constituyen parte de los mecanismos etiopatogénicos de la enfermedad de Chagas. Estas disfunciones microvasculares se caracterizan por un estado endotelial activado, vasoconstrictor y protrombótico, en el cual el endotelio expresa tromboxano y moléculas de adhesión vasculares tales como ICAM-1, VCAM-1 y E-Selectina.⁽⁶⁾

Manifestaciones clínicas

Existen tres fases en esta enfermedad: aguda, latente y crónica.

La fase aguda comienza inmediatamente después de la inoculación del parásito y tiene una duración de 4 a 8 semanas. Se caracteriza por una elevada parasitemia producto de la multiplicación del parásito en las células del hospedero y su liberación al torrente sanguíneo. Sin embargo, esta fase generalmente es asintomática o presenta sintomatología leve de una infección inespecífica y es autolimitada.⁽³⁾

No obstante, en algunas personas como niños e inmunosuprimidos pueden presentarse manifestaciones generalizadas de la infección, tales como fiebre prolongada, malestar general, hepatomegalia y esplenomegalia, aumento de los ganglios linfáticos, edema subcutáneo, presencia de Chagoma como el signo de Romaña (edema bpalpebral), e incluso grados variables de cardiomegalia. Rara vez se presenta miocarditis, meningoencefalitis o neumonitis, pero tienen gran riesgo de muerte.⁽¹⁶⁾ El tratamiento con fármacos tripanocidas generalmente cura la infección en esta etapa y previene el daño crónico.⁽²⁴⁾

Un porcentaje de los pacientes (60-70%) no desarrolla manifestaciones clínicas agudas, pero pasan a la fase de latencia, que es una etapa que se caracteriza porque disminuye la parasitemia, pero los parásitos son capaces de mantenerse en sus tejidos durante meses e incluso años hasta que aparecen los síntomas clínicos de la fase crónica.⁽²⁵⁾

La aparición del estado crónico puede tardar años o décadas después de la infección inicial. En áreas endémicas, entre el 15 y 20% de los pacientes manifiestan la

fase crónica, la que se asocia a la presencia de megacolon y megaesófago debido a una denervación del sistema nervioso autónomo, así como a alteraciones cardíacas como arritmia e hipertrofia cardíaca con insuficiencia progresiva.⁽⁵⁾

El curso de la enfermedad depende de diferentes factores: carga parasitaria en el sitio de la inoculación, cepa del parásito, primoinfección o reinfección, estado inmunológico del hospedero y tipo de vector.⁽²⁶⁾

Cardiomiopatía chagásica crónica

La cardiomiopatía chagásica corresponde a la manifestación más seria y frecuente de la etapa crónica de la enfermedad, presentándose en un 20-30% de los individuos.⁽²⁷⁾ Se caracteriza por anomalías en el sistema de conducción, arritmias, aneurismas apicales, insuficiencia cardíaca, trombo embolismo e incluso muerte súbita.

El daño producido en el tejido cardíaco depende de la presencia del parásito, la respuesta inmune del hospedero inducida por el parásito, la disautonomía cardíaca, las anomalías microvasculares y de la isquemia.⁽²⁾

Estudios previos en ratones han demostrado alteraciones microvasculares caracterizadas por la formación de microtrombos, disfunción de células endoteliales y un aumento de la actividad plaquetaria, que implican un aumento de la permeabilidad vascular, moléculas de adhesión y tromboxano A2.

Se ha demostrado que el uso de dosis bajas de Bz reduce la carga parasitaria, previene el daño cardíaco y modula la activación endotelial, disminuyendo los niveles de tromboxano y la expresión de moléculas de adhesión tales como ICAM-1 y E-Selectina que se incrementan en la infección miocárdica por *T. cruzi*.⁽⁶⁾

Diagnóstico

En la infección aguda el diagnóstico se puede realizar a través de la observación directa de los tripomastigotes en un frotis sanguíneo, lámina/laminilla o microStrout.

En la infección crónica se requieren de métodos más sensibles para la detección del parásito, como el uso de tests basados en la amplificación del DNA de *T. cruzi* a través de PCR. También se utilizan métodos indirectos o de inmunodiagnóstico que detectan anticuerpos de tipo IgG específicos anti-*T. cruzi* en el suero de los pacientes, mediante el uso de test de ELISA o RIFI.

Otra forma de detección es el xenodiagnóstico que consiste en utilizar triatomíneos libres de parásitos y dejar que succionen sangre desde el paciente sospechoso y examinar las deyecciones de las vinchucas 30 y 60 días después para ver si existe presencia del parásito vivo.

Tratamiento

Actualmente el tratamiento para la Enfermedad de Chagas consiste en el uso de dos drogas con eficacia comprobada que son Nifurtimox (Nx) derivado de Nitrofurano, y Benznidazol (Bz) derivado de Nitroimidazol. **(Fig. 5)** No obstante, en el caso de embarazadas o pacientes que padecen insuficiencia renal o hepática severa este tratamiento está contraindicado.⁽¹⁾

El Benznidazol tiene un perfil de mayor seguridad y eficacia, por tanto se utiliza más como tratamiento de primera línea.^(1, 3)

Ambas drogas son activas contra todas las formas del parásito.⁽²⁸⁾ Sin embargo, se ha descrito que su efectividad es mayor sobre la forma infectante extracelular de *T. cruzi* que sobre la forma intracelular replicativa característica de la fase crónica.⁽²⁹⁾

Las dosis terapéuticas recomendadas en la fase aguda son de 8-10 mg/kg/día para Nx y 5 mg/kg/día para Bz. El tratamiento en general para la fase aguda dura entre 60 a 90 días, en cambio para la fase crónica el tiempo se puede prolongar incluso hasta 5 meses.

Los efectos adversos más frecuentes del Bz son malestar general, dermatitis alérgica localizada que ocurre en un 20-30% de los pacientes y neuropatía sensitiva periférica en un 5-10%. En el caso de Nx los síntomas gastrointestinales son los más comunes y se presentan en un 50% de los pacientes.⁽³⁾

El mecanismo de acción de estas drogas es a través de la formación de radicales libres y/o metabolitos electrofílicos, los cuales alteran por distintas vías la estructura de las macromoléculas biológicas del parásito, tales como lípidos, proteínas y DNA.⁽³⁰⁾

Simvastatina

La Simvastatina (Simv) es un fármaco de la familia de las estatinas que actúa como un inhibidor de la 3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A reductasa, que corresponde a la enzima marcapaso que participa en la biosíntesis del colesterol.⁽³¹⁾

Las estatinas tienen un potente efecto anti-inflamatorio, vasodilatador y antiplaquetario en el endotelio.⁽³²⁾

El uso de estatinas conduce a un aumento en la producción de 15-epi-lipoxina A4 que corresponde a un eicosanoide inducido por aspirina con una potente actividad anti-inflamatoria.⁽³³⁾ Por otro lado, las estatinas reducen la activación del factor de transcripción nuclear κ B, disminuyen la expresión de moléculas de adhesión vasculares como ICAM-1, VCAM-1, E-Selectina y Endotelina-1, así como las citoquinas pro inflamatorias IL-6, TNF- α e IL-8, lo que podría explicar su efecto antiinflamatorio.^(34, 35)

La Simv, debido a su efecto anti-inflamatorio y vasodilatador podría constituir una alternativa terapéutica que podría ser utilizada en conjunto con las drogas antichagásicas convencionales y así disminuir sus efectos secundarios adversos.

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

Los HPCVE están siendo utilizados como modelo de estudio de la infección tisular *ex vivo* de *T. cruzi*.⁽⁴⁾ Estudios realizados en nuestro laboratorio indican que el parásito posee una estrategia de invasión tisular que es aún más compleja que la descrita para la infección celular.

Por ende, este modelo permite condiciones experimentales que se asemejen más a lo que ocurre *in vivo* y con la posibilidad de experimentar en un tejido humano, de fácil obtención, sin afectar al paciente. La placenta es expulsada del cuerpo de la madre durante el alumbramiento y no cumplirá otras funciones ni en la madre ni en el recién nacido.⁽¹⁴⁾

La placenta es el órgano de intercambio de nutrientes y gases entre la madre y el feto.^(36, 37) 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.^(38, 39) La membrana o barrera placentaria está formada por tejidos extrafetales que separan la sangre materna de la fetal. Esta barrera se compone de trofoblasto (epitelio bi-estratificado compuesto por sinciotrofoblasto y citotrofoblasto), tejido conectivo de las vellosidades coriónicas libres y endotelio de los capilares fetales además de las láminas basales presentes entre los distintos compartimentos tisulares.⁽¹⁴⁾ **(Fig. 6)** Es importante destacar, que el trofoblasto está en contacto con la sangre materna y por ende se considera un modelo para el estudio de la función endotelial.⁽⁴⁰⁾

En el laboratorio se ha implementado y estandarizado un modelo de infección *ex vivo* de HPCVE con el parásito. El DNA parasitario es detectable en explantes infectados con 10^3 parásitos/ml y los antígenos parasitarios se evidencian mediante inmunofluorescencia en explantes infectados con 10^5 parásitos/ml.⁽⁴⁾ La infección con 10^5 y 10^6 tripomastigotes/ml se asemeja a las condiciones observadas en la enfermedad de Chagas crónica y aguda, respectivamente.⁽⁴¹⁾

Mediante estudios inmunohistoquímicos, histoquímicos (ácido periódico de Schiff (PAS) y picro rojo sirio) y microscopía electrónica se determinó que el parásito induce destrucción y desprendimiento del trofoblasto así como alteraciones en la matriz extracelular (MEC), específicamente desorganización selectiva de las láminas basales y del colágeno I en el tejido conectivo fetal.⁽⁴⁾ Alteraciones histopatológicas similares a las observadas en la infección *ex vivo* de HPCVE se aprecian en placentas de madres con enfermedad de Chagas crónica asintomática.⁽⁴²⁾

En este proceso participan proteasas endógenas del tejido, tales como las proteasas de la matriz (MMPs), como parte de los mecanismos celulares y tisulares de la infección placentaria. Así, la infección *ex vivo* de vellosidades coriónicas humanas con tripomastigotes de *T. cruzi*, inducen aumento de la expresión y actividad de las MMP (2 y 9). Doxicilina (inhibidor de MMPs) inhibe la actividad de estas enzimas y revierte parcialmente la desorganización de la MEC, específicamente la destrucción de moléculas glicosiladas así como de colágeno tipo I.⁽⁴³⁾

Adicionalmente, HPCVE han sido utilizadas para estudiar el efecto de diversas drogas sobre este tejido, incluyendo el efecto tóxico y terapéutico de Nx y Bz en relación a la infección con *T. cruzi*. Bz previene el daño tisular inducido por el parásito a diferencia de Nx que es tóxico *per se*. Aunque ambas drogas tienden a disminuir la carga parasitaria, no son capaces de impedir la infección.⁽⁴⁴⁾ Por ende, en esta tesis se estudian los posibles efectos tóxicos y terapéuticos de Simv sola y en combinación con Bz en HPCVE.

HIPÓTESIS

Simvastatina sola y en combinación con Benznidazol previenen la infección, el daño tisular y la disfunción endotelial inducido por *Trypanosoma cruzi* en HPCVE.

OBJETIVOS

Objetivo General

Evaluar el efecto de Simvastatina sola y en combinación con Benznidazol sobre la disfunción endotelial inducida por la infección con *Trypanosoma cruzi* en HPCVE.

Objetivos Específicos

Determinar en HPCVE el efecto de Simvastatina sola y en combinación con Benznidazol sobre:

1. El daño histopatológico en la barrera placentaria analizando:
 - a. Destrucción y desorganización del trofoblasto.
 - b. Destrucción y desorganización del colágeno tipo I y III en el tejido conectivo fetal.
 - c. Destrucción y desorganización de las láminas basales.
2. El daño endotelial microvascular sobre las vellosidades coriónicas placentarias humanas, mediante la determinación los niveles de expresión de la molécula de adhesión endotelial ICAM-1.
3. La infección de *Trypanosoma cruzi* mediante la determinación de la carga parasitaria.

