



Universidad de Chile
Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas
Departamento de Bioquímica y Biología Celular

**CALRETICULINA DE *Trypanosoma cruzi*: UN FACTOR DE VIRULENCIA
QUE UNIDO EXÓGENAMENTE A EPIMASTIGOTES, PROMUEVE SU
PENETRACIÓN A CÉLULAS HOSPEDERAS**

Memoria para la obtención del Título de Químico Farmacéutico

EDUARDO RODRIGO SOSONIUK ROCHE

Directores de Memoria:
Arturo Ferreira Vigouroux, DVM, PhD
Carolina Valck Calderón, BQ, PhD

Santiago, Chile
2013

*...Dedicado a Minita,
ya que sin su apoyo
este camino hubiera sido
imposible...*

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar quiero agradecer a Mina, mi abuela, ya que tal y como dice la dedicatoria, sin su apoyo a lo largo de toda la carrera, este camino hubiese sido prácticamente imposible. Tanto los momentos alegres como los retos hicieron que el proceso fuese mucho más fácil de llevar.

En segundo lugar, y no por eso menos importante, a Eduardo, Jackie, Martina, Cristóbal y Amanda. Aunque sea una cursilería, siempre se dice que los amigos son la familia que uno escoge, mientras que la familia es la que toca. No obstante, a pesar de todos los altibajos que hemos tenido, sin duda es la mejor familia que alguien podría tener, y la elegiría de nuevo sin pensarlo dos veces. Todos los momentos que vivimos llevaron a que llegase a ser el hombre que soy hoy en día, un hombre del cual espero estén orgullosos. No puedo dejar de incorporar en estos agradecimientos a todo el resto de mi familia. A pesar de vivir bastante alejado de una parte de ellos, el vínculo con todos es algo de una importancia insuperable en mi vida.

A Fabiola, por su amor, apoyo incondicional y necesarios tirones de oreja. Por darme la fuerza para seguir adelante en los momentos complicados del desarrollo de la memoria, impidiéndome bajar los brazos. Por hacer que constantemente extienda mis fronteras, instándome a la autosuperación día a día. Por ayudarme a ser mejor persona. También a su familia, que con el correr del tiempo me han incorporado a su vida como un integrante más.

A los Amigos de la Vida, a CdT+EdM, los del Humanidades, los Bachiamigos, los de Farmacia y los que en este tiempo he hecho en el PDI. Gracias por su apoyo y sus bromas. Las celebraciones, momentos simples, y anécdotas épicas fueron esenciales. Gracias a esos recuerdos, de todos he aprendido algo. Y es gracias a esto que sé que a pesar de la distancia, o el tiempo sin vernos, llevo algo de cada uno de ellos conmigo.

A los profesores Milton Sepúlveda, Antonio Parra, Esteban Olave y al Dr. Guillermo Díaz, por haber sido de una forma u otra un modelo a seguir en lo que respecta a la vida académica.

A mis directores de tesis, los Doctores Arturo Ferreira y Carolina Valck. Gracias por haber apostado por mí, por enseñarme, y por mostrarme el maravilloso mundo de la investigación. El entrenamiento y el conocimiento que me brindaron durante el desarrollo de esta memoria es algo que me acompañará por siempre y que espero tener la oportunidad de transmitir en un futuro no muy lejano.

A Álvaro Rojas, Enrique Moraga, y el laboratorio de los Doctores Norbel Galanti y Gonzalo Cabrera por su apoyo en diversos aspectos técnicos esenciales para el desarrollo de la memoria.

Al Laboratorio de Inmunología de la Agresión Microbiana, conformado por, Gerardo Vallejos, Fernando Vivanco, Ismael Maldonado, Carlos Rosas, Katherine Weinberger, Francisca Coddou, Paula Abello, Javier Pizarro, Lorena Aguilar, Juani Orellana, Ruth Mora, Leonora Duaso, Jaime Peña, Haydeé Gallardo y Andrea González.

