



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS
ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS

**Rol de miR-515-5p en la diferenciación celular del trofoblasto inducida por
Trypanosoma cruzi en un modelo de infección *ex vivo***

Fernando Antonio Salomó Martínez

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

PROFESOR GUÍA: Dra. Ulrike Kemmerling Weis
Instituto de Ciencias Biomédicas, Facultad de Medicina

FONDECYT 1190341, ERANET 17/HLH0142

SANTIAGO, CHILE
2022



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS
ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS

**Rol de miR-515-5p en la diferenciación celular del trofoblasto inducida por
Trypanosoma cruzi en un modelo de infección *ex vivo***

Fernando Antonio Salomó Martínez

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

NOTA FINAL:	NOTA:	FIRMA:
PROFESOR GUÍA:	ULRIKE KEMMERLING
PROFESOR CONSEJERO:	GALIA RAMIREZ
PROFESOR CONSEJERO:	VICTOR HUGO PARRAGUEZ

INDICE GENERAL

RESUMEN	4
ABSTRACT	5
INTRODUCCIÓN	6
REVISIÓN BIBLIOGRAFICA	8
<i>Trypanosoma cruzi</i>	8
Ciclo biológico de <i>Trypanosoma cruzi</i>	8
Distribución epidemiológica.....	10
Enfermedad de Chagas.....	12
Enfermedad de Chagas congénita.....	12
La placenta.....	14
Trofoblasto y recambio epitelial como mecanismo de defensa contra <i>T. cruzi</i>	15
Regulación de la expresión de genes por miRNAs.....	16
Síntesis de miRNAs.....	17
miRNAs en placenta.....	18
HIPÓTESIS	19
OBJETIVO GENERAL	19
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	19
MATERIALES Y MÉTODOS	20
RESULTADOS	25
HPEs se transfectan efectivamente con antagomirs y mimics de miR-515-5p sin causar daño al tejido.....	25
La sobreexpresión de miR-515-5p revierte el incremento de hGCM-1 inducido por <i>T. cruzi</i>	27
DISCUSIÓN	30
CONCLUSIÓN	33
BIBLIOGRAFÍA	34
ANEXO 1	40
ANEXO 2	41

RESUMEN

El protozoo parásito zoonótico *Trypanosoma cruzi* es el agente causal de la enfermedad de Chagas. La transmisión congénita de *T. cruzi* es epidemiológicamente relevante aunque se reportan bajas tasas. Previamente hemos demostrado que el recambio epitelial del trofoblasto es parte de la respuesta antiparasitaria local de la placenta. El recambio epitelial implica la regulación de procesos celulares que incluyen a la proliferación, diferenciación y apoptosis y que además son regulados por el parásito. Por otro lado, la infección *ex vivo* de explantes placentarios humanos (HPE) con *T. cruzi* induce un perfil de miRNAs específico que incluye miRNAs placenta-específicos del *cluster* C19MC, tales como miR-515-5p. Interesantemente, este miRNA está relacionado con la regulación de la diferenciación del trofoblasto. MiR-515-5p regula la diferenciación del trofoblasto al inhibir a su blanco hGCM1 (human glial cell missing-1 factor), que a su vez induce la expresión de otros genes fundamentales para la diferenciación. Así, durante la diferenciación del trofoblasto la expresión de miR-515-5p es inhibida. Aquí hemos evaluado los niveles de miR-515-5p durante la infección *ex vivo* de HPE con *T. cruzi*, además estandarizamos la sobreexpresión e inhibición de miR-515-5p con *mimics* y *antagomirs* y evaluamos su efecto sobre su blanco hGCM1. *T. cruzi* disminuye la expresión de miR-515-5p y aumenta la de hGCM1, la sobreexpresión de miR-515-5p no es capaz de revertir el efecto sobre los niveles de miR-515-5p pero si revierte el aumento la expresión de hGCM1. Adicionalmente, la transfección con *mimics* y *antagomirs* no causa daño en los HPE. Se concluye, que la diferenciación de trofoblasto inducida por *T. cruzi* está mediada, al menos parcialmente, por la inhibición de miR-515-5p y el consecuente incremento en la expresión de su gen blanco hGCM1.

Palabras Claves: Zoonosis, *Trypanosoma cruzi*, placenta humana, transmisión congénita, miRNAs, miR-515-5p.

ABSTRACT

The zoonotic protozoan parasite *Trypanosoma cruzi* is the causative agent of Chagas disease. Congenital transmission is a significant Public Health problem in spite that this form of transmission presents low rates. Previously, we have demonstrated that the epithelial turnover is part of local placental antiparasitic mechanisms. The epithelial turnover implies regulation of cellular processes that include proliferation, differentiation, and apoptosis. On the other hand, *ex vivo* infection of human placental explants with *T. cruzi* induces a specific miRNA profile that includes the placenta-specific miR-515-5p codified in the C19MC *cluster*. Interestingly, this miRNA is related to trophoblast differentiation through inhibition of its target hGCM1 (human glial cell missing-1 factor), which in turn induces the expression of other fundamental genes for differentiation. Thus, during trophoblast differentiation, miR-515-5p expression is inhibited. Here, we evaluated miR-515-5p expression levels during *ex vivo* infection with *T. cruzi* of HPE. In addition, we standardized the overexpression and inhibition of miR-515-5p with *mimics* and *antagomirs*. Moreover, we analyzed the effect of *T. cruzi*-modulated miR-515-5p on its target hGCM1. *T. cruzi* decreases and increases, respectively, miR-515-5p and hGCM1 expression. MiR-515-5p overexpression cannot prevent the parasite-induced decrease of miR-515-5p levels but reverts the effect of increasing hGCM1 expression. In addition, transfection with mimics and antagomirs does not cause tissue damage of HPE. We conclude that the parasite-induced trophoblast differentiation is mediated at least partially by inhibiting miR-515-5p and consequent increase of its target gene hGCM1.

Key words: Zoonosis, *Trypanosoma cruzi*, placenta humana, transmisión congénita, miRNAs, miR-515-5p.

INTRODUCCIÓN

La enfermedad de Chagas (EC) o Tripanosomiasis americana es una enfermedad zoonótica causada por el protozoo parásito *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*), que afecta globalmente entre 6 y 7 millones de personas y es endémica de América Latina. Sin embargo, debido a fenómenos migratorios la EC se ha extendido a regiones no endémicas incluyendo América del Norte, Europa y Oceanía. La transmisión congénita, a pesar de sus bajas tasas, es la principal vía de contagio del parásito en áreas no endémicas y es la responsable del 22,5% de los nuevos casos por año.

Durante la transmisión congénita el parásito debe atravesar la barrera placentaria compuesta por trofoblasto y estroma vellositario que contiene los vasos fetales. La probabilidad de transmisión congénita depende del parásito, del sistema inmune materno y fetal, así como de la placenta.

Se ha propuesto al recambio epitelial del trofoblasto como un mecanismo de defensa local de la placenta humana ante la presencia de *T. cruzi*. Durante el recambio epitelial, las células basales del trofoblasto experimentan proliferación, posterior diferenciación y fusión con la capa superficial lo que se compensa mediante la formación de nodos apoptóticos que se liberan hacia la sangre materna. Todos estos procesos celulares implican un profundo cambio en la expresión génica de las células del trofoblasto. Esta expresión génica está regulada, entre otros factores, por RNA pequeños no codificantes como los microRNA (miRNA), los cuales regulan a los mRNA, de manera secuencia-específica mediante dos mecanismos: a) degradación del mRNA o b) inhibición de la traducción del mRNA.

Entre los miRNAs placentarios destaca el miR-515-5p codificado en el *cluster* placenta-específico C19MC. Este miRNA se asocia a la diferenciación celular del trofoblasto, reprimiendo a mRNAs de genes que regulan este proceso y que, además, son modulados por el parásito. Así, trabajos previos en el laboratorio muestran que *T. cruzi* disminuye la expresión de miR-515-5p en explantes placentarios humanos (HPE). Sin embargo, los efectos de la desregulación de miR-515-5p por el parásito y de sus genes blancos no han sido estudiados hasta el momento.

En esta Memoria de Título se propone estudiar el posible rol de miR-515-5p durante la diferenciación celular del trofoblasto inducida por *T. cruzi*.

El estudio de los miRNAs placentarios modulados por el parásito permitirá tener un mayor conocimiento sobre la fisiopatología de la transmisión congénita de *T. cruzi* e identificar posibles herramientas diagnósticas y terapéuticas de la EC congénita.

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

Trypanosoma cruzi

Trypanosoma cruzi (*T. cruzi*) es un parasito protozoario perteneciente al phylum *Sarcomastigophora*, orden *Kinetoplastidae* y es el agente causal de la enfermedad de Chagas (EC) o Tripanosomiasis americana. El parásito infecta a más de 100 especies de mamíferos domésticos y silvestres y es transmitida por más de 150 especies de insectos *reduvídeos* de la subfamilia *Triatominae* (WHO, 2015). Existen múltiples cepas y clones de *T. cruzi*, los cuales se clasifican en siete unidades discretas de tipificación (DTUs, por sus siglas en inglés), TcI-TcVI y Tcbat, las que se asocian con la virulencia y tropismo tisular (Kemmerling *et al.* 2019; Zingales, 2018).

Ciclo biológico de *Trypanosoma cruzi*

El ciclo biológico de *T. cruzi* es complejo y comprende tres formas celulares (epimastigote, tripomastigote y amastigote) presentes en el insecto vector y el hospedero mamífero (**Figura 1**). Estas formas celulares se identifican por su morfología característica (posiciones relativas del flagelo, kinetoplasto y núcleo) y estado funcional (Prata, 2001; Yoshida, 2006).

Tripomastigote: El tripomastigote representa el estado extracelular infectante no replicativo del parásito, se caracteriza por ser fusiforme, medir unos 20 μm de largo y 2 μm de diámetro, y presentar un kinetoplasto anterior al núcleo. Los tripomastigotes se encuentran en el sistema circulatorio de los hospederos mamíferos, y en el intestino posterior y deyecciones de los triatominos (Prata, 2001; De Souza, 2002; Yoshida, 2006).

Epimastigote: El epimastigote es también fusiforme, mide 20 – 40 μm de largo y presenta un kinetoplasto anterior al núcleo. Corresponde al estadio extracelular replicativo y no es infectante. El epimastigote se encuentra en el intestino medio del triatomino donde se multiplica, para luego diferenciarse a tripomastigote metacíclico infectante en el intestino posterior del mismo (Prata, 2001; De Souza, 2002; Yoshida, 2006).

Amastigote: La forma amastigote corresponde a la forma intracelular replicativa en el hospedero mamífero, donde puede experimentar hasta 8-9 divisiones celulares. Es de forma

redondeada, de unos 2 micrómetros de diámetro y sin flagelo emergente. El amastigote se diferencia intracelularmente a tripomastigote y como tal provoca la ruptura de la célula hospedera (lisis celular) y entra al torrente sanguíneo para infectar a las células de los órganos blancos o cualquier otra célula nucleada o ser ingerido por un triatomino (Prata, 2001; De Souza, 2002; Yoshida, 2006).

Cuando el insecto triatomino se alimenta de la sangre de un mamífero infectado con *T. cruzi*, los tripomastigotes sanguíneos ingresan al tracto digestivo del insecto, y en su intestino medio se diferencian a epimastigotes. Estos, a medida que avanzan por el lumen intestinal, se replican y luego se diferencian a tripomastigotes metacíclicos que son altamente infectivos. El insecto vector, en el momento de alimentarse de la sangre, deposita sus deyecciones contaminadas con tripomastigotes metacíclicos (Tyler y Engman, 2001) sobre la piel o mucosas del mamífero. El ingreso al organismo estaría facilitado por las lesiones provocadas por rasguños en la zona de la picadura y por enzimas proteolíticas de la saliva del insecto. Una vez en el organismo del mamífero, los tripomastigotes son fagocitados por células presentadoras de antígenos (principalmente macrófagos) pero pueden infectar cualquier otra célula nucleada, diferenciándose a amastigotes. Tras cierto número de divisiones, los amastigotes se diferencian a tripomastigotes, lisan las células infectadas, ingresan a la circulación e infectan a distintos tejidos blanco, como miocardio, músculo esquelético, músculo liso visceral y células de la glía del sistema nervioso central (Prata, 2001; Kemmerling *et al.* 2010). Si este mamífero infectado es utilizado como alimento por la misma u otra vinchuca, los tripomastigotes circulantes ingresan al tracto digestivo del insecto vector, completando así el ciclo biológico de *T. cruzi* (**Figura 1**). Los triatominos parecen no estar afectados por la infección del parásito (Rassi y Marin-Neto, 2010).