MATERIALES Y MÉTODOS

Cultivos Celulares

Células VERO®, fibroblastos de riñón de mono verde africano (ATCC® CCL-81), fueron sembrados en frascos de cultivo de 25 cm² a una densidad de 4.000 células/cm², en medio RPMI suplementado con bicarbonato de sodio 0,22%, estreptomina 100 µg/ml, penicilina 100 µg/ml y suero fetal bovino (SFB) al 10% para crecimiento o al 5% para mantenimiento. Las células fueron cultivadas a 37°C en una atmósfera húmeda con 5% CO₂, substituyendo el medio cada 24 a 48 horas.^(4, 45)

Obtención de formas infectivas de *T. cruzi*

Células VERO® en semi-confluencia fueron inoculadas con 1-2 ml de cultivo de epimastigotes cepa Ypsilon (Y) envejecido (fase estacionaria). Este cultivo presenta aproximadamente un 5% de la forma infectiva tripomastigote. Los tripomastigotes invaden las células VERO®, se diferencian intracelularmente en amastigotes y como tales proliferan; después de 4 o 5 días se diferencian nuevamente a tripomastigotes, lisan las células VERO® y son liberados de esta manera al medio de cultivo.

El medio de cultivo se recolectó y centrifugó a 500 x g por 5 minutos para separar las células en suspensión. El centrifugado se dejó en reposo durante 30 minutos a 37°C de modo que los tripomastigotes ascendieran hacia el sobrenadante.

Este sobrenadante fue recolectado y centrifugado a 3.000 x g durante 10 minutos a fin de obtener en el sedimento las formas infectivas de *T. cruzi*. Los tripomastigotes fueron re-suspendidos en medio RPMI, y el número de parásitos fue determinado mediante conteo en una cámara de Neubauer.^(4, 43, 45)

Obtención de placentas

La obtención de las placentas humanas de término fue a partir de partos por cesárea para asegurar la asepsia y preservación de la muestra.

Se utilizaron placentas de madres sanas con embarazos monogestacionales y fetos con crecimiento normal. Cualquier patología materna, fetal o placentaria fue un criterio de exclusión para su uso.

Los órganos fueron recolectados en tampón fosfato salino (PBS) pH 7,2 estéril y a 4°C. Las vellosidades coriónicas se obtuvieron de la parte central de los cotiledones, desechando las caras maternas y fetales, a 5 cm de la inserción del cordón umbilical.

Como producto final se obtuvieron trozos de tejido de vellosidades coriónicas (HPCVE) de aproximadamente 0,5 cm³, los cuales se lavaron al menos 5 veces con PBS estéril para eliminar los restos de sangre. Posteriormente, fueron incubados en medio RPMI suplementado con antibióticos y 5% de suero fetal bovino inactivado.⁽⁴⁾

Los procedimientos de obtención de placentas, manejo de las mismas y formulario de consentimiento informado fueron aprobados por el Comité de Ética Humana de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile. **(Anexo 1)**

Infección *ex vivo* de HPCVE con *T. cruzi*

Los HPCVE fueron cultivados con 10^5 ó 10^6 tripomastigotes/ml de la cepa Y durante 24 horas en medio de cultivo RPMI 1640 suplementado con SFB inactivado y antibióticos. Las vellosidades coriónicas controles se mantuvieron en las mismas condiciones, sin parásitos o drogas. Después de las diferentes condiciones experimentales, las vellosidades coriónicas fueron procesadas para estudios histológicos, bioquímicos y de biología molecular.⁽⁴⁾

Drogas

Las HPCVE fueron incubadas en presencia y ausencia de tripomastigotes, así como en presencia y ausencia de las drogas Simv y Bz. Las concentraciones utilizadas fueron Simv 10 μ M y Bz 20 μ M. La concentración de Bz corresponde al IC₅₀ (inhibitor concentration 50) que es la concentración de la droga necesaria para obtener el 50% de eliminación de la carga parasitaria, la cual fue determinada previamente *in vitro*.⁽⁴⁴⁾ La concentración de Simv fue estandarizada por el Laboratorio del Dr. Juan Diego Maya. Ambas drogas se solubilizaron en DMSO (dimetilsulfóxido), diluyendo luego esta solución en medio RPMI estéril hasta obtener la concentración adecuada para el experimento. La concentración final de DMSO en el medio de cultivo no fue superior a 0,1%.

Metodologías citológicas e histológicas

Las vellosidades coriónicas fueron fijadas en formaldehído 4% preparado en un tampón fosfato pH 7,3 durante 24 horas. A continuación fueron lavadas en agua corriente durante 2 horas, deshidratadas en concentraciones crecientes de etanol, aclarados en xilol e incluidas en parafina fundida a 60°C. Posteriormente se obtuvieron cortes de 5 y 8 µm de espesor para técnicas histológicas de rutina, histoquímicas e inmunofluorescencia.

Los cortes fueron colocados en portaobjetos sialinizados con carga positiva (Superfrost® plus, ThermoScientific) y sometidos a las diferentes tinciones descritas más adelante. Los preparados fueron montados con Entellan (Merck ®) ^(4, 43, 45, 46) y observados en un microscopio de epifluorescencia (Motic BA310). Las imágenes fueron obtenidas con una cámara digital (Moticam 5) acoplada al microscopio y analizadas mediante software Motic imagen plus 2.0, Image J y MATLAB.

a) Tinción hematoxilina-eosina

Este método fue utilizado para el análisis histológico de rutina. La hematoxilina es un colorante básico que tiñe estructuras basófilas de color azul-violeta, mientras que la eosina es un colorante ácido que tiñe estructuras acidófilas de color rojo-rosado.

Las muestras desparafinadas y rehidratadas fueron teñidas por 1 minuto con hematoxilina de Mayer, luego lavadas en agua corriente por 5 minutos, seguido de lavados en agua destilada por 2 minutos, teñidas con eosina acuosa acidificada al 0,5% con ácido acético glacial por 30 segundos y enjuagadas con agua destilada para luego ser procesadas según fue descrito más arriba.

b) Tinción de Ácido Periódico-Schiff

Este método fue utilizado para identificar moléculas altamente glicosiladas en el tejido placentario. El ácido periódico oxida los grupos hidroxilo de hexosas y pentosas neutras a aldehídos, los cuales son visualizados con el reactivo de Schiff resultando en un color rosado. Las membranas basales presentan macromoléculas con una gran cantidad de hidratos de carbono, por lo que serán teñidas con el reactivo PAS y otros colorantes que detecten glicoaminoglicanos.⁽⁴⁾

Se utilizó el kit de tinción PAS (kit PERIODIC ACID-SCHIFF (PAS) de Sigma-Aldrich®), según las instrucciones del fabricante. Los cortes desparafinados y rehidratados, se sumergieron en agua desionizada tres veces por 5 minutos cada vez, luego se sumergieron en la solución de ácido periódico durante 5 minutos a temperatura ambiente y se lavaron al menos 10 veces con agua destilada. Posteriormente, se sumergieron en reactivo Schiff durante 15 minutos a temperatura ambiente y se lavaron 5 minutos con agua corriente. El contraste nuclear se realizó con hematoxilina de Gill durante 90 segundos.⁽⁴⁾

c) Tinción de picro rojo sirio

Este método de histoquímica es utilizado para determinar elementos fibrilares de la matriz extracelular (MEC), específicamente colágeno tipo I y III. El rojo sirio es un colorante aniónico que tiñe las fibras de colágeno mediante la unión de sus grupos de ácido sulfocónico a residuos básicos presentes en las moléculas de colágeno.

La molécula de rojo sirio es alargada y se une de forma paralela a las moléculas de tropocolágeno, siendo esta asociación la responsable del aumento de la birrefringencia, que puede ser observada en un microscopio óptico con luz polarizada,

donde se puede apreciar el colágeno tipo I de color rojo o naranja y el colágeno tipo III de color verde.⁽⁴⁾

Las muestras desparafinadas y rehidratadas fueron teñidas por ocho minutos con hematoxilina de Mayer, lavadas con agua corriente por 10 minutos y luego sumergidas en una solución de picro rojo sirio (Sigma-Aldrich®) durante una hora. Posteriormente, se lavaron 2 veces con agua destilada acidificada al 0,5% con ácido acético glacial y finalmente 3 veces con agua destilada.⁽⁴⁾

Inmunofluorescencia

Los cortes desparafinados y rehidratados fueron incubados con suero normal equino R.T.U al 2,5% (ScyTek®, ACA) durante 1 hora. El anticuerpo primario monoclonal Anti-ICAM-1 (Santa Cruz Biotechnology® sc-71303) fue aplicado en una dilución 1:50 v/v durante toda la noche a 4°C. Posteriormente, las muestras fueron lavadas 3 veces con PBS por 5 minutos cada vez, e incubadas con el anticuerpo secundario fluorescente Anti-Rat IgG conjugado con Rhodamine (JACKSON IMMUNORESEARCH® 712-025-150) en una dilución 1:100 v/v durante 1 hora a 37°C y lavados con PBS como se explica más arriba.

Las muestras fueron teñidas con DAPI (4',6- diamino-2 fenilidol dicloridrato, THERMO®; 1µg/ml) durante 5 minutos, lavadas con PBS como se explica más arriba y montadas con medio para fluorescencia (VECTASHIELD® VECTOR, ScyTek, ACA).

Como control positivo se utilizó TNF-α (GIBCO® PHC3015) a una concentración de 10 ng/µL.

Los controles negativos de la técnica inmunofluorescencia fueron realizados mediante la sustitución de los anticuerpos primarios con PBS.⁽⁴⁾ Todo el proceso fue realizado en una cámara húmeda y en ausencia de luz. Las muestras fueron visualizadas en un microscopio de epifluorescencia como fue descrito más arriba.

Detección de DNA parasitario mediante PCR en tiempo real

Las muestras de las vellosidades coriónicas fueron lavadas al menos 10 veces con PBS estéril, posteriormente se extrajo el DNA genómico con el kit Wizard Genomic® (Promega) según indicaciones del fabricante. La cuantificación de la concentración del DNA se determinó mediante “µDrop Plate DNA quantification system” en un lector Varioskan Flash Multimode (Thermo Scientific, USA).

Para la amplificación del DNA humano y parasitario se utilizaron dos pares de partidores específicos. Se amplificó una secuencia de 100 pb correspondiente a GAPDH (gliceraldehído - 3 - fosfato deshidrogenasa) humana, utilizando los partidores hGDH-F (5'-TGATGCGTGTACAAGCGTTTT-3') y hGDH-R (5'-ACATGGTATTACACCCCACTAT-3'), que fueron diseñados con el software Primer Express (versión 3.0; Applied Biosystems®). Para la detección de *T.cruzi* se amplificó una secuencia de 182 pb de DNA correspondiente a DNA satélite de *T.cruzi* mediante el uso de los partidores TCZ-F (5'-GCTCTTGCCCCACAMGGGTGC-3') y TCZ-R (5'-CAAGCAGCGGATAGTTCAGG-3').^(43, 47)

Cada mezcla de reacción contenía 10 µM de cada primer, 1 ng de DNA de las muestras, 12,5 µL de SensiMix® SYBR Green Master Mix (Bioline®, EE.UU.) y H₂O libre de nucleasas para completar 25 µL. La amplificación se realizó en un termociclador

para PCR en tiempo real ABI Prism 7300 sequence detector (Applied Biosystems®, USA).

El programa de ciclos fue el siguiente: Primero un paso pre-denaturación a 50 °C durante 2 min, luego un paso de denaturación a 95°C durante 10 min y 40 ciclos de amplificación de: 95°C (15s), 60°C (15s) 72°C (30s). Por último, se añadió una etapa de disociación, que va desde 95°C a 60°C. El análisis de cuantificación relativa de los resultados se expresó como valor RQ (cuantificación relativa) según el método de control comparativo ($\Delta\Delta C_t$).^(43, 47)

Análisis estadístico

Los experimentos se realizaron en duplicado o triplicado en al menos 3 oportunidades distintas. Los resultados se expresaron como promedio \pm desviación estándar. La significancia de las diferencias se evaluó mediante prueba ANDEVA seguido de Dunnett post-test mediante el software GraphPad Prism6 (GraphPad Software, San Diego, EE.UU.) y se consideró un valor de $p \leq 0,05$ como estadísticamente significativo.