A los Drs. Ulrike Kemmerling, Guillermo Díaz y Arturo Ferreira, miembros de la comisión, por su valiosa contribución al desarrollo y escritura de esta memoria.

A los integrantes del Programa disciplinario de Inmunología y del Proyecto de Investigación Asociativa ACT-112 por los diversos aportes realizados en el proceso de desarrollo de esta memoria.

A todos los aquí mencionados y a los que se me pueden llegar a olvidar:
Gracias, Totales.

Este trabajo de tesis fue realizado en el Laboratorio de Inmunología de la Agresión Microbiana, Programa Disciplinario de Inmunología, Instituto de Ciencias Biomédicas, Facultad de Medicina, Universidad de Chile, con el financiamiento del Proyecto de Investigación Asociativa ACT-112 y FONDECYT 1095095.

INDICE

RESUMEN	1
SUMMARY	2
INTRODUCCIÓN	3
1.1 Enfermedad de Chagas:	3
1.2 <i>Trypanosoma cruzi</i> :	4
1.2.1 Ciclo de vida de <i>T. cruzi</i> :.....	5
1.3 Tratamiento Farmacológico de la Enfermedad de Chagas:.....	6
1.4 Calreticulina:.....	9
1.5 Calreticulina de <i>Trypanosoma cruzi</i>	10
1.6 El Sistema del Complemento	12
HIPÓTESIS	14
OBJETIVOS.....	15
1.-... la unión de rTcCRT exógena a la membrana celular de epimastigotes.	15
2.-... el efecto de TcCRT, C1q y de CRT de la célula hospedera murina (MmCRT) sobre la penetración de epimastigotes.	15
2.1.-... la penetración de epimastigotes tratados con rTcCRT y C1q a fibroblastos embrionarios murinos CRT suficientes (MEF K41 CRT +/+).	15
2.2.-... la penetración de epimastigotes tratados con rTcCRT y C1q a fibroblastos embrionarios murinos "knock out" para CRT (MEF K42 CRT -/-).	15
MATERIALES Y MÉTODOS.....	16
1. Cuantificación de la unión de rTcCRT exógena a la membrana celular de epimastigotes	16
1.1. Evaluación funcional de rTcCRT.....	16
1.2. Evaluación funcional de rTcCRT conjugada a Fluoresceína Isotiocianato (FITC):	17
1.3. Unión de F-rTcCRT a epimastigotes cepa Dm28c:.....	17
2.- Cuantificación de los efectos de TcCRT, C1q y de CRT de la célula hospedera murina (MmCRT) sobre la penetración de epimastigotes.....	18
2.1.- Infección de MEF K41, CRT +/+ con epimastigotes tratados con rTcCRT y C1q.	18
2.1.1.- Tinción de núcleos con DAPI.	19
2.2.- Infección de MEF K42 CRT -/- con epimastigotes tratados con rTcCRT y C1q.	19
RESULTADOS	20
1.- rTcCRT exógena se une a la membrana celular de epimastigotes:	20
1.1 - 1.2.- rTcCRT une C1q, y F-rTcCRT no pierde esta función al ser marcada con el fluoróforo.....	20
2.- Cuantificación del efecto de TcCRT, C1q y de CRT de la célula hospedera murina (MmCRT) sobre la internalización de epimastigotes.	23
2.1.- El tratamiento de epimastigotes con rTcCRT, en presencia o ausencia de C1q, aumenta el índice de internalización del parásito en células MEF K41 CRT (+/+) .	23
2.2.- Epimastigotes tratados con rTcCRT y C1q no son internalizados en MEF K42 CRT (-/-).	26
DISCUSIÓN	29
REFERENCIAS.....	34