Además de la transmisión vectorial, existen otras formas de transmisión, que incluye la vía hematológica, a través de transfusiones sanguíneas o trasplante de órganos, la vía oral por consumo de agua y alimentos contaminados y la vía congénita de madre a hijo (Pérez-Molina and Molina 2018; Kemmerling *et al.* 2019).

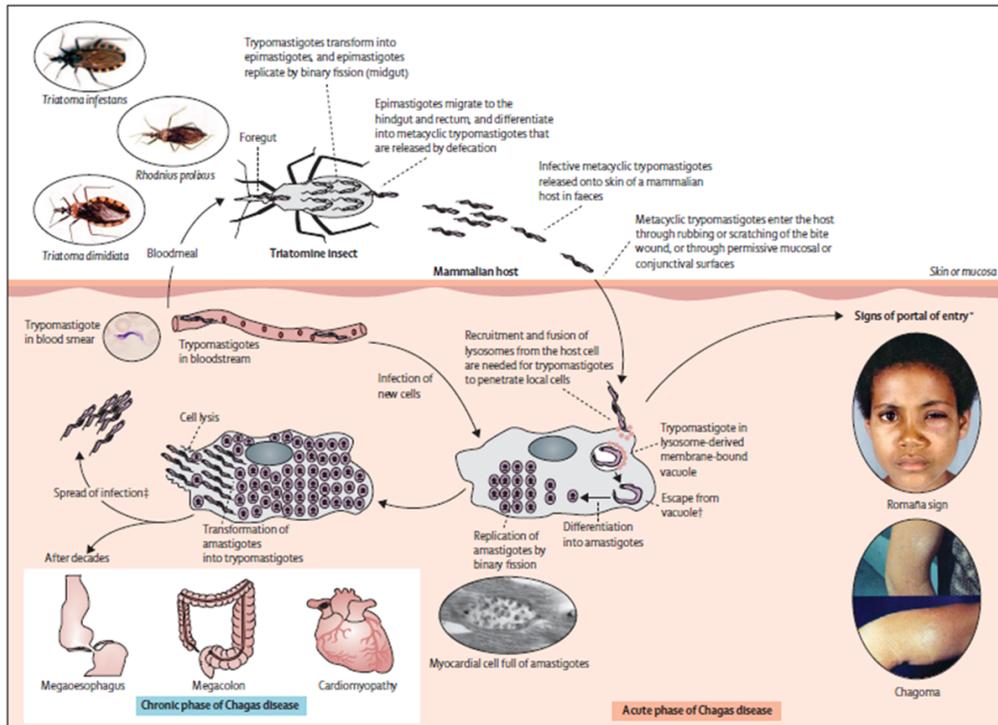


FIGURA 1. Ciclo de vida de *Trypanosoma cruzi*. El insecto vector (triatomino) ingiere tripomastigotes sanguíneos al alimentarse de la sangre de un mamífero infectado con el parásito. A medida que los parásitos avanzan por el tracto digestivo del insecto vector, éstos se diferencian a epimastigotes, la forma replicativa extracelular del parásito. En el intestino posterior del insecto vector los epimastigotes se diferencian nuevamente a tripomastigotes metacíclicos. El insecto al alimentarse nuevamente, deyecta inmediatamente sus desechos contaminados con parásitos que ingresan al nuevo hospedero a través del sitio de la picadura o a través de las mucosas. Los tripomastigotes penetran células nucleadas y se diferencian a amastigotes multiplicándose repetidas veces intracelularmente. Posteriormente se diferencian a tripomastigotes, lisan células, alcanzan la circulación sanguínea y se diseminan por todo el organismo, quedando expuestos para que sean ingeridos por un insecto vector, cerrando así el ciclo biológico. Adaptado: Rassi y Marin-Neto, 2010.

Distribución geográfica y epidemiología

Se estima que globalmente, 7 millones de personas se encuentran infectados con *T. cruzi*, incluyendo a 1.125.000 mujeres en edad fértil. La EC es endémica en 21 países de América Latina donde causa más de 7000 muertes por año y donde más de 25 millones de personas corren el riesgo de contraer la infección (**Figura 2**). Importantemente, la EC puede causar discapacidad de por vida. Adicionalmente, no existen tratamientos eficientes y seguros, a los cuales el acceso sea equitativo (Parker y Sethi, 2011). La presencia de la EC

en países no endémicos se debe principalmente a la migración de personas desde América Latina y a la transmisión congénita. Así, la mayoría de los casos de EC congénita derivan de madres infectadas vía vectorial en la niñez en áreas endémicas. La tasa media de transmisión materno-fetal en la fase crónica de la EC en América Latina se estima en 4,7% (Howard *et al.* 2013; WHO, 2015).

El costo de la EC se estimó para el año 2013 en un promedio de US \$ 7 (4–11) mil millones por año, incluida la pérdida de productividad. Los costos de atención de la salud por sí solos se estimaron en US \$ 0,6 (0,2–1,6) mil millones por año. Interesantemente, alrededor de un quinto de los costos de atención de la salud por EC se ha efectuado fuera de países endémicos. El costo del tratamiento oscila, respectivamente, entre menos de US\$ 200 y más de US \$ 30 000 por persona por año en países endémicos y no endémicos. Más aún, en EEUU el costo supera los US \$ 40 000 (WHO, 2015).

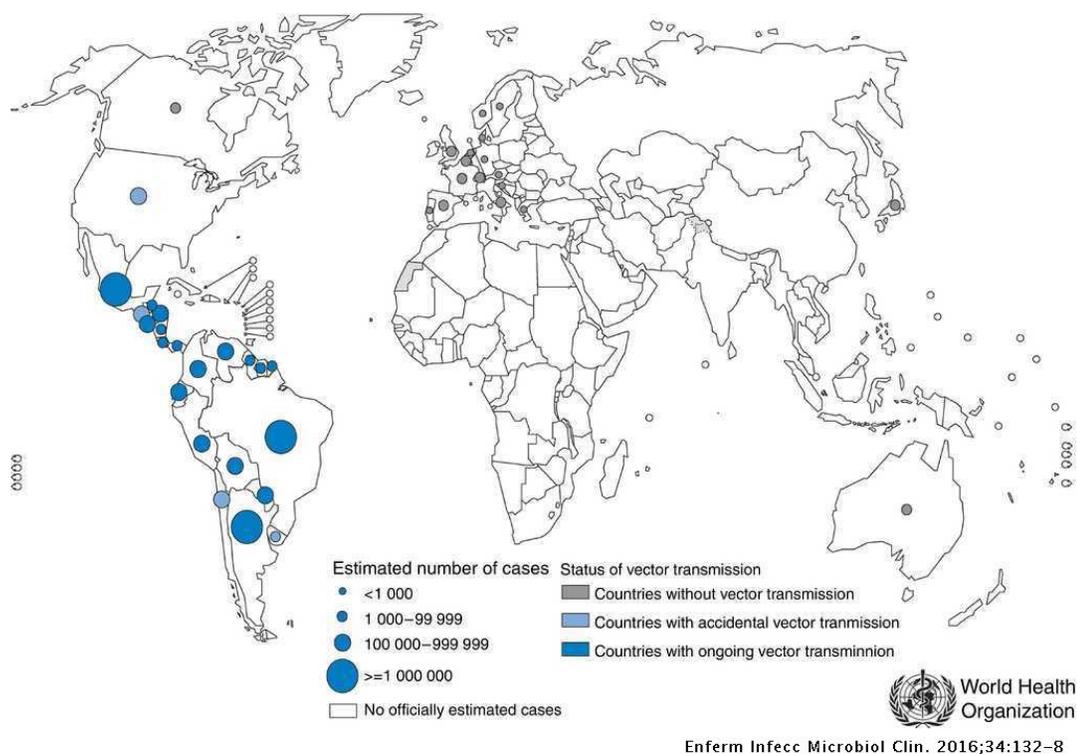


FIGURA 2. Estimación de la población mundial infectada con *Trypanosoma cruzi*. La enfermedad de Chagas es endémica en el continente americano, afectando a 21 países. Adicionalmente se está detectando esta patología en países no endémicos debido a formas de transmisión no vectorial (transfusiones, trasplantes y congénita). La “globalización” de la enfermedad de Chagas se debe a migraciones tanto legales como ilegales de personas infectadas desde países endémicos. Adaptado: World Health Organization, 2016.

Enfermedad de Chagas

La EC presenta dos fases clínicas, una aguda y otra crónica. La fase aguda comienza inmediatamente después de la inoculación del parásito y es generalmente asintomática. Se caracteriza por una elevada parasitemia. Los casos sintomáticos presentan manifestaciones de infección generalizada, edema en la zona de la picadura, también llamado chagoma de inoculación (en seres humanos, si es en la zona periocular, se conoce como signo de Romaña) y miocarditis. Sin tratamiento, el 5-10% de los pacientes sintomáticos muere a causa de encefalomielitis o falla cardíaca severa y, raramente por muerte súbita (Prata, 2001). La EC puede tener una presentación clínica más grave en niños menores de 5 años, ancianos, personas inmunodeprimidas o infectados con un alto número de parásitos (WHO, 2015). Posteriormente, se inicia la fase crónica de la enfermedad. El 60-70% de los pacientes no presentan síntomas clínicos evidentes y tampoco se detecta la presencia de parásitos circulantes. Esta etapa se caracteriza por la ausencia de evidencia clínico-patológica y generalmente los pacientes presentan un electrocardiograma normal o pequeñas alteraciones en el ritmo cardíaco. Sin embargo, al usar técnicas más sensibles como Holter de ritmo cardíaco o ecocardiografía, se ha descrito que prácticamente la totalidad de los pacientes tienen algún grado de compromiso cardíaco (Punukollu *et al.* 2007; Rassi y Marin-Neto, 2010; Muñoz-Saravia *et al.* 2012). A esta etapa también se la denomina fase indeterminada.

El 30-40% de los pacientes crónicos, se vuelven sintomáticos y sufren de alteraciones cardíacas y/o digestivas. Esta sintomatología puede aparecer incluso 10 a 30 años post-infección. El 90% de los pacientes sintomáticos presentan compromiso cardíaco con síntomas y signos derivados de una falla cardíaca conocida como cardiomiopatía chagásica crónica. El 10% restante desarrolla enfermedad digestiva, principalmente megaesófago y megacolon, y alteraciones en el sistema nervioso periférico (Muñoz-Saravia *et al.* 2012).

Enfermedad de Chagas congénita

La transmisión congénita de *T. cruzi* ocurre en aproximadamente el 5% de las mujeres chagásicas embarazadas. La infección congénita implica una transmisión prenatal *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).

Las mujeres embarazadas infectadas pueden transmitir el parásito tanto en la fase aguda como crónica de la enfermedad pudiendo repetirse en cada embarazo y transmitirse de una generación a otra. En la mayoría de los casos la transmisión congénita se da en madres seropositivas que se encuentran en la fase crónica indeterminada o asintomática de la enfermedad (Cofre *et al.*, 2016).

La enfermedad de Chagas congénita (CCD) es una infección parasitaria aguda y alrededor del 60% de los fetos infectados son asintomáticos al momento de nacer. Importantemente la CCD puede ser tratada eficientemente con terapia antiparasitaria antes del año de edad. Sin embargo, cuando no es diagnosticada a tiempo, la infección progresa a una infección crónica (Carlier *et al.*, 2020).

