



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

**Rol de exovesículas de tripomastigotes en la infección por *Trypanosoma cruzi* en células BeWo y explantes de placenta humana**

**Bielca Alejandra María Oviedo Bernal**

Proyecto de 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, Universidad de Chile

FONDECYT 1220105

SANTIAGO, CHILE  
2023



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

**Rol de exovesículas de tripomastigotes en la susceptibilidad a la infección por *Trypanosoma cruzi* en células BeWo y explantes de placenta humana**

**Bielca Alejandra María Oviedo Bernal**

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

NOTA FINAL: .....

	Nota	Firma
Profesora guía: Ulrike Kemmerling	.....	.....
Profesor corrector: Fernando Fredes	.....	.....
Profesora correctora: Galia Ramírez	.....	.....

## **AGRADECIMIENTOS**

Agradezco profundamente a mi amada abuela Blanca, quien desde pequeña siempre me inspiró a perseguir lo que me apasiona, por demostrarme que no existían obstáculos que no pudiese superar, por creer en mí y enseñarme hasta el día de hoy que soy capaz de todo. También agradezco a mi pareja, Luis Felipe, por brindarme el espacio y la contención que necesité durante estos largos años de estudio.

Quiero agradecer a mi profesora guía, Dra. Ulrike Kemmerling, por darme motivación y seguridad cuando dudé de mí misma, por su enorme nobleza y paciencia. También agradezco a cada miembro del laboratorio por el apoyo y sabiduría que me brindaron en esta importante etapa de mi vida.

## ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS .....	2
RESUMEN .....	6
ABSTRACT .....	7
INTRODUCCIÓN.....	8
REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	9
<i>Trypanosoma cruzi</i> .....	9
Ciclo biológico de <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	9
Enfermedad de Chagas .....	10
Enfermedad de Chagas congénita.....	12
La placenta humana .....	13
Interacción entre la placenta y <i>T. cruzi</i> .....	13
Vesículas extracelulares.....	14
Tryp-TcEVs y su posible rol en el daño tisular y remodelación de la placenta.....	15
HIPÓTESIS .....	17
OBJETIVO GENERAL.....	17
OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	17
MATERIALES Y MÉTODOS.....	18
A) Metodología asociada a todos los objetivos .....	18
1) Obtención y cultivo de HPE .....	18
2) Cultivo de células BeWo .....	18
3) Obtención de tripomastigotes de <i>T. cruzi</i> .....	18
4) Obtención y tratamientos de Tryp-TcEVs.....	19
5) Ensayo de actividad enzimática.....	19
6) Análisis Estadístico .....	19
7) Bioseguridad.....	20
8) Ética.....	20
B) Metodología asociada al objetivo específico 1 .....	20
1) Infección de células BeWo y HPE .....	20
2) Carga de DNA del parásito.....	20
3) Cuantificación de células infectadas y parásitos intracelulares en células BeWo...	21
C) Metodología asociada al objetivo específico 2 .....	21
1) Infección de HPE.....	21
2) Análisis histopatológico e histoquímico de HPE .....	21
3) Análisis inmunohistoquímico de HPE.....	22
RESULTADOS .....	23
Las exovesículas de tripomastigotes de <i>T. cruzi</i> aumentan la infección parasitaria en células BeWo .....	23
Las exovesículas de tripomastigotes de <i>T. cruzi</i> aumentan la carga de DNA parasitario en HPE .....	26

Las Tryp-TcEVs inducen daño tisular <i>per se</i> en explantes de placenta humana.....	27
DISCUSIÓN .....	33
CONCLUSIÓN.....	36
BIBLIOGRAFÍA .....	37
ANEXOS .....	42
Anexo 1 .....	42
Anexo 2.....	43

## ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1 .....	23
FIGURA 2 .....	25
FIGURA 3 .....	26
FIGURA 4 .....	28
FIGURA 5 .....	29
FIGURA 6 .....	30
FIGURA 7 .....	31
FIGURA 8 .....	32

## RESUMEN

La enfermedad de Chagas es causada por el protozoo *Trypanosoma cruzi* y es endémica en Latinoamérica. La transmisión congénita de *T. cruzi* es epidemiológicamente relevante, aunque se reportan bajas tasas. Para que la infección congénita suceda, el parásito debe cruzar la barrera placentaria, y para esto depende de una serie de factores de virulencia que le otorgan distintos mecanismos de infectividad. Interesantemente, gran parte de estas moléculas son secretadas a través de vesículas extracelulares. Se ha descrito que las exovesículas de *T. cruzi* (TcEVs) aumentan la infectividad del parásito, lo que se comprueba en esta memoria en células BeWo y explantes de placenta humana (HPE). En la infección *ex vivo* de HPE, se ha observado que *T. cruzi* induce desprendimiento y destrucción del trofoblasto, destrucción selectiva de la membrana basal como también desorganización del colágeno tipo I y se ha propuesto que el daño tisular en HPE podría verse aumentado por las TcEVs. En la presente memoria de título hemos demostrado que las TcEVs inducen daño tisular *per se* en explantes de placenta humana. Finalmente, se concluye que la infección del parásito en células BeWo y en explantes de placenta está mediada, al menos parcialmente, por las exovesículas de tripomastigotes de *T. cruzi*.

**Palabras Claves:** *Trypanosoma cruzi*, placenta humana, transmisión congénita, factores de virulencia, exovesículas.

## ABSTRACT

Chagas disease, endemic in Latin America, is caused by the protozoan *Trypanosoma cruzi*. The congenital transmission of *T. cruzi* is epidemiologically relevant, although low rates are reported. The parasite must cross the placental barrier for congenital infection, which depends on various virulence factors responsible for different infectivity mechanisms. Interestingly, most of these molecules are secreted through extracellular vesicles. It has been described that *T. cruzi* exovesicles (TcEVs) increase the parasite's infectivity, verified in the present thesis in BeWo cells and human placental explants (HPE). In *ex vivo* infection of HPE, *T. cruzi* has been observed to induce trophoblast detachment and destruction, selective basement membrane destruction, as well as collagen type I disruption. Thus, it has been proposed that TcEVs, increase the parasite-induced tissue damage in HPE. Herein we have shown that TcEVs induce tissue damage *per se* in the human placenta. Finally, we conclude that the parasite infection in BeWo cells and human placental explants is mediated, at least partially, by *T. cruzi* exovesicles.

**Key words:** *Trypanosoma cruzi*, human placenta, congenital transmission, virulence factors, exovesicles.

## INTRODUCCIÓN

La enfermedad de Chagas (CD), también conocida como Tripanosomiasis Americana, corresponde a una parasitosis zoonótica que afecta a la mayoría de las especies mamíferas (incluyendo al humano), causada por el agente protozoario *Trypanosoma cruzi*. Para esta enfermedad existen distintas vías de transmisión que incluyen la transmisión vectorial, la transfusión sanguínea, trasplante de órganos, transmisión oral, los accidentes de laboratorio y la transmisión congénita (Rassi *et al.*, 2012). Así también, se considera que esta parasitosis es endémica en Latinoamérica, sin embargo, debido a la migración humana y la transmisión congénita, se ha extendido a otros continentes como Europa, Asia, Oceanía y distintos estados de América del Norte en que la enfermedad no estaba descrita (Kemmerling *et al.*, 2019; Carlier *et al.*, 2020).

Durante la transmisión congénita, *T. cruzi* atraviesa la barrera placentaria para alcanzar al feto, estableciéndose interacciones complejas entre el parásito y su hospedero. Así, la probabilidad de éxito de la infección depende de factores placentarios, del sistema inmune materno y fetal en desarrollo, así como también de factores propios del parásito (Kemmerling *et al.*, 2019).

*Trypanosoma cruzi* posee una amplia variedad de factores de virulencia que le permiten reproducirse y evadir eficazmente las defensas del hospedero y generar daño o morbilidad en el individuo afectado. La virulencia del parásito es conferida por proteínas secretadas o de superficie específicas que interactúan con receptores de las células hospederas, lo que facilita la entrada y la replicación del parásito. Se ha descrito que gran cantidad de estos factores de virulencia se secretan en vesículas extracelulares, las que se consideran factores críticos durante las interacciones hospedero-patógeno (Jiménez *et al.*, 2018).

En esta memoria de título se propuso estudiar y comprender las interacciones hospedero-patógeno entre *T. cruzi* y la placenta humana, particularmente el rol de exovesículas parasitarias en la infección de células y tejido placentario. Es importante destacar que las exovesículas derivadas de tripomastigotes del parásito podrían usarse en el futuro como herramientas de diagnóstico, pronóstico y tratamiento para la enfermedad de Chagas congénita.

## REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

### *Trypanosoma cruzi*

*Trypanosoma cruzi* es un protozoo hemoflagelado perteneciente al orden Kinetoplastidae y es el agente causal de la CD. El parásito presenta un ciclo de vida indirecto donde participa un insecto hematófago como vector biológico y un mamífero como hospedador definitivo (W.H.O., 2010). Existen múltiples cepas y clones de *T. cruzi* que se clasifican en siete unidades de tipificación discreta (DTU por sus siglas en inglés) que van desde *T. cruzi* I hasta *T. cruzi* VI y *T. cruzi* Bat según sus diferencias genéticas, biológicas y bioquímicas. El tipo de cepa y clones se asocian con la virulencia y tropismo tisular (Juiz *et al.*, 2017; Zingales, 2018; Kemmerling *et al.*, 2019; Medina *et al.*, 2022).

### **Ciclo biológico de *Trypanosoma cruzi***

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

**Tripomastigote:** El tripomastigote representa el estado extracelular infectante no replicativo del parásito, se caracteriza por ser fusiforme, medir unos 20  $\mu\text{m}$  de largo y 2  $\mu\text{m}$  de diámetro, presentar un kinetoplasto anterior al núcleo. Los tripomastigotes se encuentran en: (a) el sistema circulatorio de los hospederos mamíferos, (b) en el intestino posterior y deyecciones de los triatomíneos (De Souza, 2002; Yoshida, 2006).

**Epimastigote:** El epimastigote es también fusiforme, mide unos 20 – 40  $\mu\text{m}$  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 triatómino donde se multiplica, para luego diferenciarse a tripomastigote metacíclico infectante en el intestino posterior del mismo (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 (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, éstos a medida que avanzan por el lumen intestinal, se replican y luego se diferencian a tripomastigotes metacíclicos que son altamente infectivos. Al momento de alimentarse de la sangre, el insecto 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 metacíclicos son fagocitados por células presentadoras de antígenos (principalmente macrófagos), pero pueden infectar cualquier otra célula nucleada, diferenciándose intracelularmente a amastigotes. Tras cierto número de divisiones, los amastigotes se transforman a tripomastigotes, lisan las células infectadas, ingresan a la circulación e infectan a distintos tejidos blanco, como miocardio, músculo esquelético, músculo liso visceral y glía del sistema nervioso central (Kemmerling *et al.*, 2010; Zuma *et al.*, 2020) y en caso de preñez, la placenta (Kemmerling *et al.*, 2019). 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 su ciclo biológico (Rassi y Marin-Neto, 2010).

### **Enfermedad de Chagas**

La enfermedad de Chagas es una infección zoonótica potencialmente mortal y es considerada, según la Organización Mundial de la Salud, como una enfermedad tropical desatendida, ya que afecta a personas de condiciones socioeconómicas desaventajadas con dificultades de acceso a tratamientos y seguimiento (WHO, 2010). Además de la transmisión vectorial, existen otras vías de transmisión de la enfermedad, que incluye la vía hematogena a través de transfusiones sanguíneas o trasplante de órganos, la vía oral por consumo de agua o alimentos contaminados con tripomastigotes y la vía congénita (Pérez-Molina y Molina 2018; Kemmerling *et al.*, 2019).