Bioseguridad

El laboratorio cuenta con un nivel de Bioseguridad Nivel II, certificado por la “Unidad de Prevención de Riesgos y Bioseguridad de la Facultad de Medicina”. La eliminación de tejido placentario humano fue enviada a la Unidad de Prevención de Riesgos y Bioseguridad, con una copia del consentimiento informado del paciente, desde donde fueron enviados a la empresa Procesan (empresa autorizada por la

“SEREMI de Salud ex-Sesma”) quien eliminó estos tejidos. Los residuos químicos se enviaron a la misma Unidad de Bioseguridad y Prevención de Riesgos y luego a la empresa HIDRONOR (también autorizado por la “SEREMI de Salud ex-Sesma”) para su eliminación. Cada reactivo químico en el laboratorio está debidamente inventariado de acuerdo con la guía: “Inventario de Productos Químicos, Facultad de Medicina”, y tiene su propia etiqueta de seguridad, que es proporcionada por el fabricante (NCh 2245) o descargada de Internet.

En el caso de un accidente la Facultad de Medicina tiene un acuerdo de atención médica con la “Asociación Chilena de Seguridad” para los miembros de la Facultad. Los estudiantes serán protegidos por la Ley 16744 y por el Convenio SEMDA, Hospital Clínico Universidad de Chile. **(Anexo 2)**

Bioética

Este proyecto cuenta tanto con la aprobación del Comité de Ética Humana de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile, así como del Comité de Ética de FONDECYT. **(Anexo 3)**

RESULTADOS

Bz y Simv previenen parcialmente el daño tisular observado en HPCVE infectadas *ex vivo* con *T. cruzi*.

HPCVE fueron incubadas durante 24 horas en presencia (**Figs. 7-9 C, G, H, I**) o ausencia (**Figs. 7-9 A, B, D, E, F**) de 10^5 tripomastigotes de la cepa Y; así como en presencia de Bz 20 μM (**Figs. 7-9 D, G**), Simv 10 μM (**Figs. 7-9 E, H**) o la combinación de ambas (**Figs. 7-9 F, I**). Las muestras fueron estudiadas con técnicas histológicas e histoquímicas de rutina para evaluar el efecto de Simv y su combinación con Bz en la prevención del daño tisular generado por el parásito en las vellosidades coriónicas. Se analizó la estructura del trofoblasto, de la lámina basal y del tejido conectivo fetal.

a) Trofoblasto

En las vellosidades coriónicas humanas el trofoblasto corresponde al tejido que se encuentra en contacto con la sangre materna. Constituye el primer tejido de la barrera placentaria que deben superar los patógenos para alcanzar al feto.

Las HPCVE, que fueron incubadas sólo en presencia del parásito (**Fig. 7 C**), muestran un severo daño histopatológico en comparación con las vellosidades control (**Fig. 7 A**), ya que se puede observar gran desprendimiento y destrucción del trofoblasto (**Flechas rojas Fig. 7 C**). Las muestras incubadas sólo con Bz, Simv o ambas drogas (sin el parásito) (**Fig. 7 D, E, F respectivamente**) muestran una estructura conservada del trofoblasto similar a lo observado en el control (**Fig. 7 A**). Las HPCVE incubadas

con parásitos y las distintas drogas y combinaciones (**Fig. 7 G, H, I respectivamente**) revelan una estructura conservada del trofoblasto sin destrucción o desprendimiento.

b) Lámina basal

Las láminas basales son estructuras de la MEC ubicadas entre tejidos epiteliales y tejidos conectivos. Son ricas en moléculas glicosiladas, pues presentan una alta concentración de glicoproteínas, glicoaminoglicanos y proteoglicanos. En las vellosidades coriónicas las láminas basales se localizan entre el trofoblasto y el tejido conectivo y alrededor de los capilares fetales.⁽¹⁴⁾

El daño en las láminas basales fue analizado mediante la técnica de tinción PAS, que permite evidenciar la pérdida de las moléculas altamente glicosiladas que componen la lámina basal.

HPCVE incubadas sólo en presencia del parásito muestran una disminución de la tinción PAS (**Fig. 8 C**) en relación a las muestras control (**Fig. 8 A**), indicando que el parásito altera la estructura de las láminas basales. Las vellosidades coriónicas incubadas en presencia de las drogas Bz, Simv y ambas drogas combinadas y en ausencia del parásito (**Fig. 8 D, E, F respectivamente**) exhiben un patrón de tinción similar al revelado por las vellosidades control (**Fig. 8 A**). Las vellosidades incubadas en presencia del parásito en conjunto con Bz, Simv o ambas drogas (**Fig. 8 G, H, I respectivamente**) también muestran una reactividad a la tinción PAS similar al control (**Fig. 8 A**).

c) Tejido conectivo fetal.

Para alcanzar los capilares fetales, el parásito también debe ser capaz de avanzar a través del tejido conectivo fetal. Este tejido conectivo es de tipo laxo y su MEC se compone principalmente de colágeno tipo I.

El daño en el tejido conectivo fetal fue evaluado mediante la técnica de tinción Picro Rojo Sirio, que evidencia la desorganización del colágeno tipo I y III en relación a la pérdida de la birrefringencia observada.

HPCVE incubadas sólo en presencia del parásito muestran una evidente pérdida de la birrefringencia (**Fig. 9 C**) respecto a las vellosidades control (**Fig. 9 A**), lo que demuestra que la presencia del parásito induce desorganización de la MEC en el tejido conectivo fetal. Cuando los HPCVE son incubados sólo en presencia de las drogas Bz, Simv o la combinación de ambas (**Fig. 9 D, E, F respectivamente**) en ausencia del parásito, se observa una birrefringencia similar a la observada en las muestras control (**Fig. 9 A**). Similarmente, los HPCVE expuestas a la presencia del parásito en presencia de Bz, Simv o la combinación de ambas drogas (**Fig. 9 G, H, I respectivamente**) muestran una birrefringencia similar a los controles (**Fig. 9 A**).

Bz y Simv previenen parcialmente el daño endotelial microvascular producido en HPCVE infectadas *ex vivo* con *T. cruzi*.

HPCVE fueron incubadas durante 24 horas en presencia (**Figs. 10 (*T.cruzi*), (*Bz+T.cruzi*), (*Simv+T.cruzi*), (*Bz+Simv+T.cruzi*)**) o ausencia (**Figs. 10 (Control), (TNF- α), (Bz), (Simv), (Bz+Simv)**) de 10^5 tripomastigotes de la cepa Y; así como en presencia de Bz 20 μ M (**Figs. 10 (Bz), (*Bz+T.cruzi*)**), Simv 10 μ M (**Figs. 10 (Simv), (*Simv+T.cruzi*)**) o ambas drogas (**Figs. 10 (*Bz+Simv*), (*Bz+Simv+T.cruzi*)**).

El daño endotelial microvascular producido por *T. cruzi* en las vellosidades coriónicas humanas, fue evaluado por medio de la expresión de la molécula de adhesión endotelial ICAM-1, ya que el endotelio activado expresa una mayor cantidad de moléculas de adhesión vascular. Debido a lo anterior, el aumento de expresión de ICAM-1 en relación al control fue considerado como indicador de mayor daño endotelial.

La detección de ICAM-1 fue realizada mediante inmunofluorescencia, en donde se utilizó como control positivo la incubación con TNF- α (**Fig. 10 TNF- α**).

En HPCVE controles se puede observar una baja expresión de la molécula ICAM-1 (**Fig. 10 Control**), mientras que en las vellosidades sólo incubadas en presencia del parásito (**Fig. 10 *T. cruzi***) o con TNF- α (**Fig. 10 TNF- α**) se observa un aumento evidente de ICAM-1.

Tanto las muestras incubadas sólo con Bz, Simv o ambas drogas en combinación, en ausencia del parásito (**Fig. 10 (Bz), (Simv), (Bz+Simv)**) así como las incubadas con el parásito y las diferentes drogas (**Figs. 10 (Bz+*T.cruzi*), (Simv+*T.cruzi*), (Bz+Simv+*T.cruzi*)**) muestran una expresión de ICAM-1 similar a las muestras controles (**Fig. 10 Control**).

Bz sólo y en combinación con Simv disminuyen la carga parasitaria en HPCVE infectadas *ex vivo* con *T. cruzi*.

HPCVE fueron incubadas durante 24 horas en presencia de 10^5 (**Fig. 11 A**) y 10^6 (**Fig. 11 B**) tripomastigotes de la cepa Y; así como en presencia de Bz 20 μ M, Simv 10 μ M o la combinación de ambas (**columnas de izquierda a derecha Fig. 11 A y B**).

La infectividad en HPCVE fue determinada mediante PCR en tiempo real para evaluar si Simv sola o su combinación con Bz es capaz de disminuir la carga parasitaria de las vellosidades coriónicas infectadas con *T. cruzi*.

Los datos graficados corresponden a una comparación entre el DNA del parásito de los controles infectados (**primera columna de izquierda a derecha de las Fig. 11 A y B**) y el DNA del parásito del resto de las columnas con tratamiento.

El tratamiento con Simv sola (**Figs. 11 A y B (*T.cruzi* + Simv +)**) no es capaz de disminuir la cantidad de DNA del parásito en HPCVE en relación a sus controles infectados (**Figs. 11 A y B (*T.cruzi* +)**). Por el contrario, el tratamiento sólo con Bz (**Figs. 11 A y B (*T.cruzi* + Bz +)**) disminuye significativamente ($p \leq 0,01$) la cantidad de DNA del parásito en HPCVE, respecto a los controles infectados (**Figs. 11 A y B (*T.cruzi* +)**).

Las vellosidades coriónicas infectadas con 10^5 tripomastigotes y tratadas con Simv en combinación con Bz (**Fig. 11 A (*T.cruzi* + Bz + Simv +)**) muestran una disminución significativa ($p \leq 0,01$) de la carga parasitaria en relación al control infectado sin tratamiento (**Fig. 11 A (*T.cruzi* +)**), pero no un mayor efecto que el tratamiento con Bz sólo (**Fig. 11 A y B (*T.cruzi* + Bz +)**). Sin embargo, las vellosidades coriónicas infectadas con 10^6 tripomastigotes incubadas con el mismo tratamiento (**Fig.**

11 B (*T.cruzi* + Bz + Simv +)) no muestran disminución significativa de la cantidad de DNA del parásito respecto a su control infectado (**Fig. 11 B (*T.cruzi* +)**) aunque si se observa una tendencia a una menor carga parasitaria.

DISCUSIÓN

En esta memoria de título se comprueba una vez más que el uso del modelo de infección *ex vivo* de HPCVE es una excelente herramienta de trabajo para estudiar mecanismos de infección parasitaria, puesto que ofrece condiciones experimentales más similares a lo que sucede *in vivo* y además es un tejido humano.⁽⁴⁸⁻⁵⁰⁾ Adicionalmente es un modelo útil para el estudio del efecto de diversas drogas así como del estudio de la función endotelial.^(41, 44)

En la actualidad, sólo dos drogas (Nx y Bz) son recomendadas en el tratamiento de la enfermedad de Chagas. No obstante, estudios de Rassi y *cols.*, 2012; y Rojo y *cols.*, 2014, han mostrado que el uso de Nx es tóxico *per se*, mientras que Bz presenta un perfil de mayor seguridad y eficacia, por lo que se recomienda como tratamiento de primera línea.^(3, 44)

Los resultados obtenidos en este estudio confirman que el uso de Bz previene el daño tisular generado en el trofoblasto, lámina basal y en el tejido conectivo fetal así como también disminuye la carga parasitaria del *T. cruzi* en ambas condiciones analizadas. Sin embargo, un estudio de Rojo y *cols.*, 2014, en donde utilizaron el modelo de infección *ex vivo* HPCVE, mostró que el uso de Bz en diferentes concentraciones no disminuyó significativamente la carga parasitaria de *T. cruzi*, aunque ayudó a prevenir el daño tisular provocado por el parásito. Los resultados discordantes con el estudio de Rojo y *cols.*, pueden deberse a diferentes cepas

estudiadas, diferentes concentraciones de parásitos utilizadas, u otras variables no detectadas.