A pesar del alto porcentaje de caso asintomáticos, la infección con *T. cruzi* aumenta el riesgo de parto prematuro, bajo peso al nacimiento y rotura prematura de membranas, producto de la inflamación placentaria. Las tasas de transmisión del parásito durante el embarazo varían dependiendo del trimestre en el cual se encuentre. En el primer trimestre la transmisión congénita es baja y se asocian a abortos; a medida que avanza el embarazo la probabilidad de transmisión aumenta debido a cambios funcionales de la placenta que permiten un adecuado intercambio metabólico entre madre y feto. La mayoría de los recién nacidos con CCD son asintomáticos, sin embargo, estos pueden presentar complicaciones como convulsiones, hepato-esplenomegalia, cardiomegalia, distress respiratorio, entre otros. La mortalidad de la CCD es del 5% y está asociada a altas parasitemias en el recién nacido con miocarditis y meningoencefalitis como presentación clínica (Cofre *et al.*, 2016).

La probabilidad de infección congénita depende de factores parasitarios, del sistema inmune materno y fetal, así como de la placenta (Kemmerling *et al.* 2019), siendo esto último, la menos estudiada.

La placenta

La placenta es un anexo embrionario conformado por tejido materno y fetal. Su función es mantener el embarazo a través del intercambio metabólico, regulación hormonal y modulación de la respuesta inmune materna y fetal en desarrollo (Kemmerling *et al.* 2019;

Mayhew, 2014). En la placenta humana, la unidad morfo-funcional básica corresponde a la vellosidad coriónica libre, en la cual se encuentra la barrera placentaria, formada por el trofoblasto y el estroma vellositario. El trofoblasto es un epitelio bi-estratificado que está separado por una lámina basal del estroma vellositario, compuesto por tejido conectivo fetal, que contiene los capilares fetales, fibroblastos y macrófagos (**Figura 3**). La barrera placentaria debe ser atravesada por los distintos patógenos, incluido *T. cruzi*, para infectar al feto durante la transmisión congénita. El mantenimiento de la barrera placentaria está asegurado parcialmente por el recambio del trofoblasto (Liempi *et al.* 2016).

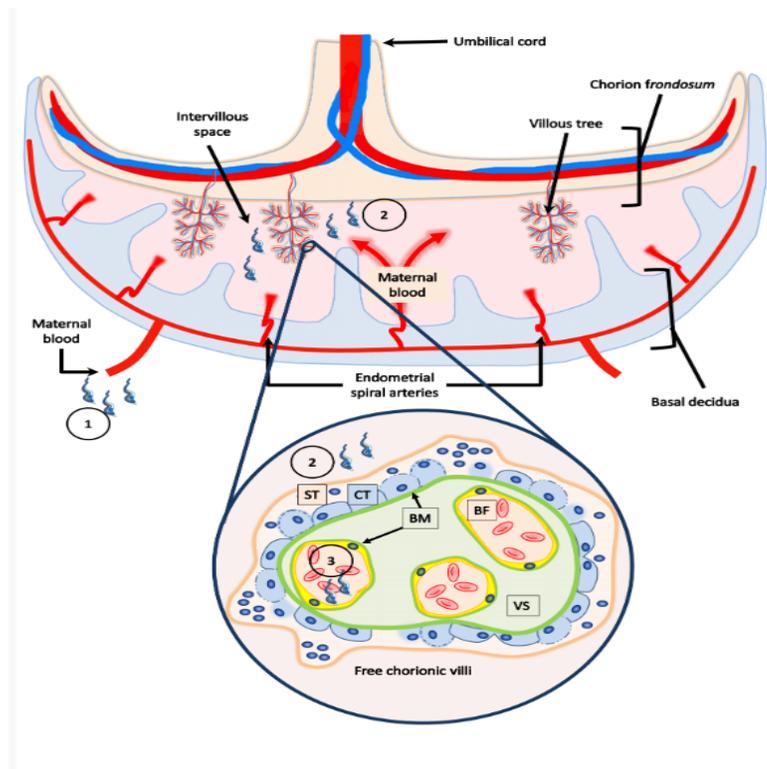


FIGURA 3. Barrera placentaria. La placenta humana está clasificada como placenta hemocorial corioalantoidea. Las unidades funcionales, donde la barrera placentaria está ubicada, corresponden a la vellosidad coriónica libre conformada por el trofoblasto y el estroma vellositario (VS). La sangre materna rodea y genera contacto con el trofoblasto en el espacio intervellositario placentario. El trofoblasto es un epitelio bi-estratificado compuesto por una superficie no-proliferativa sinciotrofoblasto (ST), y una capa proliferativa germinal citotrofoblasto (CT). El trofoblasto está conectado y separado por el estroma vellositario (VS), el tejido conectivo fetal, y la lámina basal. El parásito presente en la sangre materna (1), que hace contacto con el trofoblasto en el espacio intervellositario (2), debe cruzar la barrera placentaria para alcanzar los capilares fetales (3) e infectar el feto durante la transmisión transplacentaria. Adaptado: Kemmerling *et al.*, 2019.

Trofoblasto y recambio epitelial como mecanismo de defensa contra *T. cruzi*

El trofoblasto es el primer tejido de la barrera placentaria en contacto con la sangre materna. Se compone de dos capas celulares: el estrato basal o citotrofoblasto (CT) y el estrato superficial o sinciotrofoblasto (ST) (**Figura 3**). El CT posee altas propiedades proliferativas, mientras que el ST diferenciado pierde esta capacidad mitótica y no es capaz de proliferar.

El ST es una capa multinucleada y continua que recubre a la superficie externa de las vellosidades coriónicas y está en contacto directo con la sangre materna. Es generado y mantenido por medio de fusión sincicial, por incorporación de células del CT (Mayhew, 2014). En la fusión del CT con el ST participan múltiples factores considerados como marcadores de diferenciación o marcadores de fusión. Entre ellos se destaca: i) el factor de transcripción GCM-1 (Glial Cell Missing Homolog-1) que regula la expresión de proteínas Sincitina 1, la cual es responsable de la fusión del CT al ST (Baczyk, *et al.* 2009) y ii) la hormona gonadotrofina coriónica humana (hCG), una glicoproteína compuesta por una subunidad- α (α hCG) la cual es común con las gonadotrofinas de la pituitaria como la LH, FSH y TSH. La subunidad β (β hCG) le confiere la especificidad biológica a la hormona, la cual es expresada predominantemente en el ST. La hCG es capaz de aumentar su propia síntesis de forma autocrina, induciendo la formación del ST a través de su unión al receptor LH/CG y posterior aumento de AMPc dependiente de quinasa A (Hands Schuh *et al.* 2007). La hCG se utiliza en el diagnóstico del embarazo.

Se ha postulado, que el trofoblasto, como epitelio de revestimiento, forma una barrera física para los patógenos (Liempi *et al.* 2014, 2016). Por otra parte, el recambio epitelial ha sido considerado parte del sistema inmune innato debido al hecho de que los patógenos previa invasión celular, deben adherirse a la superficie celular. Como estas células son constantemente removidas, los patógenos asociadas a ellas también lo son (Liempi *et al.* 2014, Kemmerling *et al.* 2019).

El recambio del trofoblasto implica una orquestación precisa de diferentes procesos celulares, entre los cuales se encuentra la proliferación celular del CT, la diferenciación celular y, por último, la muerte celular tipo apoptosis (Mayhew, 2014; Liempi *et al.* 2016). Importantly, *T. cruzi* induce todos estos procesos celulares en el trofoblasto (Liempi *et al.* 2014, 2016; Kemmerling *et al.* 2019).

Por otra parte, todos estos procesos celulares implican un profundo cambio en la expresión génica del trofoblasto. La expresión génica está regulada por múltiples factores tanto a nivel transcripcional como postranscripcional. A nivel postranscripcional, los RNA pequeños no codificantes (incluyendo los miRNAs) son parte de estos mecanismos reguladores (Brennecke *et al.* 2005). Adicionalmente, se ha descrito que la infección por *T. cruzi* altera la expresión de miRNAs en el hospedero (Medina *et al.*, 2020; Navarro *et al.* 2015).

Regulación de la expresión de genes por miRNAs

Los miRNAs son moléculas de RNA de una sola hebra con una longitud entre 18 y 22 nucleótidos. En humanos se han descrito más de 2500 miRNAs, que regulan la expresión de cerca de 30% de genes fundamentales involucrados en procesos biológicos claves (Hayder *et al.* 2018). Los miRNAs reprimen a los mRNA de manera secuencia-específica mediante dos mecanismos: a) degradación del mRNA y b) inhibición de la traducción del mRNA (Hayder *et al.* 2018).

Más del 70% de los precursores de los miRNAs están localizados en intrones o exones de genes codificantes de proteínas; el resto está codificado en regiones intergénicas. Algunos miRNAs son transcritos como un único transcrito largo llamado *cluster*, que puede tener regiones similares y en cuyo caso se consideran una familia (O'Brien *et al.* 2018). Los miRNAs prometen ser herramientas diagnósticas, pronósticas y terapéuticas para diferentes patologías, incluyendo neoplasias malignas (Zhang *et al.* 2015) e infecciones (Daly & Driscoll, 2017) ya que, entre otras características: i) los cambios en la expresión de miRNAs pueden ser detectados en fluidos biológicos (Zhang *et al.* 2015); ii) la expresión de los miRNAs es tejido específica, expresándose sólo en un tipo de tejido, como el caso del *cluster* C19MC en placenta y iii) la expresión de los miRNAs puede ser modulada tanto en su biogénesis como en su mecanismo de acción (Sadovsky *et al.* 2015).

Cabe destacar que en *T. cruzi* no existen RNAs pequeños no codificantes canónicos tales como miRNAs y siRNAs (Franzén *et al.* 2011), por lo que es posible el estudio específico de miRNAs de placenta humana inducidos por la infección con *T. cruzi* sin tener interferencia de miRNAs propios del parásito.

Síntesis de miRNAs

La transcripción de los miRNAs es mediada por la RNA polimerasa II, obteniéndose pri-miRNAs los que son procesados por un complejo multiproteico, que incluye la endonucleasa RNAasa III Drosha la cual escinde el pri-miRNAs y da origen a los pre-miRNAs. Los pre-miRNAs son exportados desde el núcleo al citoplasma a través de la Exportina-5, donde son procesados por la ribonucleasa Dicer. Este procesamiento involucra la remoción del *loop* terminal, resultando en un miRNA *duplex* maduro. Ambas hebras (tanto 3' como 5') del miRNA *duplex* pueden ser cargadas en las proteínas de la familia Argonauta (AGO), dependiendo en parte de la estabilidad termodinámica de las hebras. Una vez cargada la proteína AGO con la hebra, se forma el complejo mínimo de silenciamiento inducido por miRNA (miRISC), el cual posteriormente reprimirá los mRNAs. Además, hay otros mecanismos de generación de miRNAs a partir de otras fuentes de RNA, como el *short hairpin* RNA (shRNA), *small nucleolar* RNA (snRNA) y productos de *splicing*, que utilizan la maquinaria celular involucrada en la vía canónica de miRNA (Ha & Kim, 2014; O'Brien *et al.* 2018).

La expresión de miRNAs puede ser controlada por medio de sus propios promotores mediante secuencias reguladoras específicas. Por otra parte, los genes de miRNA pueden agruparse en “*clusters*” generando un solo transcrito (Ambros, 2004). Importantemente, un miRNA puede regular la expresión de múltiples mRNAs y un mRNA puede, a su vez ser regulado por múltiples miRNA, destacándose la naturaleza compleja de la regulación de la expresión génica, en general, y este nivel de regulación en particular (Velu and Grimes, 2012).

miRNAs en placenta

Los miRNAs expresados en placenta regulan tanto el desarrollo de esta como sus procesos fisiológicos. Existen miRNAs placenta-específicos los cuales se expresan diferencialmente en las distintas etapas de desarrollo. En el humano se ha descrito que la mayoría de los miRNAs asociados al embarazo se encuentran agrupados en tres *clusters*; **C19MC** y **miR-371-3** en el cromosoma 19, así como **C14MC** en el cromosoma 14 (Morales-Prieto *et al.* 2013). El *cluster* C19MC es uno de los más grandes del genoma humano y es expresado exclusivamente en la placenta y células indiferenciadas. Este *cluster* tiene un

tamaño aproximado de 100 kb y abarca 46 genes de miRNAs que producen 58 miRNAs maduros. Se localiza en 19q13.41 y se expresa únicamente en el alelo paterno, mientras que el alelo materno está silenciado epigenéticamente. El trofoblasto es considerado como la fuente principal de miRNAs pertenecientes al C19MC (Donker *et al.* 2012).