La CD 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 y una duración de 2 a 3 meses. Los casos sintomáticos presentan manifestaciones de infección generalizada inespecífica. Sin tratamiento, el 2-12% de los infectados fallecen por miocardiopatía aguda, asociada o no a compromiso meningoencefálico (en su mayoría en niños menores de tres años) y, raramente, por muerte súbita (Carlier *et al.*, 2020). La CD 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, 2010).

La respuesta inmune permite la eliminación de la mayoría, pero no de todos los parásitos; en consecuencia, el individuo entra en la fase crónica y permanece infectado de por vida. El 60-70% de los pacientes no presentan síntomas clínicos evidentes y tampoco se detecta la presencia de parásitos circulantes. 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 (Rassi y Marin-Neto, 2010; Muñoz-Saravia *et al.*, 2012). A esta etapa también se la denomina fase indeterminada, la cual puede permanecer durante meses a décadas. El 30-40% de los pacientes crónicos desarrolla sintomatología, la cual puede aparecer incluso 10 a 30 años post-infección. La mayoría de los pacientes sintomáticos presentan compromiso cardíaco con síntomas y signos derivados de una falla cardíaca conocida como cardiomiopatía chagásica crónica. Por otra parte, hay pacientes que desarrollan enfermedades digestivas, principalmente megaesófago y megacolon, y alteraciones en el sistema nervioso periférico (Rassi *et al.*, 2010; Muñoz-Saravia *et al.*, 2012).

Importantemente, la CD puede causar discapacidad de por vida. Adicionalmente y en relación a la terapia, la eficacia del Benznidazol y el Nifurtimox, dos fármacos tripanocidas empleados actualmente en el tratamiento de la CD, está lejos de ser óptima para los pacientes con infección crónica. Además, ambos fármacos presentan efectos secundarios adversos graves y son teratogénicos (Rojo *et al.*, 2014; Veas *et al.*, 2020).

La CD es endémica en 21 países de América Latina, donde actualmente se infectan alrededor de 7 millones de personas y se registran anualmente de 10.000 a 15.000 muertes (WHO, 2010). Debido a la migración humana y, principalmente, a la transmisión congénita, la CD se ha extendido a otros continentes, convirtiéndose en un problema de salud mundial (Kemmerling *et al.*, 2019; Carlier *et al.*, 2020).

### **Enfermedad de Chagas congénita**

La transmisión congénita de la CD ocurre aproximadamente en un 5% de las mujeres chagásicas embarazadas (Kemmerling *et al.*, 2019; Carlier *et al.*, 2020). Así, en las regiones endémicas de Chile, las tasas de transmisión congénita del parásito varían entre 4,7-8,4% (Jercic *et al.*, 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 (Carlier *et al.*, 2020).

La Enfermedad de Chagas congénita (CCD) se considera una infección parasitaria aguda; y alrededor del 60% de los recién nacidos infectados son asintomáticos. Importantemente, la CCD puede ser tratada eficientemente con terapia antiparasitaria durante el primer año de vida. 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 casos asintomáticos, la infección con *T. cruzi* puede causar placentitis, parto prematuro, aborto, bajo peso al nacer y bajo score Apgar en comparación a recién nacidos no contagiados. Por otro lado, los casos sintomáticos pueden llevar rápidamente a la muerte (Liempi *et al.*, 2016; Kemmerling *et al.*, 2019; Carlier *et al.*, 2020).

La transmisión congénita ocurre principalmente vía placentaria, en la cual el parásito debe atravesar la barrera placentaria para alcanzar al feto (Liempi *et al.*, 2016). Así, 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 esta última, la menos estudiada.

## **La placenta humana**

La placenta corresponde a un anexo embrionario transitorio que se forma de tejidos de origen materno y fetal. Este órgano participa en el mantenimiento del embarazo, permitiendo el intercambio de gases y nutrientes, así como la síntesis de hormonas necesarias para llevar a cabo una gestación exitosa (Liempi *et al.*, 2016; Kemmerling *et al.*, 2019). Además, la placenta es considerada un órgano mediador inmunológico crítico durante el embarazo, protegiendo al feto contra distintos patógenos (Kemmerling *et al.*, 2019).

La placenta humana es clasificada como hemocorial vellosa, lo que implica un íntimo contacto entre los tejidos fetales y la sangre materna. Su unidad morfofuncional es la vellosidad coriónica libre, en la cual se encuentra la barrera placentaria donde se definen dos líneas principales de defensa. La primera línea de defensa placentaria es el trofoblasto, un epitelio de revestimiento bi-estratificado, que se encuentra en contacto directo con la sangre materna, formado por el sincitiotrofoblasto (privado de uniones intercelulares) y una capa interna proliferativa y germinativa denominada citotrofoblasto (Carlier *et al.*, 2020). El recambio epitelial (Liempi *et al.*, 2016; Kemmerling *et al.*, 2019) y la secreción de citoquinas proinflamatorias (Kemmerling *et al.*, 2017) son parte de sus mecanismos de defensa. La segunda línea de defensa continúa con el estroma vellositario, un tipo de tejido conectivo fetal que contiene fibroblastos, macrófagos y capilares fetales, que está separado del trofoblasto por una membrana basal. La membrana basal y el estroma vellosito están formados por una matriz extracelular (MEC), una compleja red tridimensional compuesta por diferentes macromoléculas que incluyen fibras colágenas y elásticas, proteoglucanos, glucosaminoglucanos y glicoproteínas, dentro de las que predomina las glicoproteínas fibronectina y laminina, así como fibras de colágeno tipo I (Kemmerling *et al.*, 2019). Importantemente, dichos componentes le otorgan estructura, sostén y estabilización a todo el sistema de células y matriz en la vellosidad coriónica (Carlier *et al.*, 2020). Para que cualquier agente patógeno que llega por vía sanguínea se pueda establecer en el feto, éstos deben atravesar la barrera placentaria (Liempi *et al.*, 2016).

## **Interacción entre la placenta y *T. cruzi***

La existencia de la CD demuestra que *T. cruzi* es capaz de cruzar la barrera placentaria. En explantes de placenta humana (HPE) (Duaso *et al.*, 2010; Rojo *et al.*, 2014) y en placentas

de mujeres con CD crónica (Duaso *et al.*, 2012), se ha observado que el parásito induce desprendimiento y destrucción del trofoblasto, destrucción selectiva de la membrana basal (incluyendo colágeno tipo IV, laminina y fibronectina) como también desorganización del colágeno tipo I en el tejido conectivo fetal del estroma vellositario (Duaso *et al.*, 2010; Kemmerling *et al.*, 2010).

Todo esto es posible debido a que el parásito posee una amplia variedad de factores de virulencia que están involucrados en la adhesión celular, la invasión celular y tisular, la resistencia al daño oxidativo, la evasión de la respuesta inmune, entre otras funciones (Jiménez *et al.*, 2018). Interesantemente, una gran cantidad de estos factores de virulencia son liberados mediante vesículas extracelulares (EVs) (Rossi *et al.*, 2021).

### **Vesículas extracelulares**

Las EVs son un diverso grupo de estructuras membranosas liberadas por cualquier tipo de célula procarionte o eucarionte, que encapsulan diferentes biomoléculas, tales como proteínas, ácidos nucleicos, lípidos y metabolitos (Moreira *et al.*, 2021). Estas cumplen un importante rol en las interacciones intercelulares; protegen su carga biomolecular contra enzimas extracelulares o ambientes acuosos y permiten la secreción y transferencia de componentes lipofílicos e hidrofóbicos (Gill *et al.*, 2019). Además, están involucradas tanto en condiciones fisiológicas como patológicas, incluyendo enfermedades neoplásicas e infecciones (Moreira *et al.*, 2019).

Las EVs se clasifican según su tamaño y biogénesis en tres categorías diferentes; los exosomas (40–150 nm), microvesículas (MV) (100–1.000 nm) y cuerpos apoptóticos (500–4.000 nm). Los exosomas son de origen endocítico y se liberan al medio a través de la fusión de cuerpos multivesiculares con la membrana plasmática de la célula. Por otro lado, las MV se liberan por gemación de la membrana plasmática (De Pablos *et al.*, 2018).

Las EVs de *T. cruzi* (TcEVs) están dentro de las primeras dos categorías, exosomas y MV, con un tamaño de 90-150nm (De Pablos *et al.*, 2018). Es importante señalar que no se han identificado cuerpos apoptóticos derivados del parásito (De Pablos *et al.*, 2016; De Souza y Barrias, 2020). La muerte celular programada, incluida la apoptosis y la autofagia, está presente en los tripanosomátidos. Aun así, estos organismos carecen del conjunto completo

de efectores involucrados en las vías de muerte celular o aún no se han descifrado (Menna-Barreto, 2019; Das *et al.*, 2021).

Importantemente, se ha descrito que las TcEVs circulan en pacientes con CD crónica (Díaz-Lozano *et al.*, 2017) y se ha demostrado que pueden ser útiles en la evaluación de la severidad de la enfermedad y efectividad de las drogas utilizadas contra la cardiomiopatía chagásica (Moreira *et al.*, 2019).

### **Tryp-TcEVs y su posible rol en el daño tisular y remodelación de la placenta**

El análisis proteómico de la carga de TcEVs muestra que las formas de epimastigote y tripomastigote presentan 345 y 265 proteínas, respectivamente; sólo el 35,8% de la composición proteica de las EVs es específica de cada forma celular (29,5% específica de epimastigote y 6,44 % específica de tripomastigote). Es importante destacar que los factores de virulencia del parásito están presentes principalmente en TcEVs derivadas de la forma infectiva del parásito, los tripomastigotes (Tryp-TcEVs) (De Pablos *et al.*, 2018).

Dentro de los factores de virulencia presentes en los Tryp-TcEVs se destacan proteínas inmunodominantes fundamentales para la adhesión e invasión de células y tejidos, todos relevantes durante la patogénesis de la CD (Díaz-Lozano *et al.*, 2017; Zuma *et al.*, 2020).

Uno de los factores de virulencia más importantes son las transialidasas, que permiten la sialilación de las membranas glicoconjugadas de *T. cruzi* en posiciones terminales. La presencia de ácido siálico en la superficie del parásito permite, entre otros, la modulación de la respuesta inmune del hospedero (Jiménez *et al.*, 2018). Por otra parte, el ácido siálico posee sitios de unión para laminina y fibronectina, glicoproteínas presentes en la membrana basal del trofoblasto a los cuales se une el parásito (Osorio *et al.*, 2012); además es capaz de activar proteasas endógenas del hospedero (Borges *et al.*, 2016), como las metaloproteinasas MMP 2 y 9 (Castillo *et al.*, 2012).

La cruzipaina, otro factor de virulencia, es la principal proteasa del parásito y está implicada en la invasión celular, el desarrollo intracelular y la evasión inmunitaria. Esta enzima actúa promoviendo un aumento en los niveles de calcio citoplasmático en la célula hospedera, que es esencial para el proceso de invasión. También es capaz de degradar componentes de la matriz extracelular tales como colágeno tipo I, IV, laminina y fibronectina, lo que permite la

invasión tisular. Por otra parte, se ha propuesto que participa en el desencadenamiento de la evasión de la respuesta inmune celular (Duaso *et al.*, 2010; Osorio *et al.*, 2012).