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: <i>Trypanosoma cruzi</i> presenta tres estadios principales dentro de su ciclo.	4
Figura 2: Representación esquemática del ciclo de vida de <i>T. cruzi</i>	6
Figura 3: Estructura de los distintos fármacos, utilizados o actualmente en estudio, con propiedades anti-tripanosómicas.	8
Figura 4: Esquema de la estructura de Calreticulina.	10
Figura 5: Esquema resumen de las diversas funciones de TcCRT.	11
Figura 6: Activación del Sistema del Complemento.	13
Figura 7: F-rTcCRT conserva la capacidad de unirse a C1q en forma dosis dependiente.	20
Figura 8: TcCRT se une de manera concentración dependiente y específica a la membrana de epimastigotes.	22
Figura 9: Tratamientos de epimastigotes en los ensayos de infección.	23
Figura 10: El tratamiento de epimastigotes con rTcCRT, en presencia o ausencia de C1q, aumenta la internalización del parásito en células MEF K41 CRT (+/+).	25
Figura 11: Los epimastigotes disminuyen su nivel basal de penetración a la célula en ausencia de CRT del hospedero, sin importar el tratamiento recibido.	27
Figura 12: El tratamiento con rTcCRT o rTcCRT, en conjunto con C1q, aumenta la penetración de parásitos en: (A) células MEF K41 (normales) y no en (B) células MEF K42 (CRT deficientes).	28

RESUMEN

La enfermedad de Chagas es una patología endémica en América Latina y sin un tratamiento eficaz, causada por el protozoo hemoflagelado *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*). Es un problema mayor de salud identificándose actualmente entre 8 a 9 millones de infectados, de los cuales aproximadamente un 30% desarrolla sintomatología. Sin embargo, la infección se ha globalizado durante los últimos años, confirmándose sobre 300.000 sero-positivos en Estados Unidos y varias decenas de miles en Europa, Asia y Oceanía. Esto se debe a que, aunque *T. cruzi* es normalmente transmitido por insectos triatomíneos infectados, se ha descrito la transmisión por transfusión sanguínea, trasplante de órganos, infección congénita y consumo de alimentos contaminados con el parásito. En el ciclo de vida de *T. cruzi* se pueden identificar 3 etapas principales: amastigote y epimastigote, que cumplen funciones replicativas en el hospedero mamífero y en el insecto vector respectivamente, y la forma tripomastigote, encargada de infectar células eucariontes. Calreticulina de *T. cruzi* (TcCRT), es una proteína de 45 kDa, aislada, clonada y caracterizada en el Laboratorio de Inmunología de la Agresión Microbiana (LIAM), de la Facultad de Medicina de nuestra Universidad. Se ha demostrado que TcCRT es translocada a la zona de emergencia flagelar de los tripomastigotes, donde captura C1, primer componente de la vía clásica del sistema del complemento. En el humano, esta señal es característica de células apoptóticas. Es por esto que al capturar C1, se reclutan macrófagos para fagocitar a los tripomastigotes. Una vez dentro de estas células, el parásito escapa de la vacuola parasitófora, y comienza a diferenciarse, iniciando el proceso de infección del huésped. Junto a esto, la interacción entre TcCRT y C1 impide la activación del sistema del complemento del hospedero, disminuyendo la lisis del parásito por este medio. Resultados obtenidos previamente en LIAM muestran que TcCRT se expresa marginalmente en la membrana plasmática de la forma epimastigote del clon Dm28c. En base a esto, se propuso como Hipótesis de Trabajo de esta Memoria de Título, que, al incubar epimastigotes con rTcCRT, se promueve su penetración a las células hospederas mamíferas. Los principales resultados obtenidos señalan que: **i)** epimastigotes unen rTcCRT en su membrana, posiblemente mediante alguna proteína que sirva de anclaje, **ii)** el tratamiento con rTcCRT en presencia o ausencia de C1q conlleva a un aumento en la penetración del parásito en fibroblastos que expresan CRT, **iii)** la ausencia de CRT en la membrana de la célula hospedera lleva a una disminución en la penetración de los parásitos. En el contexto del epimastigote, puede que la falta de translocación de TcCRT sea el factor principal para que esta forma presente menor resistencia a lisis por el complemento y falle en desarrollar el ciclo infectivo en el mamífero.