En un estudio de Molina-Berrios y cols., 2013, utilizando un modelo de infección *in vivo* se evaluó el efecto de Bz sobre el tejido cardíaco de ratones infectados con *T. cruzi* y se demostró que la administración temprana y en dosis bajas de Bz permite eliminar el parásito. Este resultado concuerda con nuestro estudio en que el tratamiento con Bz disminuyó significativamente la carga parasitaria de *T. cruzi* en ambas condiciones experimentales, a pesar de utilizar modelos de infección diferentes.⁽⁶⁾

En la cardiomiopatía chagásica, el daño que se genera en el tejido del hospedero es producto tanto de la presencia del parásito como de una respuesta inflamatoria progresiva y compleja, que consiste en la producción de citoquinas proinflamatorias tales como IL-1, IL-6, IL-12, TNF- α e IFN- γ necesarias para el control del parásito ⁽²⁾, pero que de forma permanente son perjudiciales para el organismo. También es importante la interacción que ocurre entre el parásito y el endotelio del hospedero ya que en estudios anteriores como Rossi 1990; Tanowitz y cols., 1990; Rossi y Ramos 1996; Danese y cols., 2007; Marin-Neto y cols., 2007, se ha demostrado que la enfermedad de Chagas presenta alteraciones microvasculares, que contribuyen al aumento de la permeabilidad vascular, tromboxano y moléculas de adhesión.⁽⁵¹⁻⁵⁵⁾

Debido a lo expuesto anteriormente, es que se buscó asociar un fármaco del tratamiento vigente (Bz) con uno que tuviera propiedades antiinflamatorias, que permitiera mejorar la función endotelial, y en consecuencia, ayudara a prevenir el daño en los tejidos que produce la presencia de *T. cruzi*, como es el caso de Simvastatina.

Para evaluar la existencia de alteraciones endoteliales microvasculares se evaluó la expresión de la molécula de adhesión ICAM-1, debido a que un estudio anterior realizado por Dyea y cols., 2001, determinó que ICAM-1 se expresa fuertemente en el endotelio de la placenta humana, que es el modelo utilizado en este estudio, mientras que otras moléculas como VCAM-1 y E-Selectina no fueron detectadas en placenta de término.⁽⁵⁶⁾

El tratamiento con Simv sola y en combinación con Bz mostró ser útil tanto en la prevención del daño tisular como en el daño endotelial microvascular que se produce por la presencia de *T. cruzi* en HPCVE, contribuyendo a disminuir la molécula de adhesión ICAM-1 hasta niveles de expresión normales.

Sin embargo, el tratamiento con Simv sola no resultó ser efectivo para disminuir la cantidad de DNA del parásito en ninguna de las condiciones experimentadas, lo que es un resultado esperable puesto que el fármaco no posee acción tripanocida conocida, sino que cumple un rol antiinflamatorio, vasodilatador y anti-plaquetario que mejora la función endotelial. No obstante, cuando Simv es combinada con Bz, que sí posee acción tripanocida, se obtiene un tratamiento más efectivo, en donde no sólo se previene el daño tisular y endotelial, sino que también se disminuye la carga parasitaria de *T. cruzi* en la infección con 10^5 tripomastigotes que se asemeja a la condición de Chagas crónica, según un estudio realizado por Fretes y Kemmerling, 2012, lo cual propone que el tratamiento es más efectivo en una condición crónica que en una condición aguda, ya que al probar con 10^6 tripomastigotes no se obtuvieron los mismos resultados.⁽⁴¹⁾

Un estudio de Molina-Berríos *y cols.*, 2013 también demostró que el tratamiento con Bz permite reducir la activación endotelial producida por *T. cruzi*, disminuyendo los niveles de tromboxano y moléculas de adhesión, estudio que concuerda con nuestros resultados en donde el uso de Bz disminuyó la expresión ICAM-1 en HPCVE infectadas con *T. cruzi*.⁽⁶⁾

Por tanto, Simv y Bz tienen un mecanismo complejo de acción que les permite inhibir el eje IKK- β /I- κ B/NF- κ B que está asociado a inflamación y que es común en la activación de las moléculas de adhesión, lo que les permite en conjunto disminuir potencialmente el daño vascular que se produce en la infección por *T. cruzi*.^(34, 57)

Nuestro estudio demuestra que Simvastatina es eficaz para modular la activación del endotelio y por ende podría ser considerado como un potencial adyuvante en el tratamiento convencional de la enfermedad de Chagas que permitiera superar las dificultades que presenta el tratamiento vigente.

CONCLUSIONES

La infección *ex vivo* de explantes de vellosidades coriónicas humanas es una excelente herramienta para estudiar mecanismos de infección parasitaria y el efecto terapéutico de posibles drogas antichagásicas.

Simvastatina sola y en combinación con Benznidazol previenen el daño tisular y la disfunción endotelial inducido por *Trypanosoma cruzi* en HPCVE.

Sin embargo, Simvastatina sola no disminuye la carga parasitaria ni potencia el efecto tripanocida de Benznidazol.

FIGURAS

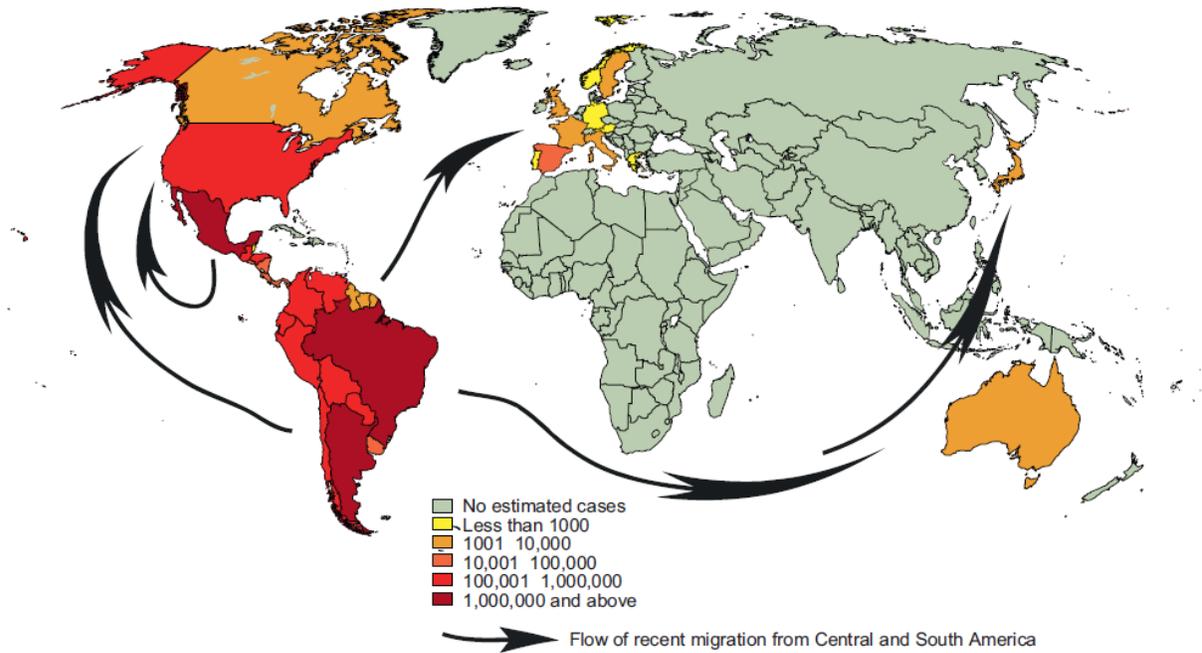


Figura 1: Distribución Global de la enfermedad de Chagas y flujo de migraciones humanas.

Fuente: Patterson J, Guh F. Geographical Distribution of Chagas Disease. American Trypanosomiasis (Chagas Disease) One Hundred Years of Research. 1st ed. Burlington (VA): Elsevier Inc; 2010. p. 83-114.

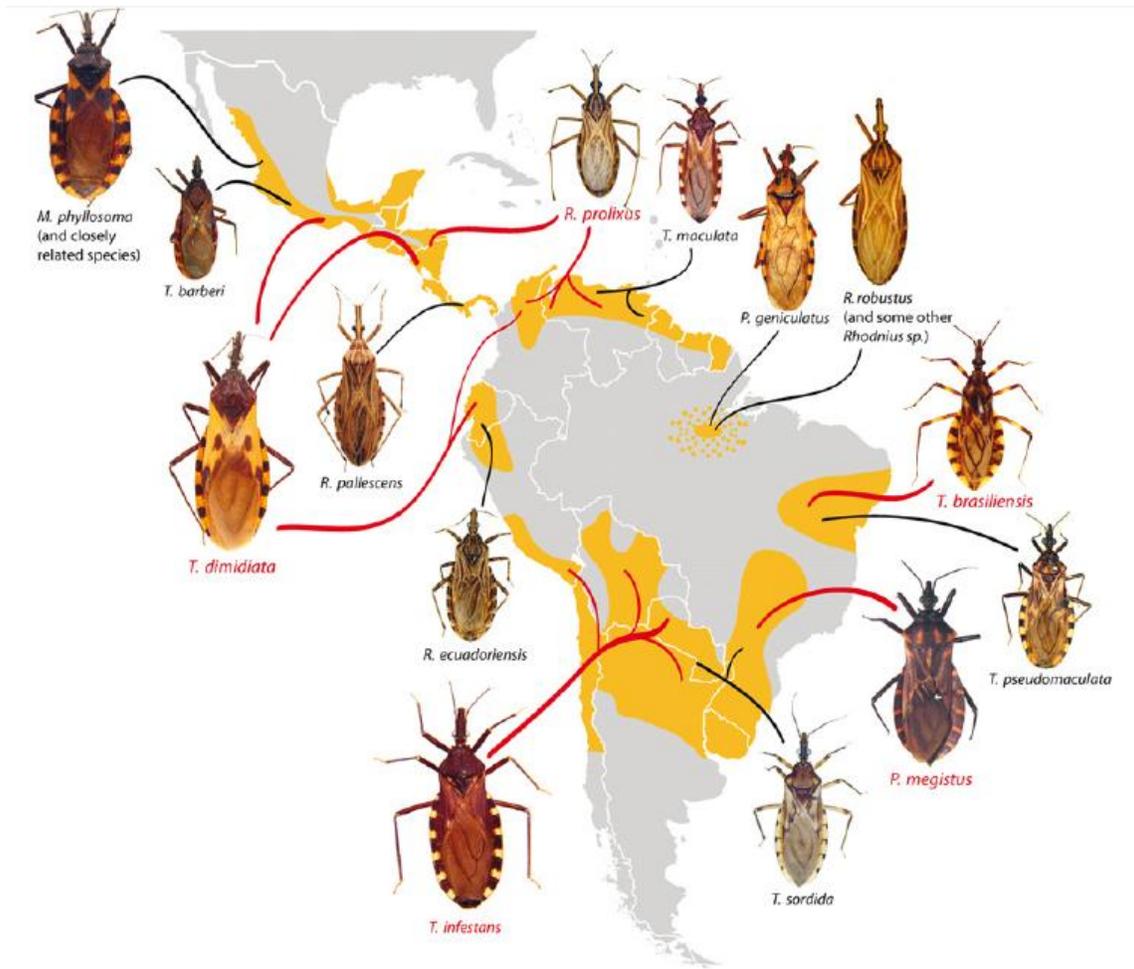


Figura 2: Distribución de vectores triatominos en América Latina

Mapa de regiones endémicas de la enfermedad de Chagas en América Central y América del Sur en el cual se indican las 14 especies de vectores más relevantes epidemiológicamente. Las cinco especies de vectores más importantes son *T. infestans*, *R. prolixus*, *T. dimidiata*, *P. megistus* y *T. brasiliensis*.

Fuente: Patterson J, Guh F. Geographical Distribution of Chagas Disease. American Trypanosomiasis (Chagas Disease) One Hundred Years of Research. 1st ed. Burlington (VA): Elsevier Inc; 2010. p. 83-114.