Asimismo, el parásito está recubierto por un glicocálix compuesto por glicoconjugados de tipo mucina que cumple un doble propósito; brindar protección contra el vector y/o los mecanismos de defensa derivados del hospedero y asegurar la invasión de células o tejidos específicos. Además, confiere a las Tryp-TcEVs las características de PAMPs (patrones moleculares asociados a patógenos) (Borges *et al.*, 2016). Por lo tanto, las Tryp-TcEVs son reconocidas por receptores de reconocimiento de patrones (PPR) como los TLR, modulando así la respuesta inmune innata (Osorio *et al.*, 2012; Jiménez *et al.*, 2018).

En esta memoria se estudió el posible rol de las TcEVs en dos modelos de infección parasitaria en la placenta humana que han sido ampliamente utilizados en estudios biomédicos, la línea celular de trofoblasto humano BeWo (Liempi *et al.*, 2014; Liempi *et al.*, 2015; Carrillo *et al.*, 2016; Medina *et al.*, 2018) y HPE (Rojo *et al.*, 2014; Luján *et al.*, 2016; Lowe *et al.*, 2018; Kemmerling *et al.*, 2019; Carlier *et al.*, 2020; Veas *et al.*, 2020; Pastor *et al.*, 2021). Se propone que las Tryp-TcEVs aumentan la infección parasitaria mediante la ruptura de la barrera anatómica placentaria.

## **HIPÓTESIS**

Las exovesículas derivadas de tripomastigotes de *T. cruzi* incrementan la infección parasitaria en células BeWo y en HPE. En HPE, las exovesículas aumentan la severidad del daño tisular causado por el parásito.

## **OBJETIVO GENERAL**

Estudiar el posible rol de las exovesículas derivadas de tripomastigotes de *T. cruzi* en la infección y daño tisular en la placenta humana.

## **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

1. Determinar el efecto de Tryp-TcEVs en la infección de *T. cruzi* en HPE y células BeWo.
2. Determinar el posible rol de Tryp-TcEVs en el daño de tejido inducido por *T. cruzi* en HPE.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### A. Metodología asociada a todos los objetivos del anteproyecto

- 1) **Obtención y cultivo de HPE:** Las placentas humanas se obtuvieron de embarazos a término, sin complicaciones, monogestacionales de desarrollo fetal normal, nacido por cesárea para asegurar la asepsia y la preservación de la muestra. Los criterios de exclusión fueron cualquier patología materna (incluyendo serología positiva para CD), fetal y placentaria. Se recogió la placenta en solución salina esterilizada (PBS) a 37°C y se procesó máximo 1 hora después del parto. Se desecharon sus superficies materna y fetal y se obtuvieron explantes de la parte central de los cotiledones. El tejido aislado se lavó con PBS para eliminar la sangre y se cortó en piezas de aproximadamente 0,5 cm<sup>3</sup>, las cuales se incubaron a 37°C (Fretes y Kemmerling, 2012).
- 2) **Cultivos de células BeWo:** las células BeWo (ATCC® CCL-98) fueron cultivadas en cajas de cultivo celular de 75 cm<sup>2</sup> (250 mL) con medio Dulbecco's Modified Eagle Medium F-12 (DMEM/F-12, Gibco®) suplementado con 1,2mg/mL de NaHCO<sub>3</sub>, 3,50 µg/mL de estreptomina, 50 UI/mL de penicilina y enriquecido con suero fetal bovino inactivado (SFBi) al 10%, incubadas a 37°C en un ambiente húmedo con 5% de CO<sub>2</sub>. Para realizar los experimentos, las células BeWo fueron cosechadas por tripsinización, sedimentadas y re-suspendidas en medio de cultivo fresco. El número de células necesarias para cada experimento fue determinado mediante el conteo directo en una cámara de Neubauer (Liempi *et al.*, 2015).
- 3) **Obtención de tripomastigotes de *T. cruzi*:** Los tripomastigotes infectivos de *T. cruzi* cepa Ypsilon (Y) fueron obtenidos desde cultivos de células Vero (ATCC® CCL-81) infectadas con el parásito. Las células Vero (ATCC® CCL-81) en semi-confluencia fueron infectadas con 1 a 2 mL de medio con tripomastigotes provenientes de un cultivo anterior. Luego de 4-5 días se recolectó el medio de cultivo con tripomastigotes y se centrifugó a 500 x g. 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 fueron re-suspendidos en medio RPMI (Sigma®, EE. UU.) y el número de parásitos se determinó en una cámara de Neubauer (Duaso *et al.*, 2010).

- 4) **Obtención y tratamientos de Tryp-TcEVs:** los tripomastigotes de *T. cruzi* se incubaron durante 5 horas a 37°C en medio RPMI tamponado con HEPES 25 mM a pH 7,2 y complementado con SFBi sin exovesículas al 10%. Posteriormente, se eliminaron los parásitos mediante centrifugación a 3.500 x g durante 15 minutos, y el sobrenadante se recogió y centrifugó a 17.000 x g durante 30 min a 4°C. Este sobrenadante se filtró a través de un filtro de poro de 0,22 µm (Sartorius®, Alemania) y se ultracentrifugó a 100.000 x g durante 16-18 horas para obtener los Tryp-TcEVs (principalmente exosomas). El precipitado resultante se lavó tres veces en PBS mediante ultracentrifugación y se resuspendió en 100 µL de PBS. Para inactivar los factores de virulencia del parásito, los Tryp-TcEVs se incubaron en un baño seco a 80 °C durante 45 minutos y luego se les añadió 1 µL de RNAsas y 1 µL de DNAsas. El control de calidad de las Tryp-TcEVs se realizó mediante microscopía electrónica de transmisión (TEM) y Nano Tracking Analysis (o Nanosight) (Retana *et al.*, 2019). La obtención de las Tryp-TcEVs se hizo en colaboración con el Dr. Antonio Osuna de la Universidad de Granada, España.
- 5) **Ensayo de actividad enzimática:** Para verificar la inactivación de las Tryp-TcEVs, se realizó un ensayo de actividad enzimática. Se utilizaron como controles positivos Tryp-TcEVs y un lisado de proteasa con actividad enzimática conocida. Cada mezcla de reacción contenía 20 µL de muestra y 20 µL de buffer de activación a pH 7,6, luego se llevó la placa a incubación durante 15 minutos en estufa a 37°C. Posteriormente, se agregó 10 µL de sustrato DL-BAPNA (N $\alpha$ -benzoil-D,L-arginina 4-nitroanilida clorhidrato, Sigma®) a cada pocillo y se llevó a incubación durante 5 minutos en estufa a 37°C. Finalmente, se hizo lectura mediante espectrofotometría a una longitud de onda entre 405-420nm. Los resultados se analizaron mediante la diferencia entre la absorbancia del blanco y cada muestra. Los valores de absorbancia <0,01 indicaron que no hubo actividad enzimática (Soto *et al.*, 2022).
- 6) **Análisis Estadístico:** Cada experimento fue realizado en triplicado y al menos en tres oportunidades distintas. Los resultados se expresaron como promedio más desviación estándar. Las variables múltiples se analizaron mediante ANDEVA de una vía seguido por post-test de Dunnett. Se utilizó el programa computacional GraphPad Software

PRISM 8 (GraphPad Software®, San Diego, EE. UU.). Se consideró un  $p < 0,05$  como estadísticamente significativo.

- 7) **Bioseguridad:** El laboratorio se encuentra ubicado en el Instituto de Ciencias Biomédicas en 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).
- 8) **Ética:** Este estudio cuenta con la aprobación del respectivo Comité de Ética de Investigación en Seres Humanos de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile (Anexo 2).

## **B. Metodología asociada al objetivo específico 1**

### **1) Infección de células BeWo y HPE**

a) Células BeWo: las células se preincubaron en ausencia y presencia de 0,2 ug/mL de Tryp-TcEVs sin tratar o térmicamente inactivadas. Además, las células BeWo fueron desafiadas con tripomastigotes de *T. cruzi* en una relación parásito:célula de 0,1:1 durante 24 horas.

b) HPE: las muestras se preincubaron en ausencia y presencia de 0,2 ug/mL de Tryp-TcEVs sin tratar o térmicamente inactivadas. Al mismo tiempo, los HPE se incubaron en ausencia y presencia de  $10^5$  tripomastigotes/mL durante 24 horas.

2) **Carga de DNA del parásito:** Se extrajo el DNA genómico mediante el kit de purificación de DNA genómico Wizard (Promega®) siguiendo las instrucciones del fabricante. La concentración de DNA se cuantificó mediante “ $\mu$ DropPlate DNA quantification system®” en un lector Varioskan Flash Multimode (Thermo Scientific®). La carga de DNA del parásito en HPE y células BeWo se determinó mediante amplificación por PCR en tiempo real de DNA satélite de *T. cruzi* (182 pb) (TCZ-F (5'-GCTCTTGCCCACAMGGGTGC-3') y TCZ-R (5'-CAAGCAGCGGATAGTTCAGG-3')) usando GAPDH humano como gen “*housekeeping*” (100 pb) (hGDH-F (5'-TGATGCGTGTACAAGCGTTTT-3') y hGDH-R (5'-ACATGGTATTACCACCCCACTAT-3')). Cada mezcla de reacción contenía 10  $\mu$ M de cada primer, 2,5 ng de DNA de las muestras, 10  $\mu$ l de Supermix SsoAdvanced Universal SYBR Green (Bio-Rad®) y H<sub>2</sub>O libre de nucleasas para completar 20  $\mu$ L. La

amplificación se realizó en termociclador para PCR en tiempo real. El programa de ciclos fue el siguiente: pre-desnaturalización a 95°C durante 3 minutos, desnaturalización a 95°C durante 5 segundos y 40 ciclos de amplificación a 60°C durante 30 segundos. Finalmente, una etapa de disociación, que va desde 95°C a 60°C. Los datos se analizaron utilizando el método de doble control comparativo ( $\Delta\Delta Ct$ ) (Castillo *et al.*, 2012).

- 3) **Cuantificación de células infectadas y parásitos intracelulares en células BeWo:** Para determinar el porcentaje de células infectadas y el número de parásitos intracelulares por célula, los núcleos celulares fueron teñidos con DAPI 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (4, 6-diamino-2-fenilindol, Molecular Probes®), por 5 minutos, seguido de 3 lavados con PBS por 5 minutos. Posteriormente se agregó una gota de medio de montaje acuoso para fluorescencia (VECTASHIELD®) a cada muestra y finalmente se analizaron en un microscopio de epifluorescencia (Motic BA310; Hong Kong, China). Las imágenes fueron capturadas con la cámara acoplada al microscopio (Moticam 5, Hong Kong, China). La captura de imágenes fue realizada al azar en cada condición experimental. Los parásitos fueron contados manualmente, reconocidos por su diferencia de tamaño, morfología nuclear y presencia de núcleo y kinetoplasto (Liempi *et al.*, 2015). Se analizaron al menos 1.000 células por cada condición experimental.