La expresión alterada de miRNAs de C19MC se ha asociado a patologías del embarazo como la preeclampsia, neoplasias malignas e infecciones (Sadovsky *et al.* 2015; Hayder *et al.* 2018). Algunos de estos miRNAs, tales como el miR-515-5p, están asociados a la diferenciación celular del trofoblasto. Así, miR-515-5p reprime a las proteínas aromatasa P450 (hCYP19A1) y hGCM1 (human glial cells missing 1 transcription factor). El factor de transcripción hGCM1 media, a su vez, la expresión de sincitina y hCG (gonadotropina coriónica humana), ambos inducidos por *T. cruzi* en explantes de placenta humana (HPE) y células BeWo (línea celular de trofoblasto) (Liempi *et al.* 2014). La Sincitina 1 es expresada en el trofoblasto donde induce los eventos de fusión de CT y la expresión del factor de crecimiento placentario, esencial para el mantenimiento del embarazo (Yu *et al.* 2002). La hCG es sintetizada y secretada exclusivamente en el ST y es considerada como principal marcador bioquímico de diferenciación del trofoblasto (Cole, 2010). Resultados preliminares del laboratorio muestran que *T. cruzi* disminuye la expresión de miR-515-5p en HPE e induce la de hGCM1.

En esta Memoria de Título se estudió el posible rol de miR-515-5p durante la interacción placenta-*T. cruzi*, determinado sus niveles de expresión y su rol en la diferenciación celular del trofoblasto inducida por el parásito.

HIPÓTESIS

La infección con *Trypanosoma cruzi* induce una disminución de la expresión de miR-515-5p, promoviendo la diferenciación del trofoblasto mediante el aumento de la expresión de hGCM1 en explantes de placenta humana.

OBJETIVO GENERAL

Determinar el rol de miR-515-5p en la diferenciación celular inducida por *T. cruzi* en explantes de placenta humana.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Determinar los niveles de expresión y localización de miR-515-5p en HPE en respuesta a la infección con *T. cruzi*.
2. Determinar el efecto de miR-515-5p inducido por *T. cruzi* en HPE sobre la diferenciación celular en el trofoblasto.

MATERIALES Y MÉTODOS

- 1) **Obtención de tripomastigotes de *T. cruzi*:** Tripomastigotes cepa Ypsilon (Y) de *T. cruzi* se obtuvieron desde cultivos de células Vero® previamente infectadas con el parásito. Las células Vero® fueron cultivadas en frascos de cultivo de 75 mm³ en medio RPMI (RPMI 1640, Biological Industries Ltd.) suplementado con 5% de suero fetal bovino (FBS) y antibióticos (penicilina- estreptomycin) a 37°C en atmósfera húmeda de CO₂ al 5%. Posteriormente fueron infectadas con 1 a 2 mL de medio con tripomastigotes provenientes de un cultivo anterior; así los parásitos invaden la célula y se replican intracelularmente como amastigotes. Luego de 48-72 horas, los amastigotes se diferencian a tripomastigotes, lisan las células y son liberados al sobrenadante. El sobrenadante fue recolectado y centrifugado a 3.000 x g durante 10 minutos a fin de obtener en el sedimento las formas infectivas de *T. cruzi*. Los tripomastigotes se re-suspendieron en medio RPMI 1640 y el número de parásitos fue cuantificado mediante el uso de una cámara de Neubauer (Castillo *et al.*, 2017).
- 2) **Obtención de placenta y cultivo de HPE:** Las placentas fueron obtenidas a partir de partos a término (mayor a 37 semanas de gestación) por cesárea electiva, de madres sanas, con embarazos monogestacionales y fetos con desarrollo normal. Los criterios de exclusión fueron cualquier patología materna, fetal o placentaria. Los órganos fueron obtenidos en el Servicio de Obstetricia y Ginecología del Hospital San José, Servicio de Salud Metropolitana Norte, Santiago, previo consentimiento informado para el uso experimental de la placenta. La placenta fue recolectada y procesada en no más de 30-60 minutos después del parto. El tejido placentario fue obtenido desde la parte central de los cotiledones, y las superficies materna y fetal fueron descartadas para obtener por medio de disección los HPE de un tamaño aproximado de 0.5 cm³. Los HPE fueron lavados con *buffer* fosfato salino (PBS) para remover la sangre y luego incubados en medio RPMI 1640 suplementado con antibióticos y SFB al 10% (Drewlo *et al.* 2008).
- 3) **Infección *ex vivo* de HPE:** Los HPE fueron cultivados en presencia de tripomastigotes de *T. cruzi* en una concentración de 10⁵ parásitos/ml durante 2 y 48 horas o forskolina (100 µM; como control positivo para la diferenciación del trofoblasto) en 1 mL de medio RPMI 1640 suplementado con 10% de FBS. Los HPE

fueron mantenidos en solución RNA Later® a 4°C durante toda la noche y luego congelados a -80°C hasta su procesamiento (Duaso et al., 2010; Liempi et al., 2014).

- 4) Inhibición y sobreexpresión de miR-515-5p:** Se obtuvieron los HPE como se describió más arriba y posteriormente fueron transfectados con 50 nM o 100 nM de un control negativo de AntagomiR marcado en el extremo 5' con Cy3 (abm®) e incubados durante 24 o 48 horas a 37°C, para evaluar la capacidad del antagomiR en penetrar el HPE (Kredo-Russo y Hornstein, 2011; Rebustini, 2017). La localización fue analizada mediante microscopía de fluorescencia en un microscopio de epifluorescencia (Motic BA310; Hong Kong, China). Además, los HPE fueron transfectados con antagomirs o mimic de miR-515-5p o sus respectivos controles (“scrambles”). Se probaron concentraciones de 100 y 200 nM para ambas condiciones y se incubaron durante 24 horas a 37°C (Rebustini, 2017). Se utilizó el antagomir: hsa-miR-515-5p (Cat. No. MNH02866 abm®) y el mimic de hsa-miR-515-5p (Cat. No. MCH02866 abm®). Adicionalmente se utilizaron los controles negativos para “mimics” (Cat. No. MCH00000 abm®) y para antagomiR (Cat. No. MNH00000 abm®). Posterior a la transfección, los HPE fueron cultivados durante 2 horas con tripomastigotes de *T. cruzi* (10⁵ parásitos/mL) en medio RPMI sin rojo fenol para ensayos de viabilidad (LDH) y de β-hCG en el sobrenadante. Finalmente, para la extracción de miRNAs y mRNAs, las muestras fueron mantenidas en solución RNALater® (ThermoFisher Scientific) a 4°C durante toda la noche y luego congelados a -80°C hasta su procesamiento.
- 5) Extracción de miRNA y mRNAs:** Los HPE fueron homogeneizados en 1 mL de RNazol® RT (Sigma-Aldrich) y procesados siguiendo el protocolo para aislamiento de fracciones separadas de mRNAs y miRNAs. El producto aislado de mRNAs y miRNAs fue conservado a -80°C hasta su posterior análisis. La concentración de los mRNAs y miRNAs fue medida por Fluorometría con el Qubit™ RNA HS Assay Kit (Invitrogen™) y con Quant-iT™ microRNA Assay Kit (Molecular probes), respectivamente. Para la síntesis de cDNA a partir de miRNAs se usó el sistema MystiCq™ microRNA cDNA Synthesis Mix (Sigma-Aldrich) siguiendo las instrucciones del fabricante, mientras que para la retro-transcripción de mRNAs se

utilizó el sistema SuperScript™ IV First-Strand Synthesis System (Invitrogen™) (Androvic et al., 2017).

- 6) **Determinación de la expresión de miRNA y mRNA por RT-qPCR:** La expresión de miR-515-5p fue determinada por RT-qPCR de dos colas. La amplificación de cDNA de miR-515-5p se realizó con 12,5 µL 2X MystiCq microRNA SYBR Green qPCR, 0,5 µL 10 µM de MystiCq Universal PCR Primer, 0,5 µL 10 µM del Primer MystiCq microRNA qPCR Assay (Tabla 1), 10,5 µL de agua libre de nucleasas, y 1 ng/µL de cDNA (producto de la transcripción inversa), en 25 µL qRT-PCR *reaction*. La cuantificación del mRNA de hGCM-1 se llevó a cabo en un volumen de reacción de 20 µL conteniendo 5ng/µL de mRNAs cDNA (producto de la transcripción inversa), 10 µL de SensiFAST™ SYBR® Hi-ROX Kit (Bioline®), 1µL de cada primer a 10nM (Tabla 2) y 3 µL de agua ultra pura libre de DNAsas. Todas las reacciones qRT-PCR se realizaron en triplicado, en al menos tres oportunidades distintas. El programa térmico para la reacción de qRT-PCR consistió en una pre-incubación/activación a 95°C por 2 minutos, seguido de 40 ciclos de PCR, desnaturalización a 95°C por 5 segundos y alineamiento a 60°C por 30 segundos, seguidos de una fase de disociación, que oscila entre los 60 y 95°C. La expresión relativa de genes fue calculada por el método de doble control comparativo $\Delta\Delta C_t$ usando como gen constitutivo (*housekeeping gene*) la expresión del snRNA U6 (RNU6-1) o hGAPDH para miRNAs y mRNAs, respectivamente. (Androvic *et al.*, 2017; Pfaffl, 2001).
- 7) **Ensayos de hibridación *in situ*:** Los HPE se fijaron en formalina neutra al 10% y fueron incluidos en parafina. Los miRNA se detectaron mediante hibridación *in situ* colorimétrica con digoxigenina. La sonda de control snRNA LNA U6 marcada con 5'-DIG (5'-DIG / cacgaatttcgctgtcatcctt / -3 ') se utilizó como control positivo y la sonda de control de miRNA codificada con LNA marcada con 5'-DIG y 3'-DIG (YD00699004®) se utilizó como control negativo. Todas las sondas y el kit de optimización miRCURY LNA se utilizaron de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Qiagen®). Las tinciones nucleares en las secciones de tejido se efectuaron con Nuclear Fast Red (Vector Laboratories®). Las imágenes fueron cargadas en el software ImageJ v.1.34 (National Institutes of Health, Bethesda, MD) para su

análisis. La intensidad de la tinción (fluorescencia o marrón) se extrajo de las imágenes con un algoritmo de deconvolución de color, integrado en el software ImageJ. Después de la conversión de los valores de luminosidad de los píxeles a una escala de densidad óptica, la densidad óptica integrada se midió en las imágenes de tinción positiva extraídas previamente y se normalizó por el área positiva en cada microfotografía. La intensidad de la señal se calculó como $I = 10 \cdot \Sigma OD / A$ en dB / μm^2 , siendo ΣOD la densidad óptica integrada y A el área de tinción positiva (μm^2).

- 8) **Métodos Histológicos:** Los HPE se fijaron durante 24 horas en formaldehído 4% preparado en un tampón de fosfato pH 7,4. Finalmente, fueron lavados y deshidratados en concentraciones crecientes de etanol, aclaradas en xilol e incluidas en parafina fundida a 60°C (Bancroft y Gamble, 2008). Los cortes de las muestras obtenidas fueron hechos a 5 μm de espesor, los cuales posteriormente fueron sometidos a la tinción de Hematoxilina-eosina para análisis histológico de rutina (Bancroft y Gamble, 2008; Duaso *et al.*, 2010).
- 9) **Cuantificación de la enzima Lactato Deshidrogenasa (LDH):** Se recolectó el sobrenadante de los HPE controles y transfectados y las muestras fueron conservadas a -20°C hasta su procesamiento para la evaluación de la actividad de la LDH, la cual fue determinada con el LDH Cytotoxicity Detection Kit (Cat# MK401, Takara Bio Inc) siguiendo las instrucciones del fabricante. Las placas fueron incubadas a temperatura ambiente durante 30 minutos en oscuridad y luego se determinó la absorbancia con el lector de microplacas Varioskan Flash Multimode (Thermo Scientific®) a una longitud de onda de referencia de 490 nm. Los resultados fueron normalizados con respecto a los valores obtenidos en la condición control.
- 10) **Análisis Estadístico:** Cada experimento se realizó en triplicado y al menos en tres oportunidades distintas. Los resultados se expresaron como promedio más desviación estándar. La significancia de las variables cuantitativas se evaluó mediante el test t de Student. Las variables múltiples se analizaron mediante ANDEVA, seguido por Dunnett's post test. Se utilizó el programa GraphPad Software PRISM 8.0 (GraphPad Software, San Diego, EE.UU.). Se consideró un $p < 0,05$ como estadísticamente significativo.