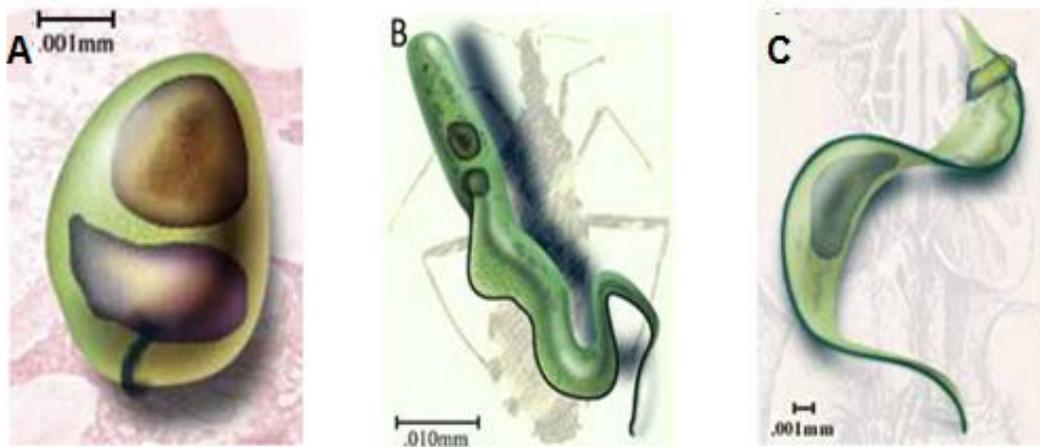


Figura 3: Formas celulares de *Trypanosoma cruzi*.

El parásito presenta tres formas celulares: (A) amastigote, forma replicativa intracelular en los mamíferos (B) epimastigote, forma replicativa en el tubo digestivo del agente vector y (C) tripomastigote, forma infectante.

Fuente: Universidad de Texas Arlington,

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

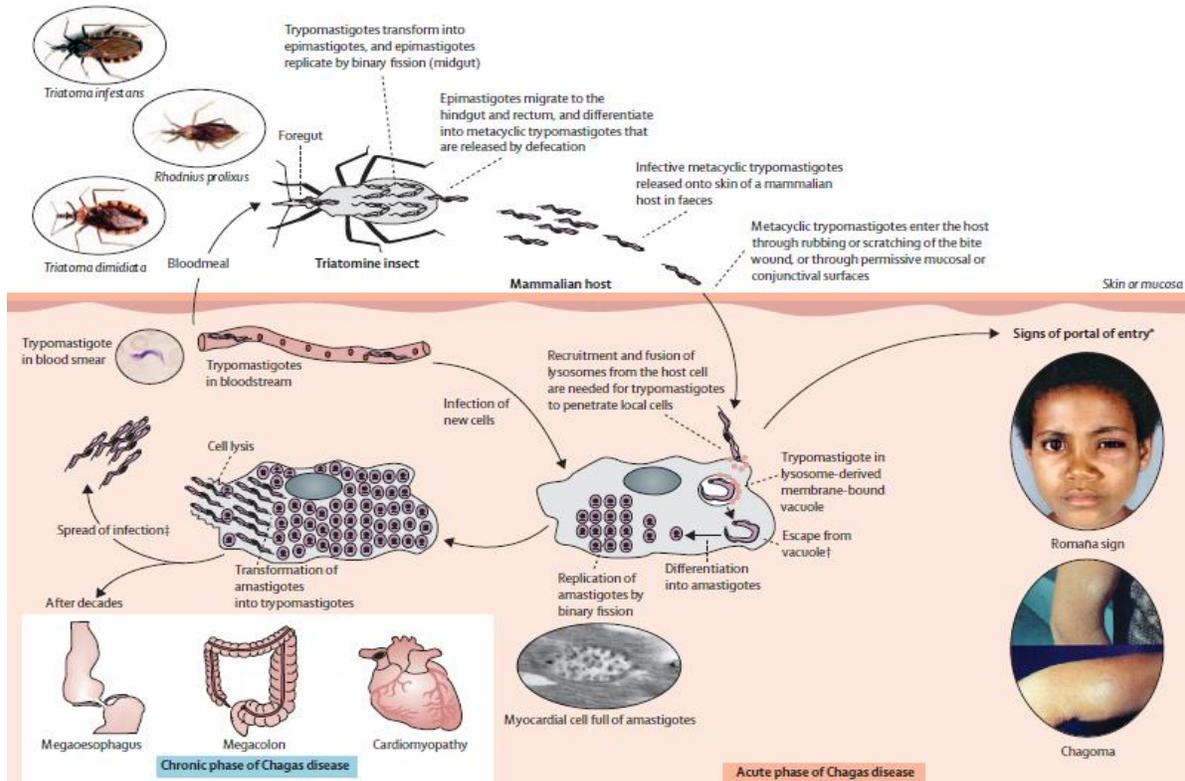


Figura 4: Transmisión vectorial y ciclo de vida de *Trypanosoma cruzi*.

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 el 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 hacia los órganos blancos, quedando expuestos para que nuevamente sean ingeridos por un triatmino, cerrando así el ciclo biológico.

Fuente: Rassi A Jr, Rassi A, Marin-Neto JA. Chagas disease. The Lancet. 2010 (375): 1348 - 402

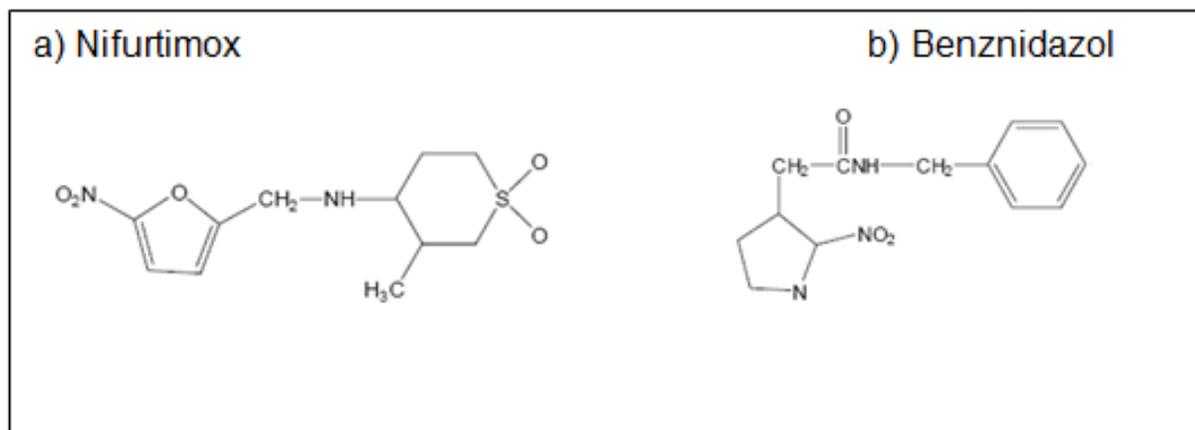


Figura 5: Drogas utilizadas en el tratamiento de la enfermedad de Chagas.

Las dos drogas utilizadas para el tratamiento de la enfermedad de Chagas son los compuestos nitro-heterocíclicos Nifurtimox [3-metil-4(nitrofurfurilideneamino) tetrahidro-4H-1,4-tiozina-1,1-dióxido] (A) y Benznidazol [N-benzil-2-nitroimidazol acetamida] (B).

Fuente: Antimicrobial Agents and Chemotherapy. American Society for Microbiology. 2005. VOL. 49.

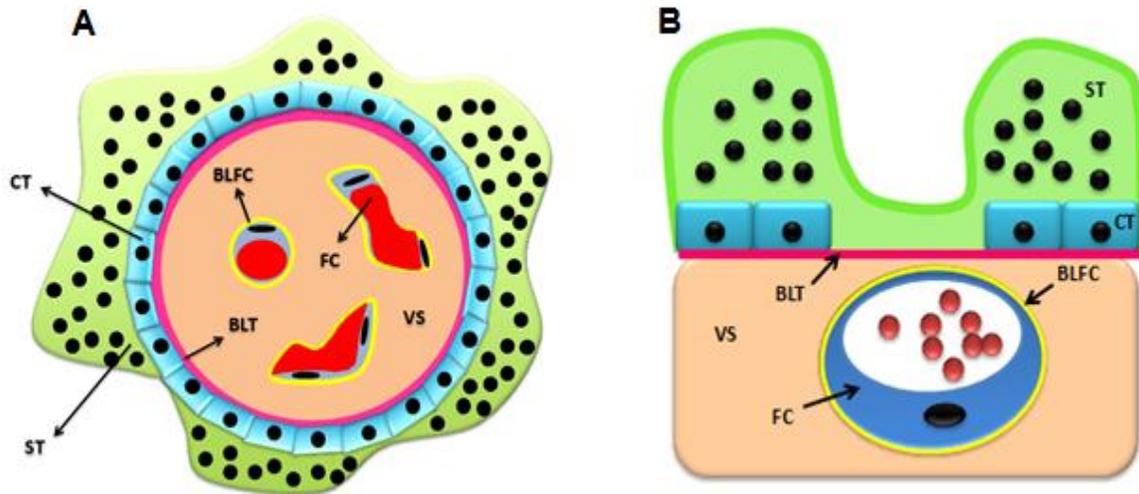


Figura 6: Barrera placentaria.

La barrera placentaria se encuentra a nivel de las vellosidades coriónicas libres, está compuesta de sinciotrofoblasto (ST), citotrofoblasto (CT), tejido conectivo fetal del estroma veloso (VS), capilares fetales (FC), y lámina basal entre el estroma veloso y el trofoblasto (BLT) y alrededor del endotelio fetal (BLFC).

Fuente: Kemmerling U. *et al.*, Infection and invasion mechanism of *Trypanosoma cruzi* in the congenital transmission of Chagas' disease: A proposal. Biol Res. 2010; 43(3):307 – 16

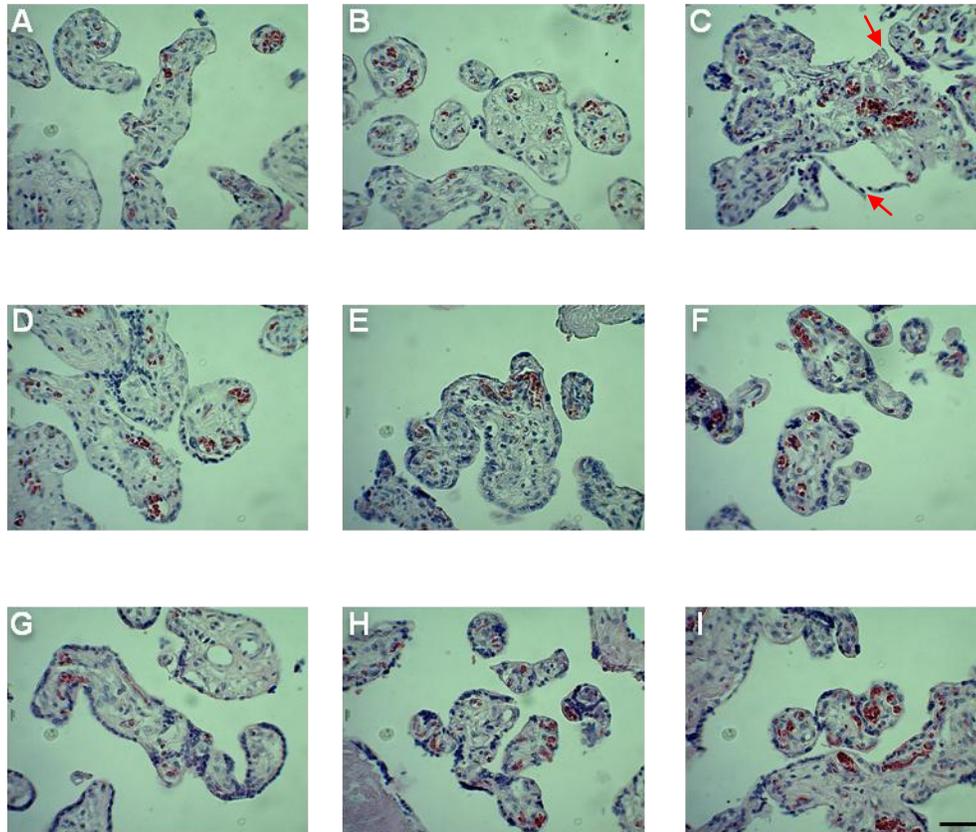


Figura 7: Benznidazol y Simvastatina previenen la destrucción y el desprendimiento del sinciciotrofoblasto en vellosidades coriónicas infectadas *ex vivo* con *Trypanosoma cruzi*.