SUMMARY

Chagas' disease is an endemic pathology in Latin America, caused by the hemoflagelated protozoan *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*), and still with no available effective treatment. It has become a major health problem, with 8 - 9 million seropositive people, with 30% of them developing symptoms. In the last few years, the infection has globalized, with 300.000 people infected just in the USA, and tens of thousands in Europe, Asia and Oceania. Although *T. cruzi* is usually transmitted through the bite of *Triatominae* insects, blood transfusion, organ transplants or congenital infection have also been described. In the parasites life cycle, 3 principal different stages are identified: Replicative amastigotes and epimastigotes, present in the mammal host and *Triatominae* vector respectively, and trypomastigotes, which infect eukaryotic cells. *T. cruzi* Calreticulin (TcCRT) is a 45 kDa protein, isolated, cloned and characterized in the Immunology of Microbial Aggression Laboratory (LIAM), Faculty of Medicine, University of Chile. Later, it was demonstrated that TcCRT is translocated from the ER to the flagella emergence zone where it captures C1, the first component of the classical pathway of the complement system. In humans, this interaction is characteristic of apoptotic cells. Once C1 is captured, macrophages are recruited and phagocytose the trypomastigotes. Once inside the cell, the parasites escape the parasitophorous vacuole and start dedifferentiation, leading to the amastigote stages, which will finally differentiate into infective trypomastigotes. Upon TcCRT binding to C1, inhibition of the complement system activation occurs, with a decrease in parasite lysis. According to previous observations in our laboratory, TcCRT is expressed marginally on the plasmatic membrane of the studied epimastigote form. Taken all together, these facts allow us to propose the following Working Hypothesis: Incorporation of exogenously added rTcCRT onto epimastigotes will promote their penetration into mammal hosts cells. The main results obtained show that: **i)** epimastigotes bind rTcCRT to their cellular membrane, by a still unidentified membrane protein that works as an anchor, **ii)** rTcCRT-treated epimastigotes, in the presence or absence of C1q, promote an increase in parasite penetration into CRT expressing fibroblasts and **iii)** the absence of CRT in the host cell correlates with a decrease in parasite penetration. In the epimastigote context, it could be proposed that the lack of TcCRT translocation is an important reason why this form is more easily destroyed by the complement system, and for their incapacity to infect host cells.

INTRODUCCIÓN

1.1 Enfermedad de Chagas:

La Enfermedad de Chagas es una enfermedad crónica y sin un tratamiento totalmente efectivo, identificada por primera vez en 1909 por el Dr. Carlos Chagas (1). Actualmente, es considerada endémica en la región comprendida entre la frontera de México con Estados Unidos y la sexta región de Chile. Se han identificado aproximadamente 8 a 9 millones de infectados en América Latina y el Caribe, de los cuales aproximadamente un 30% desarrolla sintomatología (2). Debido a fenómenos migratorios, entre otros procesos, esta enfermedad ha comenzado a reportarse fuera de la zona endémica, llegando a identificarse cerca de un millón de infectados en EEUU, y cerca de cien mil en el resto del mundo (3).

El agente etiológico es el protozoo intracelular hemoflagelado *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*), que es transmitido a los huéspedes mamíferos a través de la picada de los artrópodos de la familia *Triatominae*, como la Vinchuca. En Chile se han descrito tres especies principales: *Triatoma infestans*, *Mepraia spinolai*, y *Mepraia gajardo*, que transmiten el parásito en los ambientes domiciliario, silvestre y costero, respectivamente (4-6).