### **C. Metodología asociada al objetivo específico 2**

- 1) **Infeción de HPE:** Los explantes fueron infectados como está descrito en el punto 1b).
- 2) **Análisis histopatológico e histoquímico de HPE:** Las muestras fueron fijadas en formalina buffer neutra 10% v/v durante 24 horas y luego se deshidrataron en alcohol y se aclararon en xilol. Finalmente, los HPEs se impregnaron e incluyeron en parafina y se cortaron en microtomo a grosor de 5 $\mu\text{m}$ . Las láminas fueron teñidas con Hematoxilina-Eosina para el análisis topográfico de rutina, Picrorrojo Sirio y Tricrómico de Masson para histoquímica de colágeno y Ácido Peryódico de Schiff para moléculas glicosiladas. Posteriormente, se hizo el montaje con medio resinoso Entellán y se examinaron todas las secciones mediante microscopía de luz y polarizada para Picrorrojo Sirio. Las imágenes obtenidas se cargaron en el software ImageJv.1.34 para su análisis. (Duaso *et al.*, 2012).

3) **Análisis inmunohistoquímico de HPE:** Las muestras fueron fijadas en formalina buffer neutra 10% v/v durante 24 horas y luego se deshidrataron en alcohol y se aclararon en xilol. Finalmente, los HPEs se impregnaron e incluyeron en parafina y se cortaron en microtomo a grosor de 3µm. La estructura de la membrana basal de los HPE se analizó mediante métodos estándar de inmunoperoxidasa [anticuerpos: laminina (ABR® MA1-21194, dilución 1:50 v/v)]. Se aplicó el anticuerpo primario a cada sección durante 1 hora a 37°C (anti-laminina). La inmunotinción se realizó con un kit de conjugado de estreptavidina-HRP (Vectastain® ABC-HRP Kit) siguiendo las instrucciones del fabricante, utilizando diaminobencidina como cromógeno. Posteriormente, se tiñeron los núcleos con Hematoxilina de Gill y se hizo el montaje con medio resinoso Entellán. Todas las secciones fueron examinadas mediante microscopía de luz. Las imágenes obtenidas se cargaron en el software ImageJv.1.34 para su análisis (Duaso *et al.*, 2012).

## RESULTADOS

### Las exovesículas de tripomastigotes de *T. cruzi* aumentan la infección parasitaria en células BeWo

Las células BeWo fueron preincubadas, durante 2 horas, en ausencia y presencia Tryp-TcEVs (tratadas y no tratadas térmicamente) y luego fueron infectadas con tripomastigotes (relación parásito:célula 0,1:1) durante 24 horas. Tanto en la coincubación con Tryp-TcEVs y tripomastigotes ( $48,6 \pm 15,3\%$ ,  $p \leq 0.001$ ) como en la preincubación (P) con Tryp-TcEVs ( $34,1 \pm 9,6\%$ ,  $p \leq 0.05$ ) aumenta significativamente la cantidad de DNA parasitario respecto a las muestras controles que fueron infectadas con el parásito durante 24 horas (**Fig. 1**).

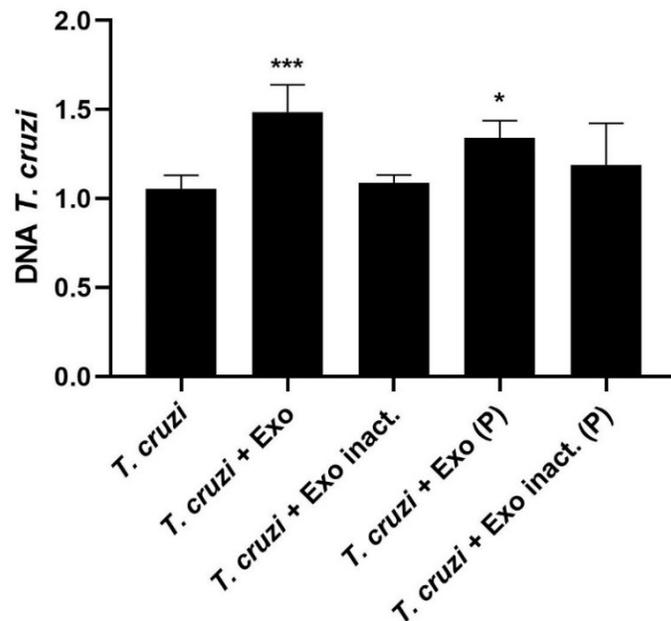


Figura 1. Las exovesículas de tripomastigotes de *T. cruzi* aumentan la carga de DNA parasitario en células BeWo. Las células BeWo fueron infectadas con Tryp-TcEVs y tripomastigotes durante 24 horas. También fueron preincubadas por 2 horas con Tryp-TcEVs y, luego de renovar el medio de cultivo, fueron infectadas con tripomastigotes (relación parásito:célula 0,1:1) durante 24 horas. Las condiciones de preincubación (P) y coincubación con exovesículas y el parásito aumentan significativamente la carga parasitaria respecto al control de incubación con *T. cruzi*. La presencia del DNA parasitario fue determinada mediante qPCR. Los datos obtenidos fueron expresados como media  $\pm$  SD analizada por medio de ANOVA seguido del post-test de Dunnett. \*  $p \leq 0.05$ , \*\*\*  $p \leq 0.001$

Adicionalmente las células fueron procesadas para tinción DAPI para analizar el porcentaje de células infectas y número de amastigotes por célula (**Fig. 2**). Tanto en la coincubación con tripomastigotes y Tryp-TcEVs como en la preincubación (P) con Tryp-TcEVs aumenta significativamente el porcentaje de células infectadas ( $11,2 \pm 5,9\%$ ,  $p \leq 0.001$ ;  $44,4 \pm 9,8\%$ ,  $p \leq 0.0001$ ) (**Fig. 2A**), como también el número de amastigotes por célula infectada ( $16,8 \pm 41,1\%$ ,  $p \leq 0.05$ ;  $21,8 \pm 8,5\%$ ,  $p \leq 0.05$ ) (**Fig. 2B**) respecto a las muestras controles que fueron incubadas con el parásito durante 24 horas. Así, los nidos de amastigotes pueden ser observados en el citoplasma (**Fig. 2C**, flechas amarillas) mientras que el núcleo se indica con una flecha roja.

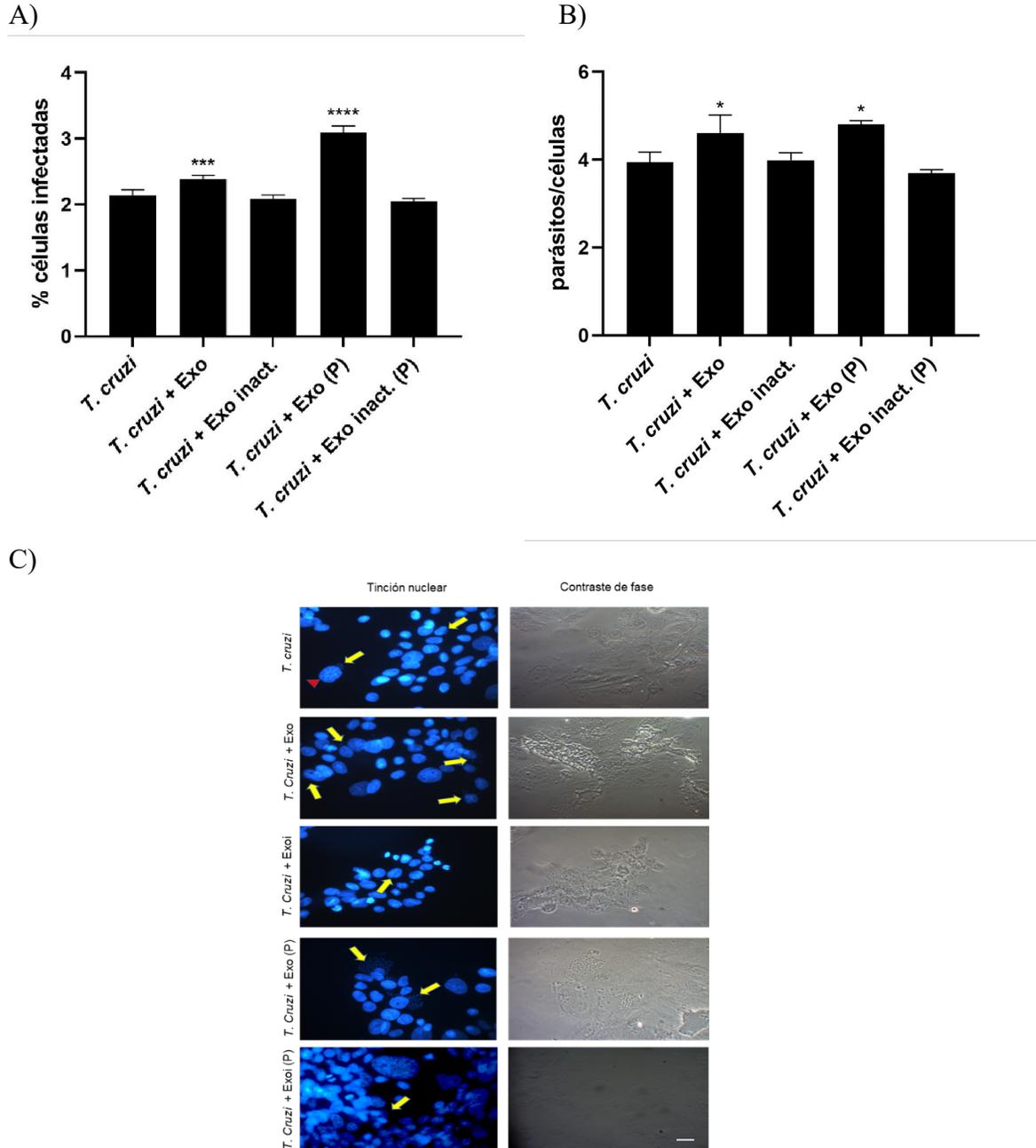


Figura 2. Las exovesículas de tripomastigotes de *T. cruzi* aumentan el porcentaje de células infectadas y el número de parásitos por célula infectada. Las células BeWo fueron infectadas con tripomastigotes y Tryp-TcEVs (tratadas y no tratadas térmicamente) durante 24 horas. También fueron preincubadas por 2 horas con Tryp-TcEVs (tratadas y no tratadas térmicamente) y, luego de renovar el medio de cultivo, fueron infectadas con tripomastigotes (relación parásito:célula 0,1:1) durante 24 horas. Las condiciones de preincubación (P) y coincubación con exovesículas y el parásito aumentan significativamente el porcentaje de células infectadas (A) como también el número de amastigotes por célula infectada (B) respecto al control de incubación con *T. cruzi*. Así, los nidos de amastigotes pueden ser observados en el citoplasma (C, flechas amarillas) mientras que el núcleo se indica con una flecha roja. Las muestras se procesaron con técnicas citológicas de rutina y los núcleos se tiñeron con DAPI. Barra de aumento 20 $\mu$ m. Los datos obtenidos fueron expresados como media  $\pm$  SD analizada por medio de ANOVA seguido del post-test de Dunnett. \*  $p \leq 0.05$ , \*\*  $p \leq 0.01$ , \*\*\*  $p \leq 0.001$ , \*\*\*\*  $p \leq 0.0001$ .

### Las exovesículas de tripomastigotes de *T. cruzi* aumentan la carga de DNA parasitario en HPE

Los HPE fueron tratadas como descrito más arriba. Tanto en la coincubación con Tryp-TcEVs y tripomastigotes ( $107,1 \pm 42,1\%$ ,  $p \leq 0.01$ ) como en la preincubación (P) con Tryp-TcEVs ( $121,8 \pm 74,8\%$ ,  $p \leq 0.001$ ) aumenta significativamente la cantidad de DNA parasitario respecto a las muestras controles que fueron infectadas con el parásito durante 24 horas (**Fig. 3**).