HPCVE incubadas sólo en presencia del parásito (**Fig. 7 C**) muestran desprendimiento y destrucción del sinciciotrofoblasto (**Flechas rojas Fig. 7 C**) respecto al control (**Fig. 7 A**). Muestras incubadas con Bz (**Fig. 7 D**), Simv (**Fig. 7 E**) o ambas drogas (**Fig. 7 F**) muestran un aspecto similar al control. HPCVE incubadas con parásitos y Bz (**Fig. 7 G**), parásitos y Simv (**Fig. 7 H**) o parásitos con ambas drogas (**Fig. 7 I**) conservan la estructura del sinciciotrofoblasto y no se observa destrucción o desprendimiento como en las vellosidades incubadas sólo con parásitos (**Fig. 7 C**). Las HPCVE fueron procesadas mediante técnicas histológicas convencionales y teñidas con hematoxilina eosina. Barra de aumento: 50 μ m.

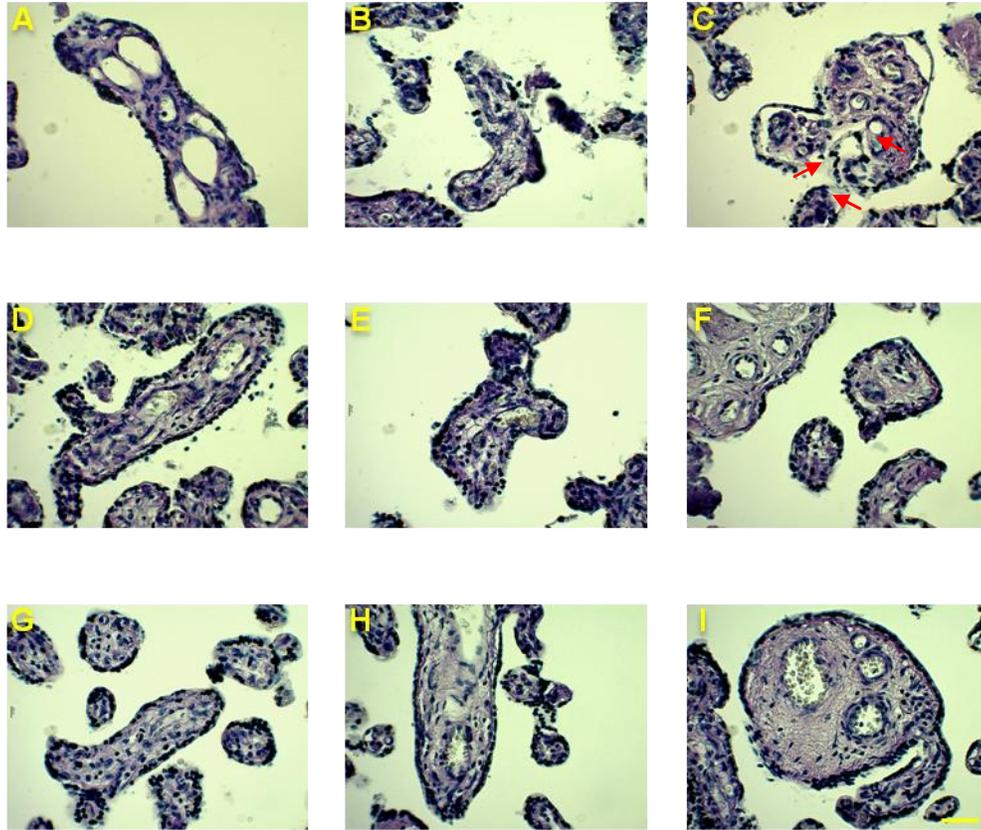


Figura 8: Benznidazol y Simvastatina previenen la desorganización de la lámina basal en las vellosidades coriónicas infectadas *ex vivo* con *Trypanosoma cruzi*.

HPCVE incubadas sólo en presencia del parásito muestran una disminución de la tinción PAS (**Flechas rojas Fig. 8 C**) en comparación al control (**Fig. 8 A**). HPCVE incubadas sólo en presencia de Bz (**Fig. 8 D**), Simv (**Fig. 8 E**) o ambas drogas (**Fig. 8 F**) exhiben un patrón de tinción similar al del control. Las muestras incubadas en presencia del parásito con Bz (**Fig. 8 G**), parásito con Simv (**Fig. 9 H**) o parásitos con ambas drogas (**Fig. 8 I**) exhiben un patrón de tinción similar al revelado por las vellosidades control (**Fig. 8 C**). Las HPCVE fueron procesadas mediante técnicas histológicas convencionales y teñidas con PAS. Barra de aumento: 50 μ m.

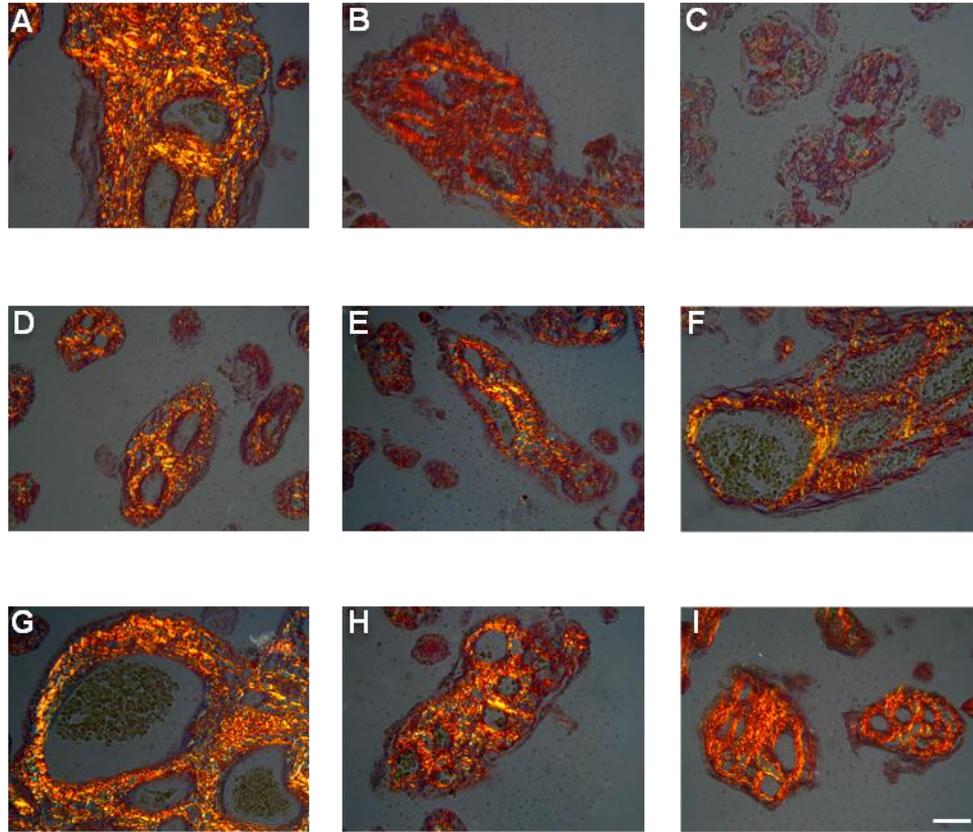


Figura 9: Benznidazol y Simvastatina previenen la desorganización del colágeno tipo I en las vellosidades coriónicas infectadas *ex vivo* con *Trypanosoma cruzi*.

HPCVE incubadas sólo en presencia del parásito muestran una evidente pérdida de la birrefringencia (**Fig. 9 C**) respecto al control (**Fig. 9 A**). Muestras incubadas en presencia de Bz (**Fig. 9 D**), Simv (**Fig. 9 E**) o ambas drogas (**Fig. 9 F**) muestran una birrefringencia similar a la observada en el control (**Fig. 9 A**). Las HPCVE expuestas a parásitos con Bz (**Fig. 9 G**), parásitos con Simv (**Fig. 9 H**) o parásitos con ambas drogas (**Fig. 9 I**) muestran una birrefringencia en las fibras de colágeno similar las muestras control (**Fig. 9 C**). Las HPCVE fueron procesadas mediante técnicas histológicas convencionales y teñidas con Picro Rojo sirio. Barra de aumento: 50 μm .

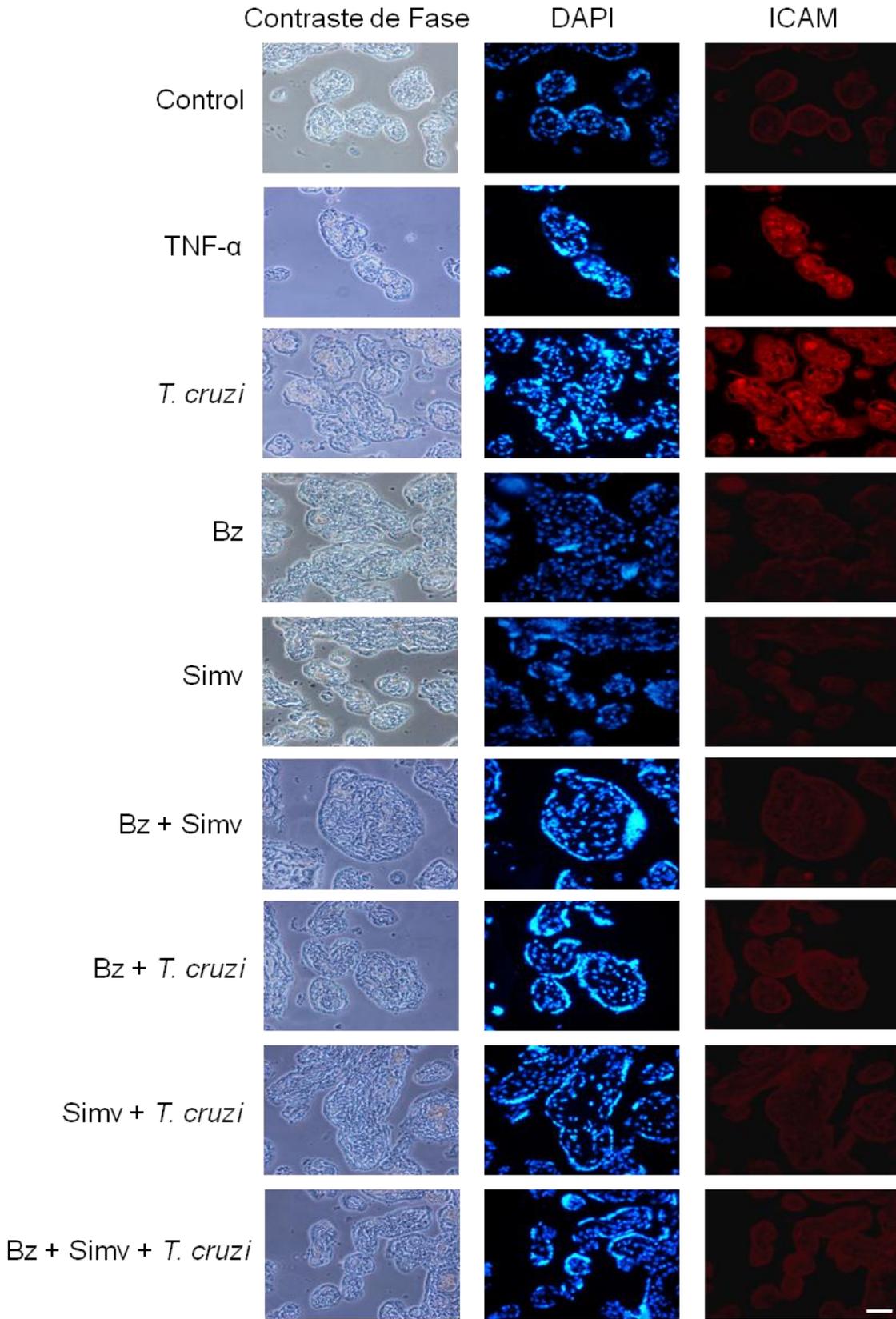


Figura 10: Benznidazol y Simvastatina disminuyen la expresión de la molécula de adhesión ICAM-1 en las vellosidades coriónicas humanas infectadas *ex vivo* con *Trypanosoma cruzi*.