Esta enfermedad presenta etapas aguda y crónica (7). La aguda aparece unos pocos días después de la picada. El huésped sufre de fiebre, dolor de cabeza, muscular, y escalofríos. Dentro de la sintomatología inicial, el signo de Romaña es característico, siendo una muestra del sitio de ingreso del parásito al organismo (8). Dura aproximadamente 30 días, donde se puede observar una alta parasitemia y parasitismo celular. La etapa crónica se da en aproximadamente un 30% de los infectados, y presenta una sintomatología y duración variables. Los principales síntomas son cardiomegalia, megacolon, megaesófago, y algún grado de lesiones nerviosas periféricas (9-12).

1.2 *Trypanosoma cruzi*:

T. cruzi es un organismo unicelular, con estructuras características de las células eucariontes. Esto es, núcleo rodeado de membrana, membrana plasmática, aparato de Golgi y retículo endoplásmico (RE). Sin embargo, ha desarrollado ciertos rasgos característicos, como una sola mitocondria y un DNA ligado a una estructura sub-organelar llamada kinetoplasto (12). También presenta vesículas llamadas glicosomas, en donde el parásito realiza la glicólisis. Su citoesqueleto también es característico, ya que presenta microtúbulos y microfilamentos de actina. Éstos últimos presentan un grado de unión a DNAsa I poco frecuente entre eucariontes superiores y aún no se determina de manera adecuada qué estructuras forma (13). Posee un solo flagelo, cuyo largo varía desde 2 hasta sobre los 20 μm , dependiendo de la etapa del ciclo de vida en que se encuentre (12, 14). Dentro del ciclo biológico se identifican principalmente 3 etapas: epimastigote, amastigote, tripomastigote (Fig. 1). La forma epimastigote, está presente solo en el vector triatomino, tiene propiedades replicativas y no desarrolla infección en caso de entrar en contacto con un huésped mamífero. La forma amastigote es replicativa, está presente en el huésped mamífero y participa en el proceso infeccioso (15). Por último, la forma tripomastigote es la forma infecciosa y no replicativa (3, 16). Dependiendo el origen (ya sea epimastigote o amastigote), adquieren características morfológicas distintas (17)

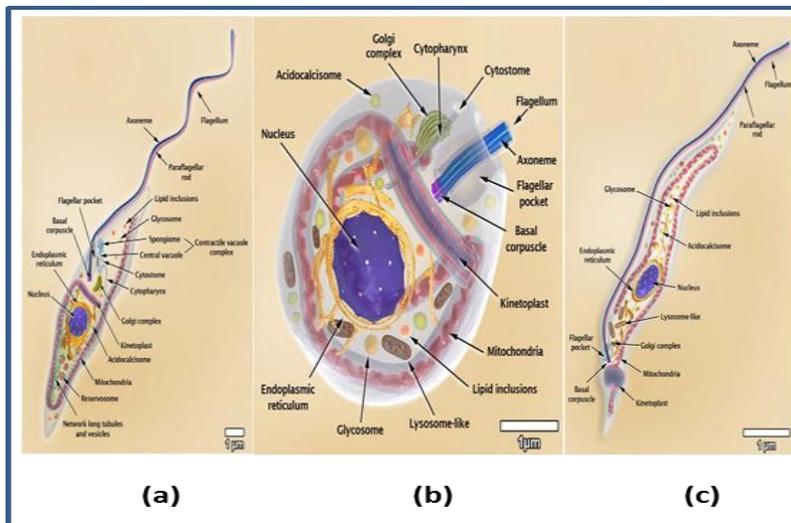


Figura 1: *Trypanosoma cruzi* presenta tres estadios principales dentro de su ciclo. Esquemas 3D de las formas (a) Epimastigote (replicativo, no infeccioso, presente en el vector triatomino), (b) Amastigote (replicativo, en el huésped mamífero) y (c) Tripomastigote (infeccioso no replicativo, tanto en el vector como en el hospedero) Imagen obtenida desde (18). Junto a una diferenciación de su morfología, se aprecian los distintos organelos, y una comparación en su tamaño.