- 11) **Bioseguridad:** El laboratorio se encuentra ubicado en el Instituto de Ciencias Biomédicas de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile y cuenta con los requerimientos básicos de Bioseguridad, certificado por la "Unidad de Prevención de Riesgos y Bioseguridad de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile" (Anexo 1).
- 12) **Ética:** Este estudio cuenta con la aprobación de los respectivos Comités de Ética del Servicio de Salud Metropolitano Norte (2019-0010) (Anexo 2)

RESULTADOS

HPEs pueden ser transfectados con *mimics* y *antagomirs* miR-515-5p.

HPEs fueron transfectados con 100 nM de *antagomirs* miR-515-5p (A-515), *mimics* (M-515) y sus respectivos *scrambles* (AS o MS) (Figura 4), según lo descrito en la metodología. La transfección con M-515 y A-515, aumentaron y disminuyeron en un $92,59 \pm 1,09\%$ ($p \leq 0.01$) y $76,96 \pm 20,23\%$ ($p \leq 0.001$), respectivamente, los niveles de miR-515-5p en HPE. Como se esperaba, la transfección con los respectivos *scrambles* no afectó significativamente los niveles de miR-515-5p. Luego, transfectamos los HPEs con *AntagomiR-Cy3* conjugado para detectar su localización en el tejido. Como se muestra en la Figura 5, los *AntagomiR-Cy3* pueden ser observados en toda la vellosidad coriónica, pero se localizan principalmente en el trofoblasto (flechas blancas).

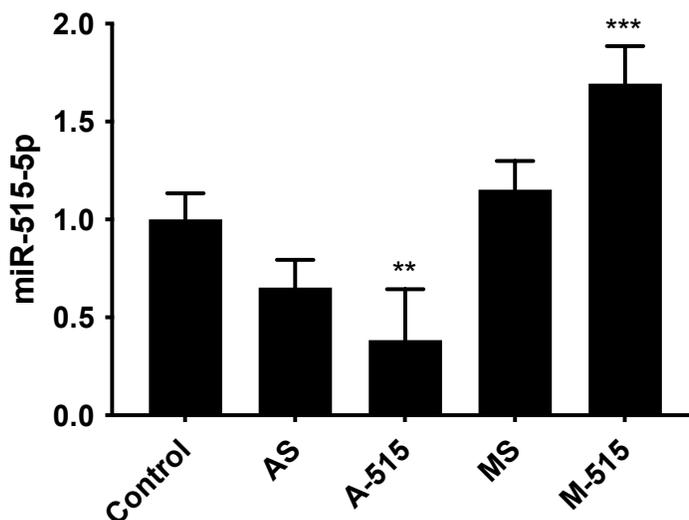


FIGURA 4. HPEs se transfectan con *antagomirs* y *mimics* de miR-515-5p. HPE fueron incubados con 100 nM de *antagomiR* o *Mimic* durante 24 horas. La expresión de miR-515-5p fue determinada mediante Real-Time PCR. Los datos obtenidos corresponden al menos a 3 experimentos independientes que se realizaron por triplicado y representan a la media \pm SD analizada por medio de ANOVA, seguido del post-test de Dunnett. ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$. *AntagomiR Scrambled* (AS), *AntagomiR-515-5p*, *Mimic Scrambled* (MS), *Mimic-515-5p* (M-515).

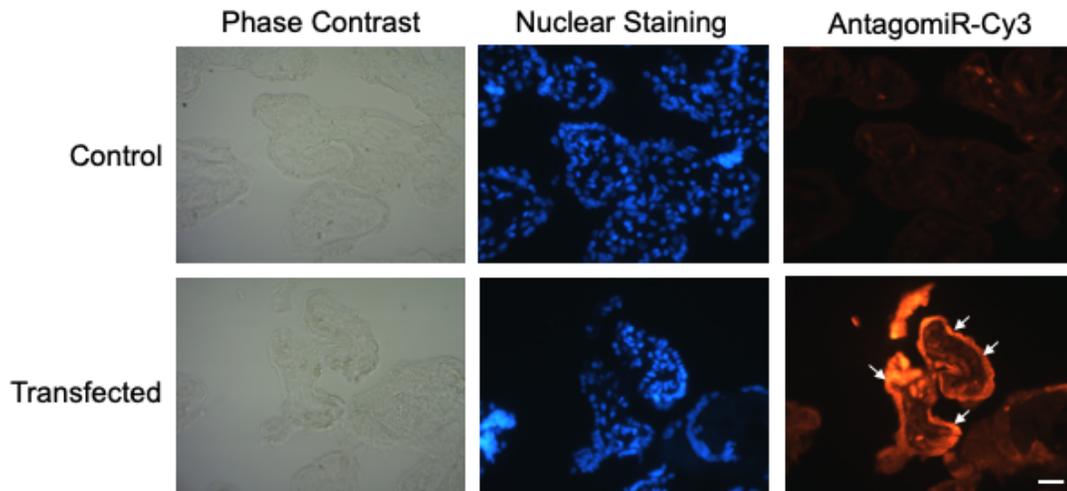


FIGURA 5. HPEs se transfectan de manera homogénea con *antagomirs* y *mimics* de miR-515-5p: HPE fueron transfectados con el control negativo del *AntagomiR-Cy3* (100 nM) durante 24 horas (A,B,C), así como con el *AntagomiR-Cy3* durante 24 horas (D,E,F). Las muestras se procesaron con técnicas histológicas de rutina y los núcleos se tiñeron con DAPI. Barra de aumento 20 μ m.

Adicionalmente, se realizó un análisis histopatológico de los HPEs transfectados y no se evidenció daño tisular (**Figura 6A**) respecto a los controles sin transfectar, lo que fue corroborado mediante la detección de LDH en el sobrenadante (**Figura 6B**). Así, la transfección con 50 nM o 100 nM con *AntagomiR-Cy3* no causa incremento de la actividad enzimática de LDH respecto al control sin transfectar.

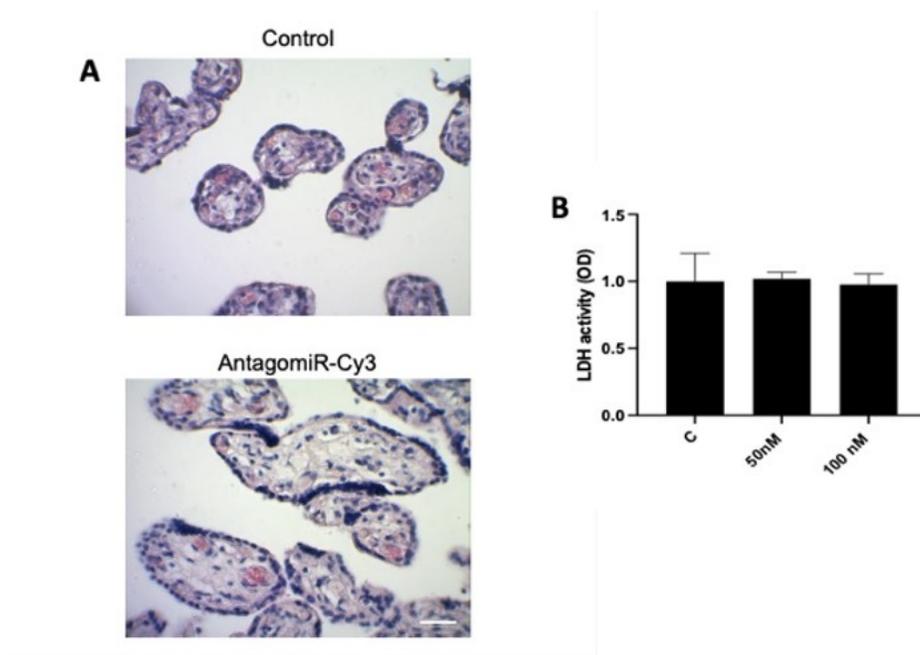


FIGURA 6. La transfección con *AntagomiR-Cy3* no induce daño tisular en los HPE. HPE fueron transfectados con *AntagomiR-Cy3* (100 nM) (A) durante 24 horas y cuantificados (B). Las muestras se procesaron para análisis histopatológico convencional. Barra de aumento 20 μ m. El panel B muestra la cuantificación de la actividad enzimática de LDH en el sobrenadante de los cultivos de HPE no transfectados (control) o que fueron transfectados con 50 ó 100 nM de *AntagomiR-Cy3*. Los datos obtenidos corresponden al menos a 3 experimentos independientes que se realizaron por triplicado y representan a la media \pm SD analizada por medio de ANOVA seguido del post-test de Dunnett.

***T. cruzi* disminuye los niveles de miR-515-5p en HPE**

Los HPE fueron transfectados con M-515 ó MS por 24 hrs y luego infectados con 10^5 parásitos/mL por 2 horas. *T. cruzi* disminuyó significativamente los niveles de miR-515-5p ($43.41 \pm 26.00\%$ ($p \leq 0.01$)) respecto a las muestras controles sin transfectar. Sin embargo, M-515 no fue capaz de revertir la disminución de los niveles de miR-515-5p, a pesar de que M-515 los eleva significativamente ($69,33 \pm 19,27\%$ ($p \leq 0.01$)) (**Figura 7**). La disminución de los niveles de miR-515-5p fue corroborada mediante hibridación *in situ* (**Figura 8**). Se observa en las muestras controles, sin infectar, marcaje en toda la vellosidad coriónica con una mayor intensidad en el trofoblasto (**Figura 8A**), que disminuye en muestras infectadas con el parásito (**Figura 8B**).

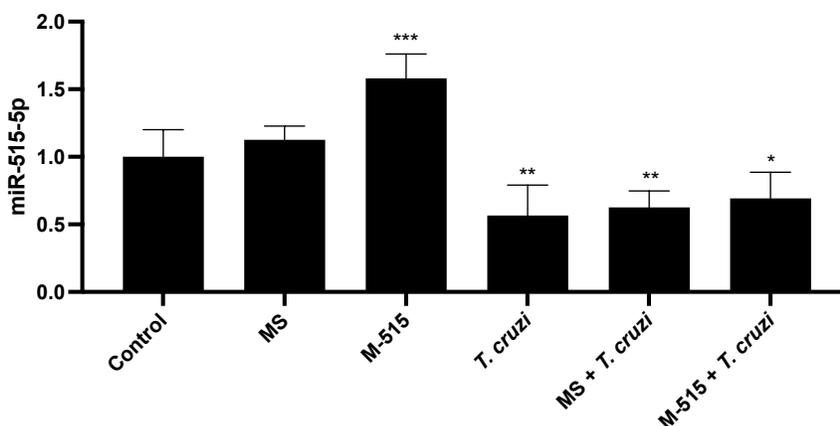


FIGURA 7. *T. cruzi* inhibe la expresión de miR-515-5p y el mimic de miR-515-5p no es capaz de revertir el efecto. HPE fueron incubados en presencia y ausencia de 200 nM de Mimic Scrambled (MS) o Mimic-515-5p (M-515) durante 24 horas y luego incubados en presencia y ausencia de 10^5 tripomastigotes/mL de *T. cruzi* durante 2 horas. La expresión de miR-515-5p fue determinada por Real-Time PCR. Los datos obtenidos corresponden al menos a 3 experimentos independientes que se realizaron por triplicado y representan a la media \pm SD analizada por medio de ANOVA seguido del post-test de Dunnett. * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$.