HPCVE incubadas sólo en presencia del parásito (**Fig. 10 *T. cruzi***) o con TNF- α (**Fig. 10 TNF- α**) exhiben aumento evidente de ICAM-1 respecto al control (**Fig. 10 Control**). Las muestras incubadas en presencia de Bz (**Fig. 10 Bz**), Simv (**Fig. 10 Simv**) o ambas drogas (**Fig. 10 Bz+Simv**), al igual que las muestras incubadas con parásitos y Bz (**Fig. 10 Bz+*T.cruzi***), parásitos y Simv (**Fig. 10 Simv+*T.cruzi***) o parásitos con ambas drogas (**Fig. 10 Bz+Simv+*T.cruzi***) muestran una expresión de ICAM-1 similar a la observada en las muestras controles (**Fig. 10 Control**). Las HPCVE fueron procesadas mediante técnicas de Inmunofluorescencia de rutina. Barra de aumento: 50 μ m.

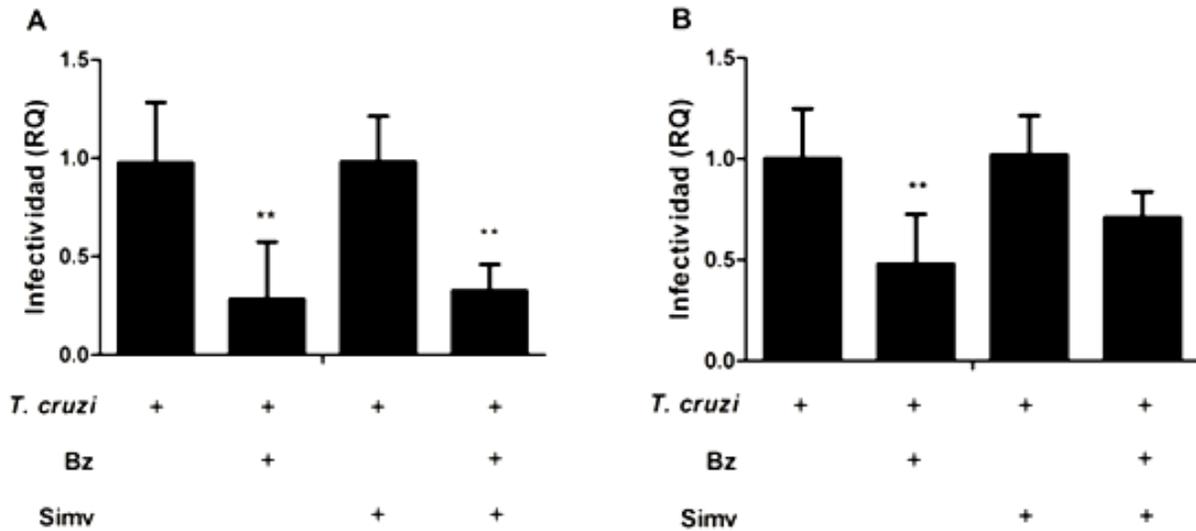


Figura 11: Benznidazol sólo y en combinación con Simvastatina disminuyen la infectividad en las vellosidades coriónicas humanas infectadas *ex vivo* con *Trypanosoma cruzi*.

HPCVE fueron incubadas en presencia de 10^5 y 10^6 tripomastigotes de la cepa Y (columna izquierda de los gráficos A y B respectivamente), así como en presencia de Bz 20 μ M, Simv 10 μ M o ambas (columnas siguientes de izquierda a derecha en gráficos A y B).

Simv sola no es capaz de disminuir la cantidad de DNA del parásito en HPCVE infectadas. Por el contrario, Bz disminuye significativamente ($p \leq 0,01$) la cantidad de DNA del parásito en HPCVE infectadas.

HPCVE infectadas con 10^5 tripomastigotes y tratadas con Simv en combinación con Bz muestran una disminución significativa ($p \leq 0,01$) de la carga parasitaria. Sin embargo, HPCVE infectadas con 10^6 tripomastigotes con el mismo tratamiento no muestran disminución significativa de la cantidad de DNA del parásito.

Los datos son una comparación entre el DNA del parásito de los controles infectados y los que recibieron algún tratamiento. La cuantificación del DNA del parásito se realizó mediante PCR en tiempo real, mediante el método $\Delta\Delta$ Ct. Los datos representan el promedio \pm la DS de 3 experimentos independientes. La significancia de las diferencias se evaluó mediante la prueba ANDEVA seguido de Dunnett post-test, donde se consideró estadísticamente significativo un $p \leq 0.05$.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Rassi A Jr, Rassi A, Marin-Neto JA. Chagas disease. *The Lancet*. 2010(375):1348 - 402.
2. Maya JD, Orellana M, Ferreira J, Kemmerling U, López-Muñoz R, Morello A. Chagas disease: Present status of pathogenic mechanisms and chemotherapy. *Biol Res*. 2010(43):323 - 31.
3. Rassi A Jr, Rassi A, Marcondes de Rezende J. American Trypanosomiasis (Chagas Disease). *Infect Dis Clin North Am*. 2012(26):275 - 91.
4. Duaso J, Rojo G, Cabrera GG, Galanti N, Bosco C, Maya JD, Morello A, Kemmerling U. *Trypanosoma cruzi* induces tissue disorganization and destruction of chorionic villi *in an ex vivo* infection model of human placenta. *Placenta*. 2010; 31(8): 705 -11.
5. Prata A. Clinical and epidemiological aspects of Chagas disease. *Lancet Infect Dis*. 2001;1(2):92 - 100.
6. Molina-Berríos A, Campos-Estrada C, Lapier Quezada M, Duaso J, Kemmerling U y cols. Benznidazole prevents endothelial damage in an experimental model of Chagas disease. *Acta Trop*. 2013;127(1):6 - 13.
7. Chagas C. Nova tripanozomiase humana: Estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi* n. gen., n. sp., agente etiologico de nova entidade morbida do homem. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 1909;1:159 – 218.
8. Andrade LO, Andrews NW. The *Trypanosoma cruzi*-host-cell interplay: location, invasion, retention. *Nat Rev Microbiol*. 2005;3(10):819 – 23.

9. Gorla D, Noireau F. Geographic distribution of *Triatominae* vectors in America. American Trypanosomiasis (Chagas Disease) One Hundred Years of Research. 1st ed. Burlington (VA): Elsevier Inc; 2010. p. 209 – 31.
10. WHO Expert Committee. Control of Chagas disease. Second report of the WHO Expert Committee. World Health Organ Tech Rep Series. 2002;905:1 – 109.
11. Romero-Cabello R. *Trypanosoma*: Morfología, Microbiología y Parasitología Humana. Bases etiológicas de las enfermedades infecciosas y parasitarias. 3ra ed. México: Editorial Médica Panamericana; 2007. p. 1429 – 30.
12. Bern C, Montgomery S, Katz L, Caglioti S, Stramer SL. Chagas disease and the US blood supply. Curr Opin Infect Dis. 2008;21(5):476 – 82.
13. Pereira KS, Schmidt FL, Guaraldo AM, Franco RM, Dias VL, Passos L. Chagas' Disease as a Foodborne Illness. J Food Prot 2009;72(2):441 – 46.
14. Kemmerling U, Bosco C, Galanti N. Infection and invasion mechanism of *Trypanosoma cruzi* in the congenital transmission of Chagas' disease: A proposal. Biol Res. 2010;43(3):307 – 16.
15. Russomando G, de Tomassone MM, de Guillen I, y cols. Treatment of congenital Chagas' disease diagnosed and followed-up by the polymerase chain reaction. Am J Trop Med Hyg .1998;59(3):487 – 91.
16. Torrico F, Alonso-Vega C, Suarez E, y cols. Maternal *Trypanosoma cruzi* infection, pregnancy outcome, morbidity, and mortality of congenitally infected and non-infected newborns in Bolivia. Am J Trop Med Hyg. 2004;70:201 – 09.
17. Apt W, Zulantay I, Arnello M, Oddó D, González S, Rodríguez J, y cols. Congenital infection by *Trypanosoma cruzi* in an endemic area of Chile: a multidisciplinary study. Trans R Soc Trop Med Hyg 2013;107(2):98 – 104.

18. Jercic MI, Mercado R, Villarroel R. Congenital *Trypanosoma cruzi* infection in neonates and infants from two regions of Chile where Chagas' disease is endemic. *J Clin Microbiol.* 2010;48(10):3824 – 26.
19. Andrade ZA. Immunopathology of Chagas disease. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1999; 94(Suppl 1):71 – 80.
20. Abrahamsohn IA, Coffman RL. *Trypanosoma cruzi*: IL-10, TNF, IFN-gamma, and IL-12 regulate innate and acquired immunity to infection. *Exp Parasitol.* 1996;84 (2): 231 – 44.
21. Silva JS, Twardzik DR, Reed SG. Regulation of *Trypanosoma cruzi* infections *in vitro* and *in vivo* by transforming growth factor beta (TGF-beta). *J Exp Med* 1991;174(3):539 – 45.
22. Reed SG, Brownell CE, Russo DM, Silva JS, Grabstein KH, Morrissey PJ. IL-10 mediates susceptibility to *Trypanosoma cruzi* infection. *J Immunol* 1994;153(7):3135 – 40.
23. Tarlenton RL. *Trypanosoma cruzi* and Chagas disease: cause and effect. In: Tyler KM, Miles MA, editor. *World class parasites: American trypanosomiasis*. Boston, MA: Kluwer Academic Publishers; 2003. p. 107 – 16.
24. Pinto AY, Ferreira A Jr, Valente Vda C, Harada GS, Valente SA. Urban outbreak of acute Chagas disease in Amazon region of Brazil: four-year follow-up after treatment with benznidazole. *Rev Panam Salud Pública.* 2009;25(1):77 – 83.
25. Soares MB, Pontes-De-Carvalho L, Ribeiro-Dos-Santos R. The pathogenesis of Chagas' disease: when autoimmune and parasite-specific immune responses meet. *An Acad Bras Cienc.* 2001;73:547 – 59.

26. Coura JR. Chagas disease: what is known and what is needed a background article. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2007;102(Suppl 1):113 – 22.
27. Rassi A Jr, Rassi A, Little WC. Chagas' heart disease. Clin Cardiol 2000;23: 883–9.
28. Rodrigues Coura J, de Castro SL. A critical review on Chagas disease chemotherapy. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2002;97:3 – 24.
29. Castro JA, De Mecca MM, Bartel LC. Toxic side effects of drugs used to treat Chagas' disease (American trypanosomiasis). Hum Exp Toxicol. 2006;25(8):471 – 79.
30. Maya JD, Cassels BK, Iturriaga-Vásquez P, Ferreira J, Faúndez M, Galanti N, Ferreira A, Morello A. Mode of action of natural and synthetic drugs against *Trypanosoma cruzi* and their interaction with the mammalian host Comparative Biochemistry and Physiology. Part A. 2006;146:601–20.
31. Birnbaum Y, Ye Y. Pleiotropic Effects of Statins: The Role of Eicosanoid Production. Curr Atheroscler Rep. 2012:1 – 5.
32. Lida K, Goland S, Akima T, y cols. Effect of a single 20 mg tablet of Atorvastatin on brachial artery blood flow in normolipidemic male smokers versus nonsmokers. Am J Cardiol 2007;100:881 – 4.
33. Birnbaum Y, Ye Y, Lin Y, y cols. Aspirin augments 15-epi-lipoxin A4 production by lipopolysaccharide, but blocks the pioglitazone and atorvastatin induction of 15-epi-lipoxin A4 in the rat heart. Prostag Other Lipid Mediat 2007;83:89 – 98.
34. Cheng X, Liao YH, Zhang J, Li B, y cols. Effects of Atorvastatin on Th polarization in patients with acute myocardial infarction. Eur J Heart Fail 7. 2005:1099 – 104.