1.2.1 Ciclo de vida de *T. cruzi*:

El ciclo de vida del parásito comienza cuando un vector triatomino se alimenta de un hospedero chagásico, ingiriendo el parásito en su forma de tripomastigote. Una vez en el sistema digestivo de la vinchuca, *T. cruzi* se transforma en epimastigote. Al llegar al sector bajo del intestino grueso, vuelve a transformarse a tripomastigote. Esta forma está presente en las deyecciones de las vinchucas, e ingresa al organismo gracias a algún estímulo mecánico por parte del hospedero, como un rasquido, a través de una herida preexistente o producida por la picadura del vector. Una vez dentro del hospedero, el parásito produce señales que llevan al reclutamiento de macrófagos. Dentro de esta célula, o células vecinas al sitio de ingreso al huésped, y gracias a diversos mecanismos moleculares, el parásito logra escapar de la acción de la vacuola parasitófora, se transforma en amastigote y comienza su replicación. Luego de una cantidad preprogramada de replications por fisión binaria, el parásito pasa a su forma tripomastigote sanguíneo, lisando la célula y expandiéndose en el organismo. Con esto, logra perpetuar la infección en el huésped (Fig. 2) (18, 19).

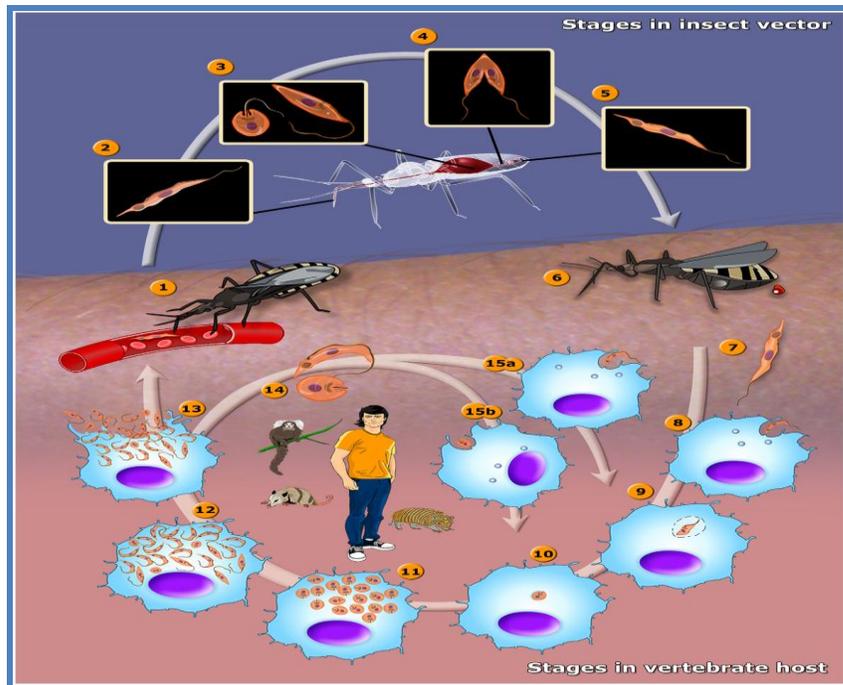


Figura 2: Representación esquemática del ciclo de vida de *T. cruzi*.

El ciclo de vida del parásito es un proceso complejo, que consta de múltiples etapas. Comienza cuando el vector triatominio se alimenta de un huésped contaminado, ingiriendo tripomastigotes desde la sangre del hospedero (1). Los tripomastigotes llegan al tracto gastrointestinal de la vinchuca, donde se transforman en epimastigotes (3) y empiezan su replicación (4). Una vez en el sector bajo del tracto gastrointestinal del insecto vector, los epimastigotes se transforman en tripomastigotes nuevamente (5). Luego, cuando la vinchuca se alimenta otra vez, los tripomastigotes son depositados en las deyecciones (6) y con la ayuda de un estímulo mecánico, ingresan al hospedero por una herida preexistente o la producida por la picada (7). Una vez al interior del hospedero, gracias a diversas señales presentes en el parásito, se reclutan macrófagos (8), el parásito es internalizado por estas células (9), se transforma a amastigote y comienza su replicación (10). Luego de una cantidad de divisiones pre programada (11), pasa a su forma tripomastigote (12), lisa la célula (13) y ocurren dos acontecimientos relevantes. Por una parte, el parásito se disemina a diversos órganos (14), o queda disponible durante la fase aguda de la infección en la sangre para ser ingerido por un insecto hematófago (1). Imagen obtenida desde (18).