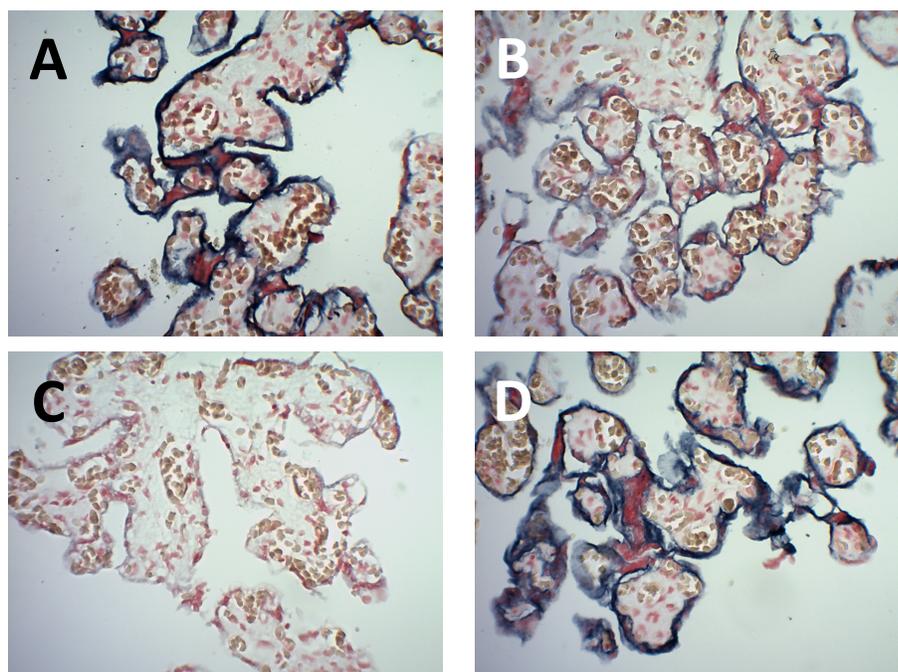


FIGURA 8. *T. cruzi* inhibe la expresión de miR-515-5p en HPE. HPE fueron incubados en ausencia (A) y presencia (B) de 10^5 tripomastigotes/mL de *T. cruzi* durante 2 horas. La expresión de miR-515-5p fue determinada mediante hibridación *in situ* colorimétrica con digoxigenina. Los paneles C y D muestran, respectivamente los controles negativo y positivo. Barra de aumento 20 μ m.

La sobreexpresión de miR-515-5p revierte el incremento de hGCM-1 inducido por *T. cruzi*

Los HPE fueron transfectados con *mimics* (M-515), *antagomirs* (A-515) y respectivos *scrambles* (MS, AS) e incubados en presencia del parásito o forskolina (100 μ M) como control positivo para la diferenciación del trofoblasto. La transfección con A-515 aumentó ($54,13 \pm 27,57\%$ ($p \leq 0,05$)) y M-515 disminuyó ($52,73 \pm 21,72\%$ ($p \leq 0,001$)) la expresión de hGCM-1 (**Figura 9A**). El parásito aumentó la expresión de hGCM-1 ($36,11 \pm 21,36\%$ ($p \leq 0,05$)), un efecto que se previene por la sobreexpresión de miR-515-5p ($68,47 \pm 23,24\%$ ($p \leq 0,001$)) (**Figura 9B**).

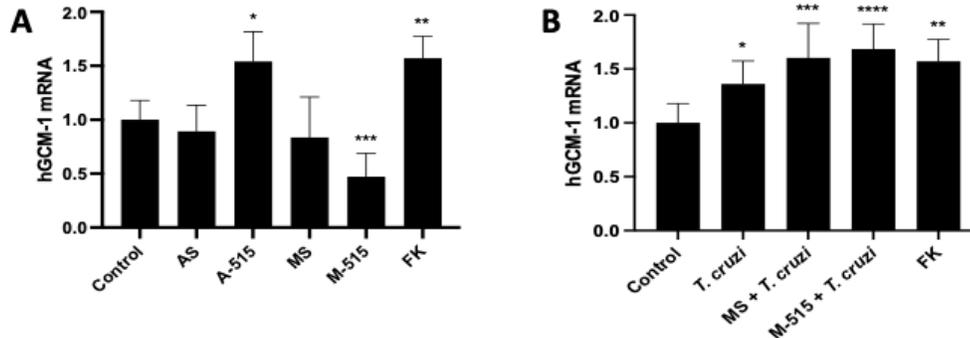


FIGURA 9. MiR-515-5p regula el aumento de hGCM-1 inducido por *T. cruzi*: Se transfectaron HPE con 100 nM de miR-515-5p (A, B) o *antagomirs* (A-515), imitador (M-515) y sus respectivos *scrambles* (AS o MS) durante 24 horas y luego fueron desafiados con 10^5 tripomastigotes de *T. cruzi* durante 2 horas. La expresión de mRNA de hGCM-1 se determinó mediante PCR en tiempo real. Todos los valores se presentan como media \pm SD y se analizaron por medio de ANOVA, seguido del post-test de Dunnett. * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$; **** $p \leq 0,0001$.

DISCUSIÓN

Los patógenos, particularmente los parásitos, presentan una gran variedad de mecanismos de virulencia que les permiten invadir los diferentes hospederos. Por otro lado, los organismos infectados son capaces de detectar la intrusión de patógenos y reaccionan activando las defensas del hospedero. Por ende, el fracaso o éxito en la infección está determinado por una compleja interacción entre los factores parasitarios y los del hospedero (Kemmerling et al. 2019). Durante la transmisión congénita de patógenos, la placenta juega un papel fundamental para determinar si una infección tiene éxito o no. En este contexto, hemos demostrado que *T. cruzi*, durante el proceso de invasión e infección de la placenta, produce alteraciones tisulares ocasionadas por sus enzimas proteolíticas y activación de proteasas endógenas como las metaloproteasas de la matriz MMP-2 y MMP-9 (Duaso et al., 2010, Castillo et al., 2012). Por otro lado, la injuria estimula en la placenta su sistema de defensa a través de la secreción de citoquinas pro-inflamatorias e inmunomoduladoras, la activación tanto de receptores tipo *Toll* (Castillo et al., 2017), como de las vías de señalización NFκB (Liempi et al., 2019). Adicionalmente, *T. cruzi* induce el recambio epitelial del trofoblasto, que se ha propuesto como mecanismo antiparasitario local (Liempi, et al., 2016; Kemmerling et al., 2019), ya que los patógenos, antes de la invasión a un organismo, deben adherirse a la superficie de un epitelio de revestimiento cuyas células superficiales están continuamente eliminándose y con ello, los patógenos adheridos son también removidos (Chang et al., 2013; Liempi et al., 2016). Además, las células epiteliales infectadas tienen un sistema de alarma para alertar a las células vecinas no infectadas mediante la transferencia de señales de peligro a través de uniones tipo comunicantes (nexo), lo que permite que el epitelio elimine las células hospederas infectadas (Chang et al., 2013; Kasper et al., 2010). El recambio epitelial también es considerado en otros órganos, tales como piel, tractos gastrointestinal y urogenital, como un mecanismo de protección contra los agentes patógenos (Cliffe et al., 2005; Kim et al., 2010). Existe un nivel basal de recambio epitelial, que puede acelerarse o disminuirse en respuesta a diversos estímulos. La infección generalmente acelera el recambio del epitelio (Kim et al., 2010). Diversos estudios han demostrado la importancia del recambio en el epitelio intestinal, el cual aumenta rápidamente en presencia de diferentes patógenos (Savage et al., 1981).

Por otra parte, la formación y la mantención del ST es esencial durante todo el embarazo, siendo necesario para una implantación embrionaria exitosa, transporte de oxígeno y nutrientes, y la secreción de hormonas específicas necesarias para el desarrollo fetal, entre otros (Malassinè y Cronier, 2002).

El recambio del trofoblasto involucra una coordinación precisa de diferentes procesos celulares que incluyen la proliferación del CT, diferenciación (lo que significa fusión sincicial por incorporación de células del CT a un ST no replicativo y diferenciación de células del CT previo a la fusión con el ST) y muerte celular. La muerte celular en el trofoblasto se evidencia por la formación de nódulos apoptóticos en el ST que son liberados a la sangre materna (Huppertz y Gauster, 2011, Liempi et al 2016). Estudios previos han demostrado que bajas concentraciones de *T. cruzi* inducen proliferación celular en células del trofoblastos y HPE (Droguett et al 2017), diferenciación celular (Liempi et al 2014; Liempi et al 2016) y muerte celular tipo apoptosis (Duaso *et al.*, 2011).

Existen diversos marcadores de diferenciación del trofoblasto, entre los cuales destaca la expresión del factor de transcripción GCM-1, que es un factor de transcripción específico de la placenta. Se ha demostrado que este factor está directamente relacionado con el inicio de la fusión del trofoblasto, regulando la expresión de las sincitinas. Al mismo tiempo, la actividad de GCM-1 solo se inicia cuando una célula del CT ha abandonado el ciclo celular. Así, la actividad GCM-1 se correlaciona negativamente con la proliferación del trofoblasto y positivamente con la diferenciación celular (Baczyk, *et al.*, 2009). Aquí hemos corroborado resultados anteriores que demuestran que *T. cruzi* induce la expresión de hGCM-1 (Medina et al. 2020). Otro marcador de diferenciación celular del trofoblasto es la expresión de la hormona gonadotrofina coriónica humana (hCG), la cual ocurre únicamente en el ST. La hCG es una glicoproteína compuesta de una subunidad alfa (α -hCG), que es común con las gonadotropinas de la pituitaria, tales como LH, FSH y TSH, siendo la subunidad beta (β -HCG) la que confiere la especificidad biológica a esta hormona (Handsuh *et al.*, 2007). La mantención del embarazo durante el primer trimestre depende de la síntesis de la hCG, que impide la regresión del cuerpo lúteo, lo que permite el mantenimiento de la secreción de progesterona ovárica. La hCG aumenta su propia síntesis en forma autocrina mediante la inducción de la formación de ST a través del receptor de LH/CG y PKA dependiente de cAMP (Cronier *et al.*, 1997). Así, la secreción de hCG y de

lactógeno placentario (hPL) son los principales marcadores bioquímicos de la diferenciación de trofoblasto *in vitro*.

Importantemente, los procesos celulares involucrados en las alteraciones tisulares, secreción de citoquinas y recambio epitelial son regulados, entre otros, por RNAs no codificantes, entre ellos miRNAs (Hayder *et al.*, 2018; Medina *et al.* 2020).

Los miRNAs regulan la expresión de más del 30% de genes fundamentales, los cuales se encuentran involucrados en procesos biológicos críticos que incluyen la diferenciación celular y respuesta del sistema inmune; siendo determinante el éxito o falla en la infección (Acuña *et al.*, 2020; Medina *et al.*, 2020; Zheng *et al.*, 2013). *T. cruzi* induce un perfil específico de miRNA en explantes, muy diferente de otros parásitos protozoarios como *Toxoplasma gondii* (*T. gondii*), lo cual podría explicar la baja incidencia en transmisión congénita para *T. cruzi* y la alta tasa de transmisión para *T. gondii* (Medina *et al.*, 2020).

Para evaluar la capacidad del *antagomiR* y *mimics* del miR-515-5p de penetrar y transfectar el trofoblasto, la fuente principal de los miRNAs placentarios (Luo *et al.*, 2009), diseñamos un *antagomiR* control negativo marcado fluorescentemente con Cy3 y luego, transfectamos los HPE. El examen microscópico de los HPE transfectados demostró la presencia del *antagomiR*-Cy3 en el tejido placentario, principalmente en el trofoblasto y, en menor grado, en el estroma vellositario (Figura 2). Adicionalmente, se evaluaron los niveles de miR-515-5p y, tanto el antagomir como el correspondiente mimic, disminuyen y aumentan, respectivamente, su expresión (Figura 1). Importantemente, la transfección no daña al tejido placentario como fue evidenciado mediante análisis histopatológico y cuantificación de los niveles de LDH (Figura 3C). La concentración de antagomir y mimic utilizado está dentro de los rangos utilizados en otros estudios. Así, en cultivos de órganos de embriones se recomienda usar concentraciones de *antagomirs* y *mimics* desde 50 nM hasta 2µM (Kredo-Russo y Hornstein, 2011).