35. Robinson JG. Models for describing relations among the various statin drugs, low-density lipoprotein cholesterol lowering, pleiotropic effects and cardiovascular risk. *Am J Cardiol* 2008;101:1009 – 15.
36. Moore K, Perseaud TVN. *The Developing Human, Clinically Oriented Embriology* 8th ed. Pennsylvania: Elsevier 2008. p. 111.
37. Syme MR, Paxton JW, Keelan JA. Drug transfer and metabolism by the human placenta. *Clin Pharmacokinet.* 2004;43(8):487 – 514.
38. Moore KL, Perseaud TVN. *The Developing Human, Clinically Oriented Embryology.* 7th ed. Pennsylvania: Elsevier; 2004. p. 215.
39. Cross JC. Placental function in development and disease. *Reprod Fertil Dev.* 2006;18(1-2):71-6.
40. Castellucci M, Kaufmann P. *Basic Structure of the Villous Trees. Patology of the Human Placenta* 5th ed. New York: Springer, Inc 2006. p. 50- 99.
41. Fretes R, Kemmerling U. Mechanism of *Trypanosoma cruzi* Placenta Invasion and Infection: The Use of Human Chorionic Villi Explants. *J Trop Med.* 2012;2012:7.
42. Duaso J, Yanez E, Castillo C, Galanti N, Cabrera G, Corral G, y cols. Reorganization of Extracellular Matrix in Placentas from Women with Asymptomatic Chagas Disease: Mechanism of Parasite Invasion or Local Placental Defense? *J Trop Med.* 2012:8.
43. Castillo C, López-Muñoz R, Duaso J, Galanti N, Jaña F, Ferreira J, y cols. Role of matrix metalloproteinases 2 and 9 in *ex vivo Trypanosoma cruzi* infection of human placental chorionic villi. *Placenta.* 2012;33(12):991 – 7.

44. Rojo G, Castillo C, Duaso J, Liempi A, Droguett D, Galanti N, Maya JD y cols. Toxic and therapeutic effects of Nifurtimox and Benznidazol on *Trypanosoma cruzi* *ex vivo* infection of human placental chorionic villi explants. *Acta Trop.* 2014;132:112-18.
45. Duaso J, Rojo G, Cabrera G, Maya JD, Galanti N, Kemmerling U. *Trypanosoma cruzi* induces apoptosis in *ex vivo* infected human chorionic villi. *Placenta* 2011;32:356 – 61.
46. Castillo C, Villarroel A, Duaso J, Galanti N, Cabrera G, Maya JD, Kemmerling U. Phospholipase C gamma and ERK1/2 mitogen activated kinase pathways are differentially modulated by *Trypanosoma cruzi* during tissue invasion in human placenta. *Exp Parasitol.* 2013;133(1):12 – 7.
47. Cummings KL, Tarleton RL. Rapid quantitation of *Trypanosoma cruzi* in host tissue by real-time PCR. *Mol Biochem Parasitol* 2003;129(1):53 – 9.
48. Sartori MJ, Pons P, Mezzano L, Lin S, De Fabro SP. *Trypanosoma cruzi* infection induces microfilament depletion in human placenta syncytiotrophoblast *Placenta.* 2003;24(7):767 - 71.
49. Lin S, Sartori MJ, Mezzano L, De Fabro SP. Epidermal growth factor (EGF) in the human placenta infection with *Trypanosoma cruzi* *Placenta.* 2004;25(4):283 - 6.
50. Mezzano L, Sartori MJ, Lin S, Repossi G, De Fabro SP. Placental alkaline phosphatase (PLAP) study in diabetic human placental villi infected with *Trypanosoma cruzi.* *Placenta* 2005;26(1):85 - 92.
51. Rossi MA. Microvascular changes as a cause of chronic cardiomyopathy in Chagas' disease. *Am Heart J.* 1990;120:233–36.

52. Tanowitz HB, Burns ER, Sinha AK, Kahn NN, Morris SA *y cols.* Enhanced platelet adherence and aggregation in Chagas disease: a potential pathogenic mechanism for cardiomyopathy. *Am J Trop Med Hyg* 1990;43:274-81.
53. Rossi MA, Ramos SG. Coronary microvascular abnormalities in Chagas disease. *Am Heart J.* 1996;132:207-10.
54. Danese S, Dejana E, Fiocchi C. Immune regulation by microvascular endothelial cells: directing innate and adaptive immunity, coagulation, and inflammation. *J Immunol.* 2007;178:6017-22.
55. Marín-Neto JA, Cunha-Neto E, Maciel BC, Simoes M. Pathogenesis of chronic Chagas heart disease. *Circulation.* 2007;115:1109-23.
56. Dyea JF, Jablenskab R, Donnellyb JL, Lawrenceb L, Leachc L, Clarkb P, Firthb JA. Phenotype of the Endothelium in the Human Term Placenta. *Placenta.* 2001;22:32 - 43.
57. Manarin R, Pascutti MF, Ruffino JP, De Las Heras B, Bosca L, *y cols.* Benznidazole blocks NF-kappaB activation but not AP-1 through inhibition of IKK. *Mol Immunol.* 2010;47:2485–91.

ANEXOS

Anexo1



CONSENTIMIENTO INFORMADO

MECANISMOS DE ENFERMEDAD DE CHAGAS CONGÉNITA: INTERACCIÓN ENTRE *Trypanosoma cruzi* Y EL TROFOBlastO EN LA PLACENTA HUMANA

Nombre del Investigador principal: **Ulrike Kemmerling**
Institución: **Instituto de Ciencias Biomédicas, Facultad de Medicina, Universidad de Chile**
Teléfonos: **9786261, 9786018, 9786071**

La estamos invitando a participar en el proyecto de investigación "Mechanism of congenital Chagas disease: Effective infection depends on the interplay between *Trypanosoma cruzi* and the trophoblast in the human placenta" (Mecanismos de enfermedad de Chagas Congénita: Interacción entre *Trypanosoma cruzi* y el trofoblasto en la placenta humana).

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

El estudio incluirá a un número total de 80 pacientes mujeres, Departamento de Obstetricia y Ginecología, Hospital San José, Servicio de Salud Metropolitano Norte.

Procedimientos: Si Ud. acepta participar donará la placenta que se obtendrá al final de su embarazo durante el parto. La placenta será ocupada en un momento posterior en un laboratorio de ciencias biomédicas para estudiar los mecanismos de infección placentaria del parásito que causa la Enfermedad de Chagas. No se guardarán muestras para estudios posteriores y las placentas serán desechadas según el protocolo para eliminación de material biológico de la "Unidad de Prevención de Riesgos" de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile. El laboratorio cuenta con la certificación de bioseguridad requerida.

Se usarán solamente placentas de madres y recién nacidos sanos.

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

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

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



20 ABR. 2012

CEI-SSM NORTE
Comité Asesor de la Dirección
Servicio de Salud
Metropolitano Norte

23 SET. 2011

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

Sin embargo, no hay beneficios para la madre ni para el niño por la participación en el estudio.

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

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

Voluntariedad: Su participación en esta investigación es totalmente voluntaria. Adicionalmente, Usted puede rehusar participar y que puede cambiar de opinión después que ha aceptado donar la placenta, sin que eso afecte la calidad de la atención que reciban la madre y el niño.

Complicaciones: La donación de la placenta no interfiere con la atención habitual de un parto normal o de un parto por cesárea.

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

Investigador:

- Dra Ulrike Kemmerling, 9786261
- Dr. Norbel Galanti, 9786475, 9786018
- Dr. Juan Diego Maya 9786071

Autoridad de la Institución: Director del Instituto de Ciencias Biomédicas, Facultad de Medicina, Dr. Benjamín Suárez, 9786067

Comité de Ética

- Servicio de Salud Metropolitano Norte, 5758506
- Facultad de Medicina, Universidad de Chile, 9786189

Conclusión:

Después de haber recibido y comprendido la información de este documento y de haber podido aclarar todas mis dudas, otorgo mi consentimiento para participar en el proyecto **"Mechanism of congenital Chagas disease: Effective infection depends on the interplay between *Trypanosoma cruzi* and the trophoblast in the human placenta"** (Mecanismos de enfermedad de



CEI-SSM NORTE
Organismo Asesor de la Dirección
Servicio de Salud
Metropolitano Norte
23 SET. 2011

Chagas Congénita: Interacción entre *Trypanosoma cruzi* y el trofoblasto en la placenta humana)

_____ Nombre del sujeto	_____ Firma	_____ Fecha
_____ Nombre de informante	_____ Firma	_____ Fecha
_____ Nombre del investigador	_____ Firma	_____ Fecha
_____ Nombre del Director del Hospital	_____ Firma	_____ Fecha

Este formulario de "Consentimiento informado" se firmará en triplicado para que las donantes, el investigador responsable y Comité de Ética tengan las copias correspondientes.



Anexo 2



UNIDAD DE PREVENCIÓN DE RIESGOS & BIOSEGURIDAD
FACULTAD DE MEDICINA
UNIVERSIDAD DE CHILE

Santiago, May 05th 2011.-

To:
**FONDECYT PROGRAM
PRESENT**

Dear Sirs

The Risk Prevention and Biosafety Unit of the Faculty of Medicine, University of Chile hereby certifies that it received for its study, from responsible investigator Dr. Ulrike Kemmerling head of the laboratory "Mechanism of Parasite Infection", Program of Anatomy and Developmental Biology, Institute for Biomedical Sciences (ICBM), Faculty of Medicine, University of Chile the project proposal titled as "Mechanism of congenital Chagas disease: Effective infection depends on the interplay between *T. cruzi* and the trophoblast in the human placenta". The project satisfies all basic Biosafety requirements to be carried out. It also meets every demand established on manuals: CONICYT "Biosafety 1st edition 1994" and "Manual of Safety Standards, 2nd edition 2008", "Center for Control and Prevention of Diseases, CDC, 4th edition, "Safety in Laboratories Manual", World Health Organization WHO, Geneva 2005, reasons why this unit approves its eventual execution.

Responsible investigator Dr. Ulrike Kemmerling is committed to meet all biosafety standards established in the formerly cited manuals and those established in the Internal Regulations for the functioning of the Laboratories, Risk Prevention and Biosafety Unit, Faculty of Medicine, University of Chile. Concomitantly she is responsible for the proper complying of established biosafety regulations, of all participants of the aforementioned project

Receiving acknowledgement: Dr. Ulrike Kemmerling

Professor **Mónica Acuña Patzke**
Risk Prevention and Biosafety Unit Director

* Attached Annex IX.1 Fondecyt Project
c.c.

- Dean, Doctor, Cecilia Sepúlveda C.
- Vice-Dean, Dr. Ennio Vivaldi
- Biomedical Sciences Institute Director ICBM, Dr. Benjamin Suárez
- Responsible Investigator, Dra. Ulrike Kemmerling
- Archives

Av. Independencia 1027, Teléfono (56)-2 9786564, e-mail: biocps@fmed.uchile.cl www.fmed.uchile.cl

Anexo 3



UNIVERSIDAD DE CHILE-FACULTAD DE MEDICINA
COMITÉ DE ÉTICA DE INVESTIGACIÓN EN SERES HUMANOS



2/2

1 JUL 2011

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:

- a) Carácter de la población estudiada: Es una investigación básica que utiliza un modelo de infección de vellosidad canónica de placenta humano.
- b) Utilidad del Proyecto: Es un proyecto muy interesante que forma parte de una línea de investigación en Chagas congénita.
- c) Riesgos y Beneficios: no hay
- d) Protección de los participantes: Cuenta con un buen Consentimiento Informado para obtención de placenta.
- e) Notificación oportuna de reacciones adversas: no aplica.
- f) La investigadora responsable se ha comprometido a entregar los resultados del estudio a este Comité al finalizar el proyecto.

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.

Este comité también analizó y aprobó el correspondiente documento de Consentimiento Informado en su versión corregida del 08 de julio de 2011, 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.

Santiago, 11 de julio de 2011.



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

MGH/mva.
c.c.: Archivo Proy. 041-2011

Teléfono: 9786923 Fax: 9786189 Email: ceiha@med.uchile.cl