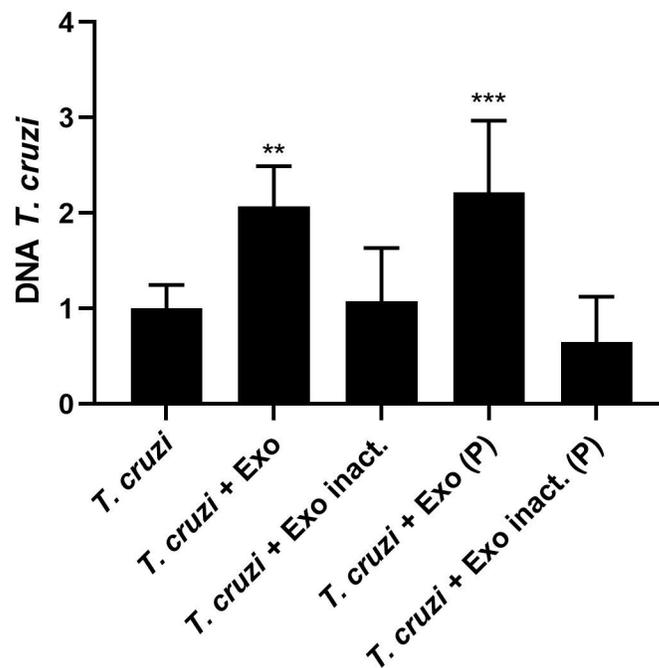


Figura 3. Las exovesículas de tripomastigotes de *T. cruzi* aumentan la carga de DNA parasitario en HPE. Los HPE fueron infectados con Tryp-TcEVs y tripomastigotes durante 24 horas. También fueron preincubados por 2 horas con Tryp-TcEVs y, luego de renovar el medio de cultivo, fueron infectados con tripomastigotes ( $10^5$  parásitos/mL) durante 24 horas. Las condiciones de preincubación (P) y coincubación con exovesículas y el parásito aumentan significativamente la carga parasitaria respecto al control de incubación con *T. cruzi*. La presencia del DNA parasitario fue determinada mediante qPCR. Los datos obtenidos fueron expresados como media  $\pm$  SD analizada por medio de ANOVA seguido del post-test de Dunnett. \*\*  $p \leq 0.01$ , \*\*\*  $p \leq 0.001$

### **Las Tryp-TcEVs inducen daño tisular *per se* en explantes de placenta humana**

Adicionalmente, los tejidos fueron analizados mediante el método histopatológico de rutina, como también mediante diversas metodologías inmuno- e histoquímicas para analizar componentes de la matriz extracelular.

El análisis histopatológico (**Fig. 4**) indica que las vellosidades coriónicas mantuvieron el trofoblasto intacto (flechas amarillas) tanto en el control (A) como en las muestras incubadas con Tryp-TcEVs inactivas (D). Por otra parte, se observó desprendimiento y destrucción del trofoblasto (flechas negras), evidenciándose daño tisular en las condiciones de coincubación (E) y preincubación (G) del parásito y Tryp-TcEVs, como también en las muestras infectadas con el parásito y Tryp-TcEVs inactivas (F y H) y en la incubación de HPEs con *T. cruzi* (B). Sin embargo, no hay diferencias en el nivel de daño entre estas condiciones (B, E, F, G y H). Interesantemente, se visualizó desprendimiento del trofoblasto en las muestras infectadas únicamente con Tryp-TcEVs (C), lo que sugiere que son capaces de inducir daño por sí solas en el tejido.

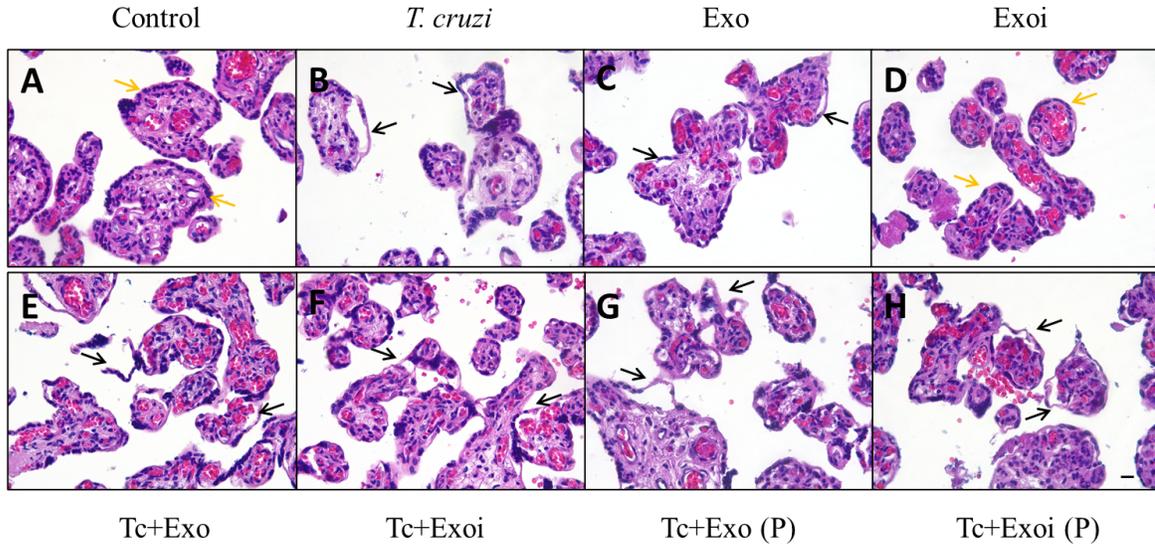


Figura 4. Las Tryp-TcEVs inducen desprendimiento y destrucción del trofoblasto en explantes de placenta humana. Los HPEs fueron preincubados con Tryp-TcEVs durante dos horas y, luego de renovar el medio, fueron infectados con tripomastigotes ( $10^5$  parásitos/mL) durante 24 horas. Por otra parte, los HPEs fueron infectados con tripomastigotes en presencia y ausencia de Tryp-TcEVs (tratados y no tratados térmicamente) durante 24 horas. Las vellosidades coriónicas incubadas con Tryp-TcEVs en presencia y ausencia de *T. cruzi* (B, C, E, F, G y H) muestran desprendimiento y destrucción del trofoblasto (flechas negras) en comparación con el control (A). Las flechas amarillas muestran el trofoblasto íntegro en el control (A). Las muestras fueron procesadas con técnicas histológicas de rutina y teñidas con Hematoxilina-Eosina. Barra de aumento: 20um.

Las muestras fueron adicionalmente procesadas y teñidas con Ácido Peryódico de Schiff (PAS), que es un reactivo utilizado para teñir estructuras que contengan una gran proporción de carbohidratos, los cuales podemos encontrar en tejido conectivo y membrana basal. En la Fig. 5, se observa una fuerte tinción en la membrana basal (flechas amarillas) entre el trofoblasto y el estroma veloso, como también en el endotelio fetal en las muestras control (A) y en las muestras incubadas con Tryp-TcEVs inactivadas (D). Por otro lado, se observó una pérdida de la tinción en ciertas zonas (flechas negras) en las muestras incubadas con el parásito y en presencia de TcEVs (B, E, F, G y H). En las muestras infectadas con Tryp-TcEVs (C) se observó una leve pérdida de la tinción en ciertas zonas, lo que sugiere que las TcEVs son capaces de degradar componentes glicosilados de la membrana basal *per se*.

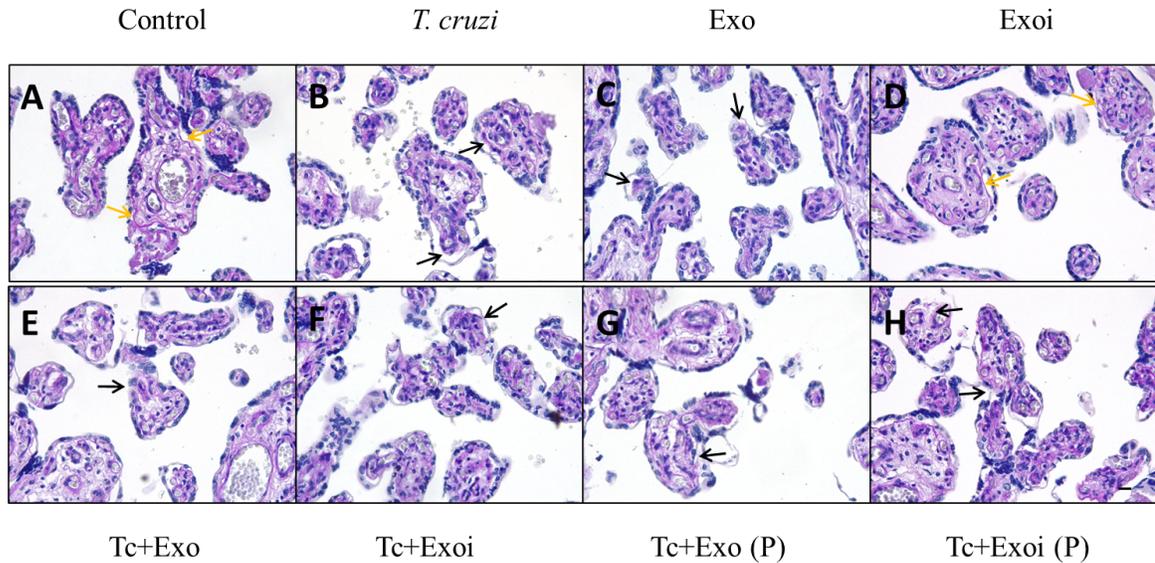
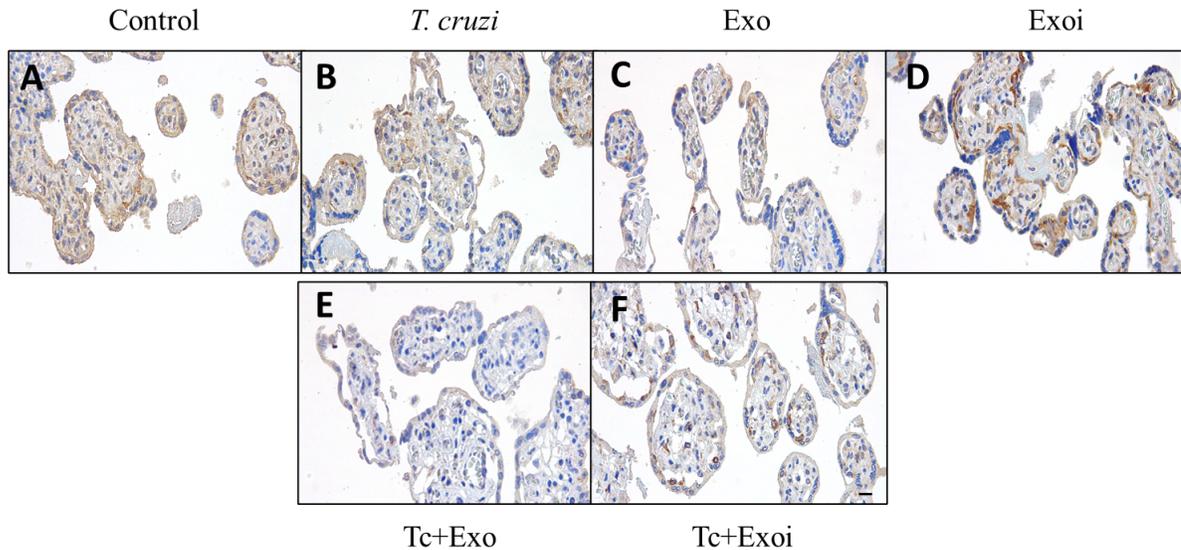


Figura 5. Las Tryp-TcEVs degradan las moléculas glicosiladas de la membrana basal en explantes de placenta humana. Los HPEs fueron preincubados con Tryp-TcEVs durante dos horas y, luego de renovar el medio, fueron infectados con tripomastigotes ( $10^5$  parásitos/mL) durante 24 horas. Por otra parte, los HPEs fueron infectados con tripomastigotes en presencia y ausencia de Tryp-TcEVs (tratados y no tratados térmicamente) durante 24 horas. Las vellosidades coriónicas incubadas con Tryp-TcEVs en presencia y ausencia de *T. cruzi* (B, C, E, F, G y H) muestran pérdida parcial de la tinción de la membrana basal (flechas negras) en comparación con el control (A). Las flechas amarillas indican la membrana basal íntegra en el control (A). Las muestras fueron procesadas con técnicas histológicas de rutina y teñidas con Ácido Peryódico de Schiff. Barra de aumento: 20um.