1.3 Tratamiento Farmacológico de la Enfermedad de Chagas:

A pesar que la enfermedad de Chagas fue descrita en 1909, recién en la década de los 60 se creó el primer medicamento con actividad anti-tripanosómica, Nifurtimox, desarrollado por Bayer. Luego, en 1974, se produce el Benznidazol, desarrollado por Roche. El tratamiento con estos fármacos está basado en una terapia empírica (20), ya que hasta hace unos años, el mecanismo de acción de ambas drogas era desconocido. En un comienzo se creyó que, en el caso del Nifurtimox, el

mecanismo de acción estaba basado en la formación de especies reactivas de oxígeno y nitrógeno que generaban un ambiente de estrés oxidativo, mientras que el Benznidazol actuaba mediante la formación de metabolitos reactivos (21). Actualmente se sabe que actúan como una prodroga, activada por la enzima parasitaria Nitroreductasa Tripanosomal Tipo I, atacando al parásito con metabolitos activos formados en la reacción de reducción, los que forman aductos con macromoléculas propias del parásito (22-24). Estos dos fármacos son el tratamiento de cabecera para combatir la infección, a pesar de requerirse una dosis muy elevada y poseer severos efectos adversos. En el caso del Benznidazol, por ejemplo, se pueden desarrollar neuropatías, leucopenia o incluso una supresión de la médula ósea (25). Por su parte, la administración de Nifurtimox puede desarrollar efectos adversos como anorexia, pérdida de peso, alteraciones psicológicas, y algunos malestares estomacales, siendo este último de mayor toxicidad (26).

En los últimos años, se han desarrollado compuestos derivados de la familia de los azoles anti-parasitarios, como el Posaconazol que inhibe la C14- α -desmetilasa, (TcCYP51), enzima que participa en la vía de síntesis de esteroides, esenciales para la replicación del parásito (27). Este fármaco se encuentra en ensayo clínico tipo II/III en España pero, debido a su compleja síntesis, el costo de producción es muy elevado, lo que dificulta su distribución en la zona endémica. (28). Fexinidazol es otro fármaco, cuyo mecanismo de acción aún no está del todo claro (29). Estudios recientes muestran que ambas drogas presentan un alto porcentaje de eficacia, y un buen perfil de seguridad, ya que no se han observado efectos adversos en los ensayos realizados (28, 29).

También se han explorado como posibles candidatos fármacos derivados del Tipifarnib, medicamento con propiedades anti-tumorales, que inhibe a CYP51. La desventaja de esta droga es que inhibe la enzima proteínfarnesiltransferasa humana. Sin embargo, se han desarrollado análogos con actividad inhibitoria solo sobre TcCYP51, aunque menos eficaces que el Posaconazol (30, 31).

En la Figura 3 se muestran los distintos fármacos, utilizados o actualmente en estudio, con propiedades anti-tripanosómicas.