Previamente, hemos reportado la disminución en la expresión de miR-515-5p en la infección *ex vivo* de HPE por *T. cruzi*, y postulamos que esta inhibición podría ser, al menos parcialmente, responsable de la diferenciación del trofoblasto inducida por el parásito (Medina *et al.* 2020). Por lo tanto, nuestro objetivo era estudiar el efecto de miR-515-5p en

su blanco directo, el factor de transcripción hGCM-1 (Zhang et al., 2016), durante la infección parasitaria de HPE. Como se esperaba, la infección con *T. cruzi* redujo la expresión de miR-515-5p y promovió la expresión del transcrito de hGCM-1 en HPE. La infección con *T. cruzi* en presencia de los “*mimics*” disminuyó la expresión miR-515-5p y revirtió el aumento de la expresión de hGCM-1. Este resultado es importante, ya que se ha descrito que para lograr una represión significativa de los niveles de mRNA de hGCM-1 es necesaria la interacción de otros miRNAs que comparten el mismo blanco o secuencia consenso, tal como se conoce para los miembros del *cluster* C19MC (Ito et al., 2015; Morales-Prieto et al., 2013). Entonces, la inhibición de miR-515-5p, debido a la infección parasitaria de HPE, incrementó los niveles de hGCM-1 y, por lo tanto, promovió la diferenciación del trofoblasto, como parte de una respuesta placentaria antiparasitaria contra la infección por *T. cruzi*.

CONCLUSIÓN

La diferenciación de trofoblasto inducida por *T. cruzi* está mediada, al menos parcialmente, por la inhibición de miR-515-5p y el consecuente incremento en la expresión de su gen blanco hGCM-1.

BIBLIOGRAFÍA

- ACUÑA, S.; FLOETER-WINTER, L.; MUXEL, S.** 2020. “MicroRNAs: Biological Regulators in Pathogen–Host Interactions”. *Cells* 9, 113. <https://doi.org/10.3390/cells9010113>.
- AMBROS, V.** 2004. “The Functions of Animal MicroRNAs”. *Nature* 431 350-355. <https://doi.org/10.1038/nature02871>.
- ANDROVIC, P.; VALIHRACH, L.; ELLING, J.; SJOBACK, R.; KUBISTA, M.** 2017. “Two-tailed RT-qPCR: a novel method for highly accurate miRNA quantification”. *Nucleic acids research* 45(15), e144. <https://doi.org/10.1093/nar/gkx588>.
- BACZYK, D.; DREWLO, S.; PROCTOR, L.; DUNK, C.; LYE, S.; KINGDOM, J.** 2009. “Glial Cell Missing-1 Transcription Factor is Required for the Differentiation of the Human Trophoblast”. *Cell Death Differ* 16, 719–727. <https://doi.org/10.1038/cdd.2009.1>.
- BANCROFT, J.; GAMBLE, M.** 2008. “Theory and Practice of Histological Techniques”. London: Elsevier Health Sciences.
- BRENNECKE, J.; STARK, A.; RUSSELL, R.; COHEN, S.M.** 2005. “Principles of MicroRNA-Target Recognition”. *PLoS Biology* 3(3), e85. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0030085>.
- CARLIER, Y.; SCHIJMAN, A.; KEMMERLING, U.** 2020. “Placenta, *Trypanosoma cruzi*, and Congenital Chagas Disease”. *Current Tropical Medicine Reports* 7, 172–182. <https://doi.org/10.1007/s40475-020-00210-5>.
- CARLIER, Y.; TRUYENS, C.** 2010. “22 - Maternal–Fetal Transmission of *Trypanosoma Cruzi*”. En *American Trypanosomiasis*, editado por Jenny Telleria y Michel Tibayrenc, 539-81. London: Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384876-5.00022-8>.
- CASTILLO, C.; MUÑOZ, L.; CARRILLO, I.; LIEMPI, A.; GALLARDO, C.; GALANTI, N.; MAYA, J.; KEMMERLING, U.** 2017. “Ex Vivo Infection of Human Placental Chorionic Villi Explants with *Trypanosoma Cruzi* and *Toxoplasma Gondii* Induces Different Toll-like Receptor Expression and Cytokine/Chemokine Profiles”. *American Journal of Reproductive Immunology*, 78 (1). <https://doi.org/10.1111/aji.12660>.
- CASTILLO, C.; MUÑOZ, L.; DUASO, J.; GALANTI, N.; JAÑA, F.; FERRERIA, J.; CABRERA, G.; MAYA, J.D.; KEMMERLING, U.** 2012. “Role of matrix metalloproteinases 2 and 9 in ex vivo *Trypanosoma cruzi* infection of human placental chorionic villi”. *Placenta* 33(12), 991-997. <http://dx.doi.org/10.1016/j.placenta.2012.10.004>.
- CHANG, M.; MUKHERJEA, D.; GOBBLE, R.; GROESCH, K.; TORRY, R.; TORRY, D.** 2008. “Glial Cell Missing 1 Regulates Placental Growth Factor (PGF) Gene Transcription in Human Trophoblast”. *Biology of Reproduction* 78 (5), 841-851. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.107.065599>.

- CHANG, S.; LEE, S.; YANG, L.; KIM, D.; YOON, J.; KO, H.; OGAWA, M.; SASAKAWA, C.; KWEON, M.** 2013. “Autophagy controls an intrinsic host defense to bacteria by promoting epithelial cell survival: a murine model.” *PloS one* 8. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0081095>.
- CHEN, F.; ZHU, H.-H.; ZHOU, L.-F.; WU, S.-S.; WANG, J.; CHEN, Z.** 2010. “Inhibition of c-FLIP expression by miR-512-3p contributes to taxol-induced apoptosis in hepatocellular carcinoma cells”. *Oncology reports* 23, 1457–1462. https://doi.org/10.3892/or_00000784.
- CLIFFE, L.; HUMPHREYS, N.; LANE, T.; POTTEN, C.; BOOTH, C.; GRENCIS, R.** 2005. “Accelerated intestinal epithelial cell turnover: a new mechanism of parasite expulsion”. *Science* Jun 3, 308 (5727), 1463-1465. <https://www.science.org/doi/10.1126/science.1108661>.
- COFRÉ, F.; DELPIANO L.; LABRAÑA Y.; REYES A.; SANDOVAL A.; IZQUIERDO G.** 2016. “TORCH syndrome: Rational approach of pre and post natal diagnosis and treatment. Recommendations of the Advisory Committee on Neonatal Infections Sociedad Chilena de Infectología”. *Revista Chilena De Infectología* 33 (2), 191-216. <https://doi.org/10.4067/S0716-10182016000200010>.
- COLE, L.** 2010. “Biological functions of hCG-related molecules.” *Reproductive Biology and Endocrinology* 8, 102. <https://doi.org/10.1186/1477-7827-8-102>.
- CRONIER, L.; HERVE, J.C.; DELEZE, J.; MALASSINE, A.** 1997. “Regulation of Gap Junctional Communication During Human Trophoblast Differentiation”. *Microscopy Research and Technique* 38, 21–28.
- DALY, M.; O'DRISCOLL, L.** 2017. “Chapter 5 MicroRNA Profiling of Exosomes”. En Rani, S. (Editor), *MicroRNA Profiling* (pp. 37-46). New Jersey: Humana Press. <https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6524-3>.
- DE SOUZA, W.** 2002. “Basic Cell Biology of *Trypanosoma cruzi*”. *Current Pharmaceutical Design* 8, 269 – 285.
- DONKER, R. B.; MOUILLET, J. F.; CHU, T.; HUBEL, C.A.; STOLZ, D.B.; MORELLI, A.E.; SADOVSKY, Y.** 2012. “The Expression Profile of C19MC MicroRNAs in Primary Human Trophoblast Cells and Exosomes”. *Molecular Human Reproduction* 18 (8), 417–424. <https://doi.org/10.1093/molehr/gas013>.
- DREWLO, S.; BACZYK, D.; DUNK, C.; KINGDOM, J.** 2008. “Fusion assays and models for the trophoblast”. *Methods in Molecular Biology* 475, 363-382.
- DROGUETT, D.; CARRILLO I.; CASTILLO, C.; GÓMEZ, F.; NEGRETE, M.; LIEMPI, A.; MUÑOZ, L.; GALANTI, N.; MAYA, JD; KEMMERLING, U.** 2017. “*Trypanosoma cruzi* induces cellular proliferation in the trophoblastic cell line BeWo”. *Experimental Parasitology* 173, 9-17. 10.1016/j.exppara.2016.12.005.
- DUASO, J.; ROJO, G.; CABRERA, G.; GALANTI, N.; BOSCO, C.; MAYA, J.D.; MORELLO, A.; KEMMERLING, U.** 2010. “*Trypanosoma cruzi* induces tissue

disorganization and destruction of chorionic villi in an ex vivo infection model of human placenta”. *Placenta* 31 (8), 705-711. <https://doi.org/10.1016/j.placenta.2010.05.007>.

FRANZÉN, O.; RNAER, E.; FERELLA, M.; NILSSON, D.; RESPUELA, P.; CRNAINCI, P.; HAYASHIZAKI, Y.; ÅSLUND, L.; ANDERSSON, B.; DAUB, C.O. 2011. “The Short Non-Coding Transcriptome of the Protozoan Parasite *Trypanosoma cruzi*”. *PLoS Neglected Tropical Diseases* 5 (8). <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0001283>.

HANDSCHUH, K.; GUIBOURDENCHE, J.; TSATSARIS, V.; GUESNON, M.; LAURENDEAU, I.; EVAIN-BRION, D.; FOURNIER, T. 2007. “Human Chorionic Gonadotropin Produced by the Invasive Trophoblast but not the Villous Trophoblast Promotes Cell Invasion and is Down-Regulated by Peroxisome Proliferator-Activated Receptor-Gamma”. *Endocrinology*, 148(10), 5011–9.

HA, M.; KIM, V. 2014. “Regulation of microRNA biogenesis”. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 15, 509–524. <https://doi.org/10.1038/nrm3838>.

HAYDER, H.; O'BRIEN, J.; NADEEM, U.; PENG, C. 2018. “MicroRNAs: Crucial Regulators of Placental Development”. *Reproduction* 155 (6). <https://doi.org/10.1530/REP-17-0603>.

HOWARD, E.J.; XION, X.; CARLIER, Y.; SOSA-ESTANI, S.; BUEKENS, P. 2013. “Frequency of the congenital transmission of *Trypanosoma cruzi*: a systematic review and meta-analysis”. *BJOG* 121(1), 22–33. <https://doi.org/10.1111/1471-0528.12396>.

HROMADNIKOVA, I.; KOTLABOVA, K.; ONDRACKOVA, M.; PIRKOVA, P.; KESTLEROVA, A.; NOVOTNA, V.; HYMPANOVA, L.; KROFTA, L. 2015. “Expression Profile of C19MC MicroRNAs in Placental Tissue in Pregnancy-Related Complications”. *DNA and Cell Biology* 34 (6), 437-457. <https://doi.org/10.1089/dna.2014.2687>.

HUPPERTZ, B.; GAUSTER, M. 2011. “Trophoblast fusion”. *Advances in experimental medicine and biology* 713, 81–95. https://doi.org/10.1007/978-94-007-0763-4_6.

ITO, M.; SFERRUZZI-PERRI, A.; EDWARDS, C.; ADALSTEINSSON, B.; ALLEN, S.; LOO, T-H.; KITAZAWA, M.; KANEKO, T.; ISHINO, F.; STEWART, C.; FERGUSON-SMITH, A. 2015. “A Trans-Homologue Interaction between Reciprocally Imprinted MiR-127 and Rtl1 Regulates Placenta Development”. *Development* 142 (14), 2425-2430. <https://doi.org/10.1242/dev.121996>.

KASPER, C.A.; SORG, I.; SCHMUTZ, C.; TSCHON, T.; WISCHNEWSKI, H.; KIM, M.L.; ARRIEUMERLOU, C. 2010. “Cell-Cell Propagation of NF-κB Transcription Factor and MAP Kinase Activation Amplifies Innate Immunity against Bacterial Infection”. *Immunity* 33, 804–816. <https://doi.org/10.1016/J.IMMUNI.2010.10.015>.

KEMMERLING, U.; BOSCO, C.; GALANTI, N. 2010. “Infection and Invasion Mechanisms of *Trypanosoma cruzi* in the Congenital Transmission of Chagas' Disease: A Proposal”. *Biological Research* 43(3), 307–316.