Teniendo en cuenta que las condiciones de coincubación y preincubación no presentaron diferencias observables entre sí, se procedió a analizar la laminina en membrana basal omitiendo la etapa de preincubación.

En la **Fig. 6** se observa en las vellosidades coriónicas del control (A) y aquellas incubadas con Tryp-TcEVs inactivas (D) una intensa inmunoreactividad de color marrón en la membrana basal. En las muestras infectadas con *T. cruzi* (B), *T. cruzi* con Tryp-TcEVs inactivas (F) y en la coincubación de *T. cruzi* con Tryp-TcEVs (E), se observó una pérdida parcial de la inmunoreactividad en ciertas zonas de la membrana basal, lo que sugiere una disminución o pérdida de laminina. Este efecto también se observó, aunque en menor proporción, en los HPEs incubados sólo con Tryp-TcEVs (C).



**Figura 6. Las Tryp-TcEVs degradan la laminina de la membrana basal en explantes de placenta humana.** Los HPEs fueron preincubados con Tryp-TcEVs durante dos horas y, luego de renovar el medio, fueron infectados con tripomastigotes ( $10^5$  parásitos/mL) durante 24 horas. Por otra parte, los HPEs fueron infectados con tripomastigotes en presencia y ausencia de Tryp- TcEVs (tratados y no tratados térmicamente) durante 24 horas. Las vellosidades coriónicas incubadas con Tryp-TcEVs en presencia y ausencia de *T. cruzi* (B, C, E, F, G y H) muestran pérdida parcial de la inmunoreactividad en la membrana basal en comparación con el control (A). Las muestras fueron procesadas con técnicas histológicas de rutina e inmunoteñidas para laminina. Barra de aumento: 20um.

En forma adicional se analizó la organización del colágeno en el estroma vellositario, para ello las muestras fueron teñidas con el método Tricrómico de Masson (TCM). Esta metodología permite visualizar el colágeno presente en tejido conectivo, el cual toma una coloración azul. En la **Fig. 7**, se observó una fuerte tinción azulada en el estroma vellositario de las vellosidades coriónicas del control (A), como también en las muestras incubadas con Tryp-TcEVs inactivas (D). Por el contrario, se observó una pérdida en la intensidad de la coloración histoquímica en las vellosidades coriónicas infectadas con el parásito y en presencia de TcEVs (B, E, F, G y H), sin diferencias entre ellas, lo cual implicaría una menor cantidad de colágeno o una importante desorganización en este tejido conectivo fetal. Este efecto también se visualizó al incubarse con Tryp-TcEVs (C).

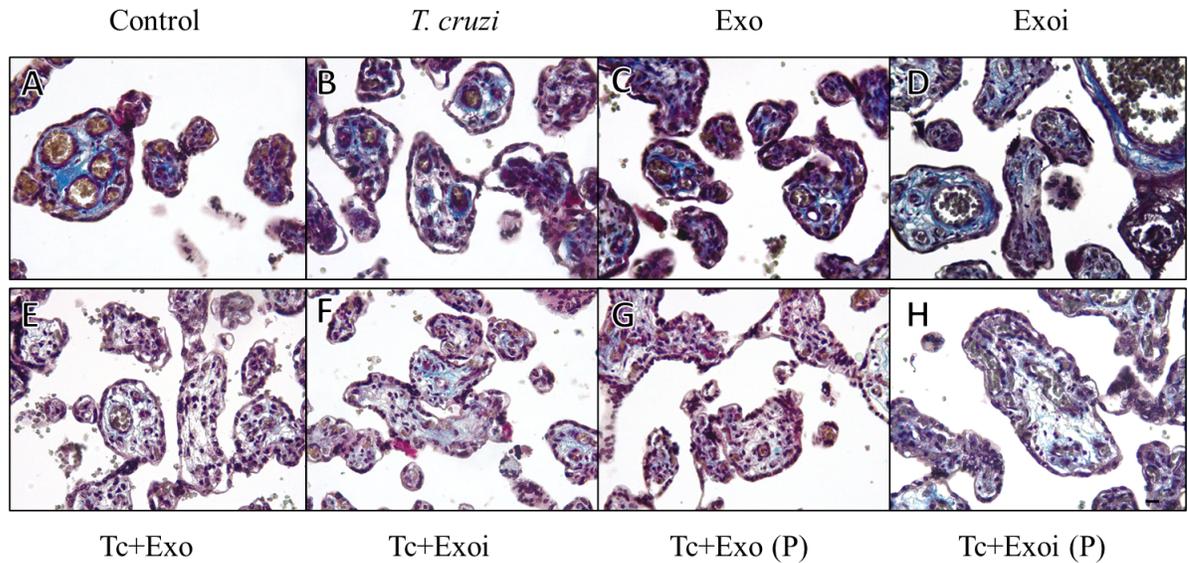


Figura 7. Las Tryp-TcEVs inducen pérdida de colágeno del estroma vellositario en explantes de placenta humana. Los HPEs fueron preincubados con Tryp-TcEVs durante dos horas y, luego de renovar el medio, fueron infectados con tripomastigotes ( $10^5$  parásitos/mL) durante 24 horas. Por otra parte, los HPEs fueron infectados con tripomastigotes en presencia y ausencia de Tryp-TcEVs (tratados y no tratados térmicamente) durante 24 horas. Las vellosidades coriónicas incubadas con Tryp-TcEVs en presencia y ausencia de *T. cruzi* (B, C, E, F, G y H) muestran pérdida en la intensidad de la tinción del estroma vellositario en comparación con el control (A). Las muestras fueron procesadas con técnicas histológicas de rutina y teñidas con Tricrómico de Masson. Barra de aumento: 20um.

Adicionalmente se analizaron las muestras con post-tinción con Picrorrojo Sirio (PRS), la que es específica para colágeno tipo I y III al visualizar bajo luz polarizada. En la **Fig. 8**, se observó una fuerte birrefringencia del colágeno tipo I en el estroma vellositario de las vellosidades coriónicas del control (A), como también en las muestras incubadas con Tryp-TcEVs inactivas (D), sin diferencias entre ellas. Respecto a las vellosidades coriónicas infectadas con *T. cruzi* y en presencia de TcEVs (B, E, F, G y H), se observó una pérdida similar en la intensidad de la birrefringencia debido a la desorganización de las fibras de colágeno tipo I. Este efecto igualmente fue observado al incubar las vellosidades coriónicas con Tryp-TcEVs (C), confirmando los resultados anteriores que indican que las TcEVs causan daño histopatológico.

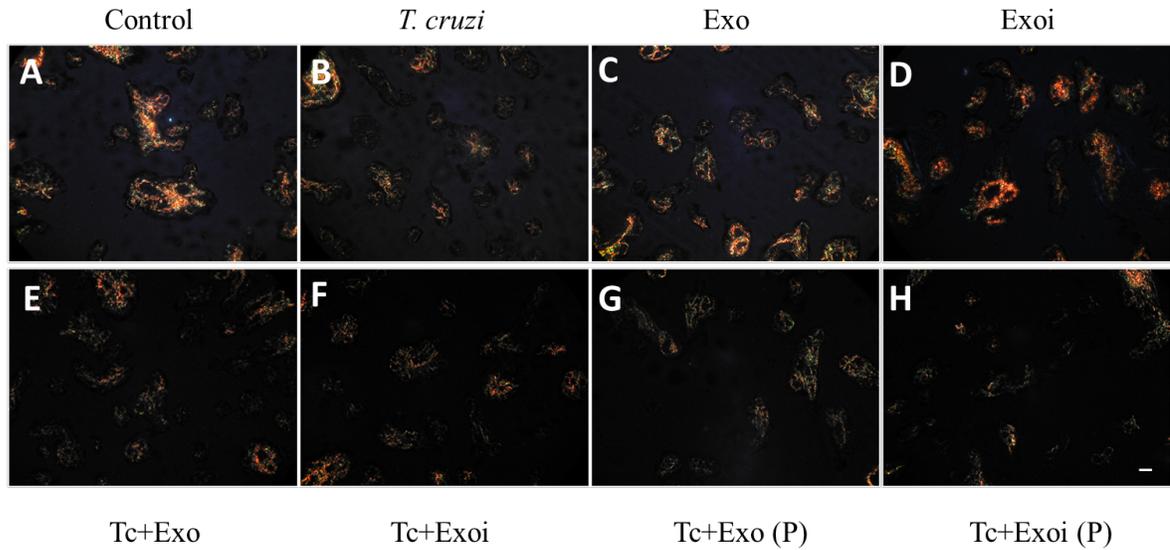


Figura 8. Las Tryp-TcEVs desorganizan el colágeno tipo I del estroma vellositario en explantes de placenta humana. Los HPEs fueron preincubados con Tryp-TcEVs durante dos horas y, luego de renovar el medio, fueron infectados con tripomastigotes ( $10^5$  parásitos/mL) durante 24 horas. Por otra parte, los HPEs fueron infectados con tripomastigotes en presencia y ausencia de Tryp-TcEVs (tratados y no tratados térmicamente) durante 24 horas. Las vellosidades coriónicas incubadas con Tryp-TcEVs en presencia y ausencia de *T. cruzi* (B, C, E, F, G y H) muestran pérdida parcial en la intensidad de birrefringencia del colágeno tipo I en el estroma vellositario en comparación con el control (A). Las muestras fueron procesadas con técnicas histológicas de rutina y teñidas con Picrorrojo Sirio. Barra de aumento: 20um.

## DISCUSIÓN

La compleja interacción hospedero-patógeno determina la probabilidad de éxito en cualquier infección, incluida la CD. Así, la transmisión congénita de la enfermedad depende de distintos procesos biológicos que involucran la interacción entre *T. cruzi*, la placenta, el sistema inmune maternal y la respuesta inmune fetal/neonatal en desarrollo.