- KEMMERLING, U.; OSUNA, A.; SCHIJMAN, A.G.; TRUYENS, C.** 2019. “Congenital Transmission of *Trypanosoma cruzi*: A Review about the Interactions between the Parasite, the Placenta, the Maternal and the Fetal/Neonatal Immune Responses”. *Frontiers in Microbiology* 10, 1–15. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01854>.
- KIM, M.; ASHIDA, H.; OGAWA, M.; YOSHIKAWA, Y.; MIMURO, H.; SASAKAWA, C.** 2010. “Bacterial interactions with the host epithelium”. *Cell Host Microbe* 8(1), 20–35.
- KREDO-RUSSO S, HORNSTEIN E.** 2011. “MicroRNA knock down by cholesterol-conjugated antisense oligos in mouse organ culture”. *Methods in Molecular Biology* 732, 89-97. 10.1007/978-1-61779-083-6_7. PMID: 21431707.
- LIEMPI, A.; CASTILLO, C.; CARRILLO, I.; MUÑOZ, L.; DROGUETT, D.; GALANTI, N.; MAYA, J.D.; KEMMERLING, U.** 2016. “A Local Innate Immune Response against *Trypanosoma cruzi* in the Human Placenta: The Epithelial Turnover of the Trophoblast”. *Microbial Pathogenesis* 99, 123–129. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2016.08.022>.
- LIEMPI, A.; CASTILLO, C.; DUASO, J.; DROGUETT, D.; SANDOVAL, A.; BARAHONA, K.; HERNÁNDEZ, A.; GALANTI, N.; MAYA, J.D.; KEMMERLING, U.** 2014. “*Trypanosoma cruzi* Induces Trophoblast Differentiation: A Potential Local Antiparasitic Mechanism of the Human Placenta?”. *Placenta* 35 (12), 1035–1042. <https://doi.org/10.1016/j.placenta.2014.09.017>.
- LUO, S.; ISHIBASHI, O.; ISHIKAWA, G.; ISHIKAWA, T.; KATAYAMA, A.; MISHIMA, T.; TAKIZAWA, T.; SHIGIHARA, T.; GOTO, T.; IZUMI, A.; OHKUCHI, A.; MATSUBARA, S.; TAKESHITA, T.; TAKIZAWA, T.** 2009. “Human Villous Trophoblasts Express and Secrete Placenta-Specific MicroRNAs into Maternal Circulation via Exosomes”. *Biology of Reproduction* 81 (4), 717-729. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.108.075481>.
- MALASSINÉ, A. AND CRONIER, L.** 2002. “Hormones and Human Trophoblast Differentiation: A Review”. *Endocrine* 19(1), 3–11.
- MAYHEW, T. M.** 2014. “Turnover of Human Villous Trophoblast in Normal Pregnancy: What Do We Know and What Do We Need to Know?”. *Placenta* 35 (4), 229–240. <https://doi.org/10.1016/j.placenta.2014.01.011>.
- MEDINA, L.; CASTILLO, C.; LIEMPI, A.; GUERRERO-MUÑOZ, G.; ROJAS-PIRELA, M.; MAYA, J.; PRIETO, H.; KEMMERLING, U.** 2020. “*Trypanosoma Cruzi* and *Toxoplasma Gondii* Induce a Differential MicroRNA Profile in Human Placental Explants”. *Frontiers in Immunology* 11.
- MORALES-PRIETO, D. M.; OSPINA-PRIETO, E.; CHAIWANGYEN, W.; SCHOENLEBEN, M.; MARKERT, U.R.** 2013. “Pregnancy-Associated MiRNA-Clusters”. *Journal of Reproductive Immunology* 97 (1), 51–61. <https://doi.org/10.1016/j.jri.2012.11.001>.

- MUÑOZ-SARAVIA, S. .; HABERLAND, A.; WALLUKAT, G.; SCHIMKE, I.** 2012. “Chronic Chagas’ heart disease: a disease on its way to becoming a worldwide health problem: epidemiology, etiopathology, treatment, pathogenesis and laboratory medicine”. *Heart Failure Reviews* 17(1), 45-64.
- MOUILLET, J.; OUYANG, Y.; COYNE, C.; SADOVSKY, Y.** 2015. “MicroRNAs in placental health and disease”. *American Journal of Obstetrics and Gynecology* 213, 163–172. <https://doi.org/10.1016/j.ajog.2015.05.057>.
- NAVARRO.; CUNHA, I.; MORAES, F.; NAKAYA, H.I.; BARON, M.A.; VILAR-PEREIRA, G.; PEREIRA, I.R.; GONÇALVES S, A.M.** 2015. “MicroRNA Transcriptome Profiling in Heart of *Trypanosoma cruzi*-Infected Mice: Parasitological and Cardiological Outcomes”. *PLoS Neglected Tropical Diseases* 9 (6), 1–17. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0003828>.
- O’BRIEN, J.; HAYDER, H.; ZAYED, Y.; PENG, C.** 2018. “Overview of MicroRNA Biogenesis, Mechanisms of Actions, and Circulation”. *Frontiers in Endocrinology* 9, 1–12. <https://doi.org/10.3389/fendo.2018.00402>.
- PARKER, E.; SETHI, A.** 2011. “Chagas disease: coming to a place near you”. *Dermatologic Clinics*. 29(1), 53-62.
- PÉREZ-MOLINA, J.A.; MOLINA, I.;** 2018. “Chagas Disease”. *The Lancet* 391(10115), 82–94. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(17\)31612-4](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(17)31612-4).
- PFAFFL, M.** 2001. “A New Mathematical Model for Relative Quantification in Real-Time RT-PCR”. *Nucleic Acids Research* 29 (9), e45. <https://doi.org/10.1093/nar/29.9.e45>.
- PRATA, A.** 2001. “Clinical and Epidemiological Aspects of Chagas Disease”. *The Lancet*. (2), 92-100. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(01\)00065-2](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(01)00065-2).
- PUNUKOLLU, G.; GOWDA, R.; KHAN, I .; NAVARRO, V.; VASAVADA, B.** 2007. “Clinical aspects of the Chagas' heart disease”. *International Journal of Cardiology* 115, 279-283. 10.1016/j.ijcard.2006.03.004.
- RASSI, A.; RASSI A.; MARIN-NETO J.** 2010. “Chagas Disease”. *Lancet* 375 (9723), 1388-1402. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(10\)60061-X](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(10)60061-X).
- REBUSTINI, I.T.,** 2017. “A Functional MicroRNA Screening Method for Organ Morphogenesis”. *Current Protocols in Cell Biology* 74, 19.19.1-19.19.17. <https://doi.org/10.1002/CPCB.15>.
- SADOVSKY, Y.; MOUILLET, J.F.; OUYANG, Y.; BAYER, A.; COYNE, C.B.** 2015. “The Function of Trophomirs and Other Micrornas in the Human Placenta”. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine* 5 (8), 1–16. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a023036>.
- SAVAGE, D.C.; SIEGEL, J.E.; SNELLEN, J.E; WHITT, D.D.** 1981. “Transit Time of Epithelial Cells in the Small Intestines of Germree Mice and Ex-Germree Mice Associated with Indigenous Microorganisms”. *Applied and Environmental*

Microbiology 42(4), 996-1001.

- TYLER, K.M. AND ENGMAN, D.M.** 2001. “The Life Cycle of *Trypanosoma cruzi* Revisited”. *International Journal for Parasitology*. 31(5-6), 472–481.
- VELU, C.; GRIMES, H.** 2012. “Utilizing antagomiR (antisense microRNA) to knock down microRNA in murine bone marrow cells”. *Methods in Molecular Biology* 928, 185-195. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4025929/pdf/nihms577606.pdf>.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION.** 2015. “Chagas disease in latin America: an epidemiological update based on 2010 estimates”. *Weekly Epidemiological Record* 90(06), 33-44.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION.** 2015. “Investing to overcome the global impact of neglected tropical diseases: third WHO report on neglected diseases”. <https://apps.who.int/iris/handle/10665/152781>.
- YOSHIDA, N.** 2006. “Molecular Basis of Mammalian Cell Invasion by *Trypanosoma cruzi*”. *Anais da Academia Brasileira de Ciências* 78(1), 87–111.
- YU, C.; SHEN, K.; LIN, M.; CHEN, P.; LIN, C.; CHANG, G.; CHEN, H.;** 2002. “GCMa Regulates the Syncytin-Mediated Trophoblastic Fusion”. *The Journal of Biological Chemistry* 277 (51), 50062-50068. <https://doi.org/10.1074/jbc.M209316200>.
- ZHANG.; CHENG, Y.; XU, Z.; ZHANG, T.F.; WANG, Y.L.;** 2015. “Circulating MicroRNAs as Diagnostic and Prognostic Tools for Hepatocellular Carcinoma”. *World Journal of Gastroenterology* 21 (34), 9853–9862. <https://doi.org/10.3748/wjg.v21.i34.9853>.
- Zhang, M.; Muralimanoharan, S.; Wortman, A.C.; Mendelson, C.R.** 2016. “Primate-specific miR-515 family members inhibit key genes in human trophoblast differentiation and are upregulated in preeclampsia”. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 113, E7069–E7076. <https://doi.org/10.1073/pnas.1607849113>.
- Zheng, Y.; Cai, X.; Bradley, J.E.** 2013. “MicroRNAs in parasites and parasite infection”. *RNA Biology* 10, 377–385. <https://doi.org/10.4161/rna.23716>.
- ZINGALES, B.** 2018. “*Trypanosoma cruzi* genetic diversity: Something new for something known about Chagas disease manifestations, serodiagnosis and drug sensitivity”. *Acta Tropica* 184, 38-52. <https://doi:10.1016/j.actatropica.2017.09.017>.

ANEXOS

Anexo 1



Unidad de Prevención de Riesgos & Bioseguridad

Santiago, 04 de Marzo 2019.-

Señores
Fondecyt Regular 2019
PRESENTE

Estimados señores:

La Unidad de Prevención de Riesgos & Bioseguridad, Facultad de Medicina, Universidad de Chile certifica que ha recibido del investigador responsable Dra. Ulrike Kemmerling para su estudio el proyecto titulado **"Mechanism of Congenital Chagas disease: Effective placental Trypanosoma cruzi infection depends on specific host-derived microRNAs"** Laboratorio de Mecanismos de Infección parasitaria, Programa de Anatomía y Biología del Desarrollo, Instituto de Ciencias Biomédicas (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 1ra edición, 1994" y " Manual de Normas de Bioseguridad, 2da edición 2008, Centro de Control y Prevención de Enfermedades, CDC, 4º 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 Dra. Ulrike Kemmerling, 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: Dra. Ulrike Kemmerling



Doctor Rómulo Fuentes Flores
Director de Investigación y Tecnología

- C.c.
- Decano, Dr. Manuel Kukuljan
 - Investigador responsable, Dra. Ulrike Kemmerling
 - Archivo

Anexo 2



Dirección
Comité de Ética de la Investigación del
Servicio de Salud Metropolitano Norte

CARTA AE N°010/2019
Dr. JJS/lcc

Santiago, abril 15 de 2019

Dra. Ulrike Kemmerling
Investigadora Principal
Instituto de Ciencias Biomédicas
Facultad de Medicina
Universidad de Chile
Presente

Ref.: Proyecto de Investigación FONDECYT Regular 1190341: "Mechanism of Congenital Chagas disease: Effective placental Trypanosoma cruzi Ainfecction depends on specific host-derived microRNAs" (Mecanismos de enfermedad de chagas congénita: La infección placentaria efectiva por Tryjpanosoma cruzi depende de microRNAs específicos del hospedero).

Estimada Dra. Kemmerling:

Acuso recibo acuso de su carta de fecha 26 de marzo de 2019 por la cual solicita autorización para realizar el estudio de la referencia.

No encontrándose objeciones, se procede a dar Aprobación Ejecutiva al proyecto de la referencia.

Esta aprobación quedará registrada en el Acta de la próxima sesión ordinaria de este Comité.

Sírvase recibir adjunto documento de Consentimiento Informado timbrado, fechado y firmado por el suscrito.

La saluda atentamente,

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

DR. JUAN JORGE SILVA SOLÍS
PRESIDENTE - CEI-SSMN

Calle San José, 1053,
Independencia, Santiago, Chile
lorena.carrasco@redsalud.gov.cl
Fono (56-2) 2575 8506
www.ssmn.cl