Las diferentes cepas y clones conocidos del parásito, como ya fue indicado anteriormente se clasifican en siete. Estas se distribuyen en distintas áreas geográficas y poseen diferentes propiedades biológicas, incluyendo tasas de crecimiento en cultivos, tropismos a tejidos y órganos, antigenicidad, capacidad para infectar potenciales insectos vectores, susceptibilidad a fármacos, número de cromosomas y contenido de DNA (Kemmerling *et al.*, 2019). Por otro lado, se han descrito distintos factores de virulencia que ayudan a *T. cruzi* a invadir, establecerse y desarrollarse en el hospedero y evadir la respuesta inmune (Osorio *et al.*, 2012). Gran parte de estas moléculas son liberadas por tripomastigotes de *T. cruzi* a través de vesículas extracelulares, estructuras de bicapa lipídica que protegen su cargo y lo transportan a través de distintas vías (Borges *et al.*, 2016). Se ha descrito que las TcEVs aumentan la infectividad del parásito, lo que se comprueba en esta memoria (Fig. 1-3) y coincide con el aumento del parasitismo cardíaco, la inmunomodulación y la evasión de la respuesta inmune del hospedero (Trocoli *et al.*, 2009; Díaz-Lozano *et al.*, 2017). Estos resultados además concuerdan con lo descrito para otros parásitos protozoarios, como por ejemplo *Toxoplasma gondii*, donde se observó que al incubar con TcEVs los taquizoitos de dicho parásito tienden a infectar mayor cantidad de células (Retana *et al.*, 2019).

Durante la infección congénita, el parásito debe cruzar la barrera placentaria conformada por el trofoblasto, la membrana basal y el estroma vellositario, encontrándose en primera instancia con el trofoblasto. Esta primera línea de defensa responde con un aumento del recambio epitelial y secreción de citoquinas proinflamatorias (Liempi *et al.*, 2016; Kemmerling *et al.*, 2019), pero se ha demostrado que en el transcurso de la infección los tripomastigotes superan esta respuesta e inducen destrucción y desprendimiento del trofoblasto (Duaso *et al.*, 2010; Duaso *et al.*, 2012; Castillo *et al.*, 2012; Rojo *et al.*, 2014).

Se ha propuesto que, entre los factores de virulencia que *T. cruzi* posee, la glicoproteína de superficie gp85/TS podría facilitar la adhesión del parásito a las células del trofoblasto mediante un dominio FLY, péptido que es capaz de unirse fuertemente a los filamentos celulares intermedios, como las citoqueratinas y la vimentina. Por otro lado, la cruzipaina produce un agonista de bradiquinina que desencadena la movilización de  $Ca^{2+}$  citoplasmático y desestabiliza el citoesqueleto de actina, mejorando así la invasión del parásito junto a otros factores de virulencia (Osorio *et al.*, 2012).

En esta memoria se determinó que las TcEVs por sí solas son capaces de inducir daño tisular y que también podrían aumentar el daño inducido por el parásito (Fig 4). Sin embargo, el daño causado por el parásito sólo es muy grande, por lo que es difícil apreciar un aumento del daño producido por las TcEVs.

El trofoblasto está separado del estroma vellositario por una membrana basal, que está compuesta por laminina, fibronectina, colágeno tipo IV y otras moléculas glicosiladas (Carlier *et al.*, 2020). Importantemente, la glicoproteína de superficie gp85/TS contiene sitios de unión para fibronectina y laminina. Esta última es paralelamente degradada por cruzipaina, lo que permite la destrucción selectiva de la membrana basal junto a otros factores de virulencia (Osorio *et al.*, 2012). La importancia de este componente es tal que, al silenciar el gen de laminina, se inhibe la invasión celular del parásito (Nde *et al.*, 2006). Así es como se pudo observar mediante la tinción PAS, que al infectar con el parásito en presencia y ausencia de Tryp-TcEVs hay degradación de las moléculas glicosiladas de la membrana basal en HPE (Fig. 5) y, a su vez, se evidenció que degradan específicamente la laminina (Fig. 6).

El estroma vellositario, donde se alojan los capilares fetales, constituye la siguiente barrera para el parásito. Se ha descrito previamente que *T. cruzi* induce la desorganización del colágeno tipo I durante la infección *ex vivo* de HPE (Duso *et al.*, 2010), es decir, el parásito logra llegar al tejido conectivo fetal y, probablemente siguiendo los mismos mecanismos de invasión mencionados, degrada parte de las fibras de colágeno I presente en el estroma vellositario. Por otra parte, se ha observado que *T. cruzi* induce al hospedero a secretar sus propias metaloproteinasas, MMP-2 y MMP-9, y estas podrían estar participando también en la degradación del colágeno tipo I (Castillo *et al.*, 2012). Esto provoca una importante desorganización de las fibras que le dan forma tridimensional a la matriz extracelular, lo cual

favorece la entrada de *T. cruzi* dentro del tejido y posteriormente a la circulación fetal. Así mismo se evidenció, mediante la tinción TCM y PRS, al incubar con el parásito en presencia y ausencia de Tryp-TcEVs (Fig. 7 y 8).

Interesantemente, se observó que al incubar las vellosidades coriónicas únicamente con Tryp-TcEVs (Fig. 4C, 5C, 6C, 7C y 8C), las exovesículas de *T. cruzi* inducen destrucción y desprendimiento del trofoblasto, destrucción selectiva de la membrana basal y desorganización de colágeno tipo I en el estroma vellositario. Este efecto probablemente esté dado por los potenciales mecanismos de infectividad que tienen los factores de virulencia dentro de las exovesículas del parásito, aunque la patogénesis de este proceso aún no está bien definida.

Finalmente, no fue posible determinar cualitativamente que al incubar con TcEVs hubo un aumento de desprendimiento y destrucción del trofoblasto, destrucción selectiva de la membrana basal y desorganización del colágeno tipo I en el estroma vellositario, ya que visualmente no se observaron diferencias entre las condiciones incubadas con el parásito en presencia y ausencia de TcEVs. En este caso, es necesaria la cuantificación de las imágenes obtenidas para afirmar si las TcEVs inducen un aumento en la severidad del daño tisular causado por el parásito.

## CONCLUSIÓN

La infección en células BeWo y en explantes de placenta humana está mediada, al menos parcialmente, por las exovesículas de tripomastigotes de *T. cruzi*.

Por ende, se acepta la hipótesis respecto a que las TcEVs aumentan la infección parasitaria. Sin embargo, no se pudo comprobar ni rechazar la hipótesis, con la metodología utilizada, en cuánto al posible aumento del daño tisular.

## BIBLIOGRAFÍA

- **BORGES, B.; UEHARA, I.; DIAS, L.; BRIGIDO, P.; DA SILVA, C.; SILVA, M.** 2016. Mechanisms of Infectivity and Evasion Derived from Microvesicles Cargo Produced by *Trypanosoma cruzi*. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. 6:161.
- **CARLIER, Y.; SCHIJMAN, A.; KEMMERLING, U.** 2020. Placenta, *Trypanosoma cruzi*, and Congenital Chagas Disease. *Current Tropical Medicine Reports*. 7(4):172-182.
- **CARRILLO, I.; DROGUETT, D.; CASTILLO, C. et al.** 2016. Caspase-8 activity is part of the BeWo trophoblast cell defense mechanisms against *Trypanosoma cruzi* infection. *Experimental Parasitology*. 168:9-15.
- **CASTILLO, C.; LOMEZ-MUÑOZ, R.; DUASO, J., et al.** 2012. Role of matrix metalloproteinases 2 and 9 in *ex vivo Trypanosoma cruzi* infection of human placental chorionic villi. *Placenta*. 33(12):991-997.
- **DAS, P.; SAHA, S.; BOSEDASGUPTA, S.** 2021. The ultimate fate determinants of drug induced cell-death mechanisms in Trypanosomatids. *International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance*. 15:81-91.
- **DE PABLOS, L.; DÍAZ-LOZANO, I.; JERCIC, M. et al.** 2016. The C-terminal region of *Trypanosoma cruzi* MASPs is antigenic and secreted via exovesicles. *Scientific reports*. 6(1):27293.
- **DE PABLOS, L.; RETANA, L.; OSUNA, A.** 2018. Extracellular Vesicles in Chagas Disease: A New Passenger for an Old Disease. *Frontiers in Microbiology*. 9:1190.
- **DE SOUZA, W.** 2002. Basic Cell Biology of *Trypanosoma cruzi*. *Current Pharmaceutical Design*. 8:269 – 285.
- **DE SOUZA, W.; BARRIAS, E.** 2020. Membrane-bound extracellular vesicles secreted by parasitic protozoa: cellular structures involved in the communication between cells. *Parasitology Research*. 119(7):2005-2023.
- **DÍAZ-LOZANO, I.; DE PABLOS, L.; LONGHI, S.; ZAGO, M.; SCHIJMAN, A.; OSUNA, A.** 2017. Immune complexes in chronic Chagas disease patients are formed by exovesicles from *Trypanosoma cruzi* carrying the conserved MASP N-terminal region. *Scientific reports*. 7(1):44451.

- **DUASO, J.; ROJO, G.; CABRERA, G. et al.** 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.
- **DUASO, J.; YANEZ, E.; CASTILLO, C., et al.** 2012. Reorganization of extracellular matrix in placentas from women with asymptomatic chagas disease: Mechanism of parasite invasion or local placental defense? *Journal of Tropical Medicine*. 2012:758357.
- **FRETES, R.; KEMMERLING, U.** 2012. Mechanism of *Trypanosoma cruzi* placenta invasion and infection: The use of human chorionic villi explants. *Journal of Tropical Medicine*. Vol. 2012, 614820.
- **GILL, S.; CATCHPOLE, R.; FORTERRE, P.** 2019. Extracellular membrane vesicles in the three domains of life and beyond. *FEMS Microbiology Reviews*. 43(3):273-303.
- **JERCIC, M.; MERCADO, M.; VILLARROEL, R.** 2010. Congenital *Trypanosoma cruzi* infection in neonates and infants from two regions of Chile where Chagas' disease is endemic. *Journal of Clinical Microbiology*. 48(10):3824-3826.
- **JIMENEZ, P.; JAIMES, J.; POVEDA, C.; RAMIREZ, J.** 2018. A systematic review of the *Trypanosoma cruzi* genetic heterogeneity, host immune response and genetic factors as plausible drivers of chronic chagasic cardiomyopathy. *Parasitology*. 146(3):269-283.
- **JUIZ, N. A.; SOLANA, M. E.; ACEVEDO, G. R.; BENATAR, A. F.; RAMIREZ, J. C.; DA COSTA, P. A.; SCHIJMAN, A. G.** 2017. Different genotypes of *Trypanosoma cruzi* produce distinctive placental environment genetic response in chronic experimental infection. *PLoS neglected tropical diseases*, 11(3), e0005436.
- **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).
- **KEMMERLING, U.; CASTILLO, C.; LIEMPI, A. et al.** 2017 The immune response against *Trypanosoma cruzi* in the human placenta. *Emerging Topics in Life Sciences*. 1(6):573-577.
- **KEMMERLING, U.; OSUNA, A.G; SCHIJMAN, A.; 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 (AUG): 1–15.  
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01854>.

- LIEMPI, A.; CASTILLO, C.; DUASO, J. et al. 2014. *Trypanosoma cruzi* induces trophoblast differentiation: A potential local antiparasitic mechanism of the human placenta? *Placenta*. 35(12):1035-1042.
- LIEMPI, A.; CASTILLO, C.; CERDA, M. et al. 2015. *Trypanosoma cruzi* infectivity assessment in “in vitro” culture systems by automated cell counting. *Acta Tropica*. 143:47-50.
- 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: 123–29.  
<https://doi.org/10.1016/j.micpath.2016.08.022>.
- LOWE, D.; ROBBINS, J.; BAKARDJIEV, A. 2018. Animal and human tissue models of vertical *Listeria monocytogenes* transmission and implications for other pregnancy-associated infections. *Infection and Immunity*. 22;86(6):e00801-17.
- LUJÁN, C.; TRIQUELL, M.; CASTILLO, C.; HARDISSON, D.; KEMMERLING, U.; FRETES, R. 2016. Role of placental barrier integrity in infection by *Trypanosoma cruzi*. *Acta Tropica*. 164:360-368.
- MEDINA, L.; CASTILLO, C.; LIEMPI, A. et al. 2018. Differential infectivity of two *Trypanosoma cruzi* strains in placental cells and tissue. *Acta Tropica*. 186:35-40.
- MEDINA, L.; GUERRERO-MUÑOZ, J.; LIEMPI, A.; CASTILLO, C.; ORTEGA, Y.; SEPÚLVEDA, A.; SALOMÓ, F.; MAYA, J.; KEMMERLING, U. 2022. Ex Vivo Infection of Human Placental Explants by *Trypanosoma cruzi* Reveals a microRNA Profile Similar to That Seen in Trophoblast Differentiation. *Pathogens*. 11(3), 361.
- MENNA-BARRETO, R. 2019. Cell death pathways in pathogenic trypanosomatids: lessons of (over)kill. *Cell Death and Disease*. 10(2):93.
- MOREIRA, L.; RODRIGUEZ, F.; OSUNA, A. 2019. Extracellular vesicles of *Trypanosoma cruzi* tissue-culture cell-derived trypomastigotes: Induction of physiological changes in non-parasitized culture cells. Almeida IC, ed. *PLoS neglected tropical diseases*. 13(2):e0007163.

- **MOREIRA, L.; PRESCILLA-LEDESMA, A.; CORNET-GOMEZ, A., et al.** 2021. Biophysical and biochemical comparison of extracellular vesicles produced by infective and non-infective stages of *Trypanosoma cruzi*. *International Journal of Molecular Sciences*. 22(10):5183.
- **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.
- **NDE, P.; SIMMONS, K.; KLESHCHENKO, Y.; PRATAP, S.; LIMA, M.; VILLALTA, F.** 2006. Silencing of the laminin gamma-1 gene blocks *Trypanosoma cruzi* infection. *Infection and Immunity*. 74(3):1643e8.
- **OSORIO, L.; RÍOS I.; GUTIÉRREZ, B.; GONZÁLEZ, J.** 2012. Virulence factors on *Trypanosoma cruzi*: who is who?. *Microbes and Infection*. 14:1390-1402. <https://dx.doi.org/10.1016/j.micinf.2012.09.003>.
- **PASTOR, I.; COLLANTES, E.; JIMÉNEZ, L.; ORTEGA, L.; HORCAJO, P.** 2021. Modeling the Ruminant Placenta-Pathogen Interactions in Apicomplexan Parasites: Current and Future Perspectives. *Frontiers in Veterinary Science*. 21;7:634458.
- **PÉREZ-MOLINA, J.A.; MOLINA, I.** 2018. Chagas disease. *Lancet*. 391(10115):82-94.
- **RASSI, A.; RASSI, A.; MARIN-NETO, J.A.** 2010. Chagas disease. *Lancet*. 375(9723):1388-1402.
- **RASSI, A.; RASSI, A.; MARCONDES DE REZENDE, J.** 2012. American Trypanosomiasis (Chagas Disease). *Infectious Disease Clinics of North America*. 26(2):275–291. <https://doi.org/10.1016/j.idc.2012.03.002>.
- **RETANA, L.; RODRÍGUEZ, F.; SERRANO, F.; OSUNA, A.** 2019. Extracellular vesicles of *Trypanosoma cruzi* tissue-culture cell-derived trypomastigotes: Induction of physiological changes in non-parasitized culture cells. *PLoS neglected tropical diseases*. 13(2):e0007163.
- **ROJO, G.; CASTILLO C.; DUASO J.; LIEMPI A.; DROGUETT D.; GALANTI N.; MAYA, J.; LÓPEZ-MUÑOZ, R.; KEMMERLING, U.** 2014. Toxic and

- therapeutic effects of Nifurtimox and Benznidazol on *Trypanosoma cruzi ex vivo* infection of human placental chorionic villa explants. *Acta Tropica*. 132:112-118.
- **ROSSI, I.; FERREIRA-NUNES, M.; VARGAS-OTALORA, S.; DA SILVA FERREIRA T., CORTEZ, M.; RAMIREZ, M.** 2021. Extracellular Vesicles during TriTryps infection: Complexity and future challenges. *Molecular immunology*. 132:172-183.
  - **SOTO, C.; ROJAS, V.; YÁÑEZ, L.; HIDALGO, A.; OLIVERA, M.; PACHECO, M; VENEGAS, D; SALINAS, D; BRAVO, D; QUESTA, A.** 2022. Porphyromonas gingivalis-Helicobacter pylori co-incubation enhances Porphyromonas gingivalis virulence and increases migration of infected human oral keratinocytes. *Journal of oral microbiology*. Vol. 14, 2107691 <https://doi.org/10.1080/20002297.2022.2107691>.
  - **TROCOLI, A.; TONELLI, R.; PAVANELLI, W.; DA SILVA J.; SCHUMACHER, R.; DE SOUZA, W. et al.** 2009. *Trypanosoma cruzi*: parasite shed vesicles increase heart parasitism and generate an intense inflammatory response. *Microbes and Infection*. 11(1):29-39.<https://doi.org/10.1016/j.micinf.2008.10.003>.
  - **TYLER, K.M. AND ENGMAN, D.M.** 2001. The Life Cycle of *Trypanosoma cruzi* Revisited. *International Journal for Parasitology*. 31(5-6): 472–481.
  - **VEAS, R.; ROJAS-PIRELA, M.; CASTILLO, C. et al.** 2020. Microalgae extracts: Potential anti-*Trypanosoma cruzi* agents?. *Biomedicine and Pharmacotherapy*. 127:110178.
  - **W.H.O.** 2010. Working to overcome the global impact of neglected tropical diseases: First WHO report on neglected tropical diseases. [en línea]. <untitled (who.int)> [consulta: 20-04-2022].
  - **YOSHIDA, N.** 2006. Molecular Basis of Mammalian Cell Invasion by *Trypanosoma cruzi*. *Anais da Academia Brasileira de Ciencias*. 78(1):87–111.
  - **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.
  - **ZUMA, A.; DOS SANTOS, E.; DE SOUZA, W.** 2020. Basic Cell Biology of *Trypanosoma cruzi*. *Current Pharmaceutical Design*. 26(14).

## Anexos

### Anexo 1



Unidad de Prevención de Riesgos & Bioseguridad

Santiago, Marzo 31 2022.-

Señores  
**FONDECYT REGULAR N° 1220105**  
**PRESENTE**

Estimados señores:

La Unidad de Prevención de Riesgos & Bioseguridad, Facultad de Medicina, Universidad de Chile certifica que ha recibido del investigador responsable Dr. Ulrike Kemmerling Weis para su estudio el proyecto titulado ***“Mechanism of Congenital Chagas disease: Effective placental Trypanosoma cruzi infection depends on parasite-derived exovesicles”***. Laboratorio Mecanismos Infección Parasitaria, Programa de Biología Integrativa, 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”, “Manual de Normas Bioseguridad y Riesgos asociados Fondecyt – CONICYT, versión 2018”, Centro de Control y Prevención de Enfermedades, CDC, 4ª 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 Dr. Ulrike Kemmerling Weis se compromete a cumplir con las normas de bioseguridad indicadas en los manuales antes mencionados y las establecidas en el Reglamento Interno del funcionamiento de los laboratorios, Unidad de Prevención de Riesgos y Bioseguridad, Facultad de Medicina, Universidad de Chile. En concomitancia se hace responsable de que todos los participantes del proyecto cumplan con las normas de bioseguridad establecidas.

**ULRIKE**  
**KEMMERLING**

Firmado digitalmente  
por ULRIKE KEMMERLING  
Fecha: 2022.04.01  
13:15:54 -03'00'

Tomé conocimiento: Dr. Ulrike Kemmerling Weis

**Doctor Rómulo Fuentes Flores**  
**Director de Investigación y Tecnología**

**Rómulo**  
**Fuentes**  
**Flores**

Firmado digitalmente por Rómulo Fuentes Flores  
DN: C=CL, OU=Director de Investigación y Tecnología Facultad de Medicina, O=Universidad de Chile, CN=Rómulo Fuentes Flores, E=romulo@uchile.cl  
Razón: Soy el autor de este documento  
Ubicación: la ubicación de su firma aquí  
Fecha: 2022-04-01 11:17:06  
Foxit PhantomPDF Versión: 10.0.0

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

Unidad de Prevención de Riesgos & Bioseguridad, Facultad de Medicina, Universidad de Chile  
Independencia # 1027 / Fono: 229786564 @ upr@med.uchile.cl

## Anexo 2



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

### ACTA DE APROBACIÓN DE PROYECTO

(Documento en versión 3.1 corregida 17.11.2020)

Con fecha 25 de mayo de 2022, el Comité de Ética de Investigación en Seres Humanos de la Facultad de Medicina, Universidad de Chile, integrado por los siguientes miembros:

Dr. Manuel Oyarzún G., Médico Neumólogo, Profesor Titular, Presidente  
Dra. Lucia Cifuentes O., Médico Genetista, Profesor Titular, Vicepresidente  
Sra. Claudia Marshall F., Educadora, Representante de la comunidad  
Dra. Grisel Orellana V., Médico Neuropsiquiatra, Profesor Asociado  
Prof. Julieta González B., Bióloga Celular, Profesor Asociado  
Dra. María Angela Delucchi B., Médico Pediatra Nefrólogo, Profesor Titular  
Dr. Miguel O’Ryan G., Médico Infectólogo, Profesor Titular  
Dra. María Luz Bascuñán R., Psicóloga PhD, Profesor Asociado  
Sra. Karima Yarmuch G., Abogada, Dirección Jurídica, Facultad de Medicina  
Srta. Javiera Cobo R., Nutricionista, Secretaria Ejecutiva  
Prof. Verónica Aliaga C., Kinesióloga, Magíster en Bioética, Profesor Asociado  
Dr. Dante Cáceres L., Médico Veterinario, Doctor en Salud Pública, Profesor Asociado

Ha revisado el Proyecto de Investigación titulado: **“MECHANISM OF CONGENITAL CHAGAS DISEASE: EFFECTIVE PLACENTAL TRYPANOSOMA CRUZI INFECTION DEPENDS ON PARASITE-DERIVED EXOVESICLES”** Cuyo investigador Responsable es la Prof. Ulrike Kemmerling, quien desarrolla labores en el Instituto de Ciencias Biomédicas (ICBM), Facultad de Medicina, Universidad de Chile.

El Comité revisó los siguientes documentos del estudio:

- Proyecto FONDECYT regular 2022 N°1220105
- Curriculum Vitae de los investigadores
- Consentimiento Informado
- Carta de autorización del Establecimiento
  1. Dr. Luis Escobar González, Director Complejo Hospitalario San Jose
- Carta Compromiso del investigador

El proyecto y los documentos señalados en el párrafo precedente han sido analizados a la luz de los postulados de la Declaración de Helsinki, de las Pautas Éticas Internacionales para la Investigación Biomédica en Seres Humanos CIOMS 2016, y de las Guías de Buena Práctica Clínica de ICH 1996.

25|MAY|2022



Teléfono: 29789536 - Email: ceish.med@uchile.cl