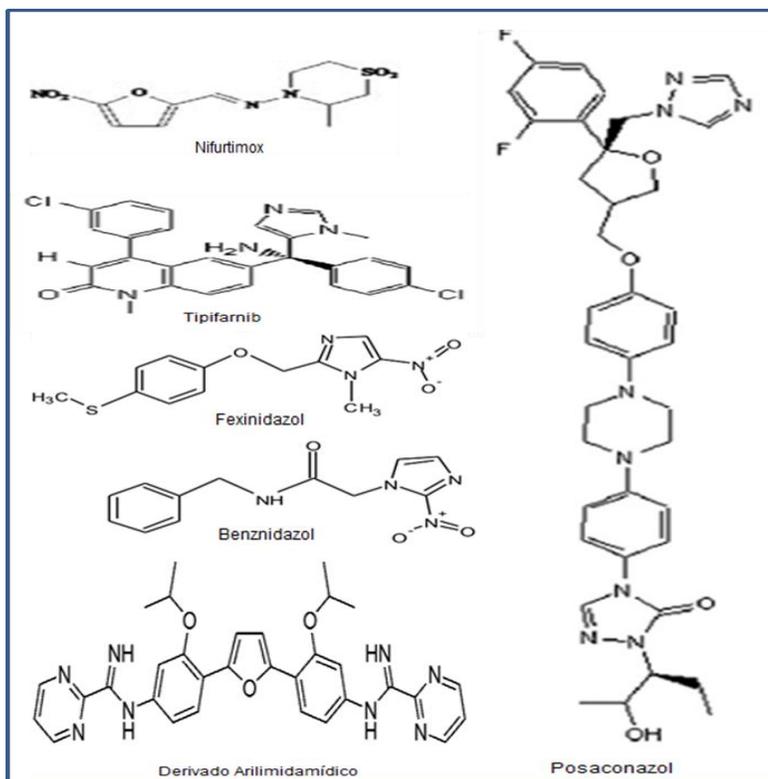


Figura 3: Estructura de los distintos fármacos, utilizados o actualmente en estudio, con propiedades anti-tripanosómicas.

De las estructuras mostradas en la figura, solo el Nifurtimox y el Benznidazol se encuentran disponibles para la venta, a pesar de estar bastante restringida. Fármacos como el Posaconazol y el Fexinidazol se encuentran en fase de estudios clínicos.

Por otra parte, actualmente se encuentran en estudio derivados de amidinas aromáticas, como las arilimidamidas (32), que mejoran características de éstas reduciendo los efectos adversos que presenta, o problemas de solubilidad (33). Los estudios realizados con estos fármacos han mostrado eficacia similar o mayor al Benznidazol en concentraciones menores y un mayor perfil de seguridad al evidenciarse pocos efectos adversos (32, 34, 35).

1.4 Calreticulina:

Calreticulina (CRT) es una proteína altamente conservada y pleiotrópica, que se expresa en todas las células nucleadas de organismos superiores (36), presentando un alto nivel de homología entre distintas especies. Tiene múltiples funciones entre las que se cuenta, actividad de chaperona tipo lectina (37), participación en el proceso de almacenamiento de calcio (38), en la señalización y modulación de la expresión génica (39), y en procesos de remoción de células en apoptosis (40). También es mediadora de autoinmunidad (41), participa en procesos anti-angiogénicos y de inhibición del crecimiento tumoral (42, 43), participa en la actividad de perforinas de células T y NK (44), y presenta unión a C1q (39). Está compuesta por 3 dominios: N, al que se le adjudican las propiedades anti-angiogénicas; P, rico en prolina, y C, carboxi-terminal. Estos últimos dominios son responsables de la capacidad de CRT de modular los niveles celulares de Ca^{+2} (38). También se ha descrito un Subdominio S, responsable de la unión a colas colagenosas de C1q (Fig. 4). En su secuencia aminoacídica presenta una secuencia KEDL de retención en el RE. A pesar de esto, su presencia ha sido ampliamente reportada en otras localizaciones celulares. Así, es posible identificar CRT en gránulos citoplasmáticos de linfocitos T citotóxicos, el acrosoma de espermios, en la superficie celular (unida a CD91) (38, 45), en la glándula salival de *Triatoma infestans* (Weinberger, 2012, resultados no publicados), en la saliva de *Cannis lupus familiaris* (Coddou, 2012, resultados no publicados), o secretada por diversos tipos celulares (45).

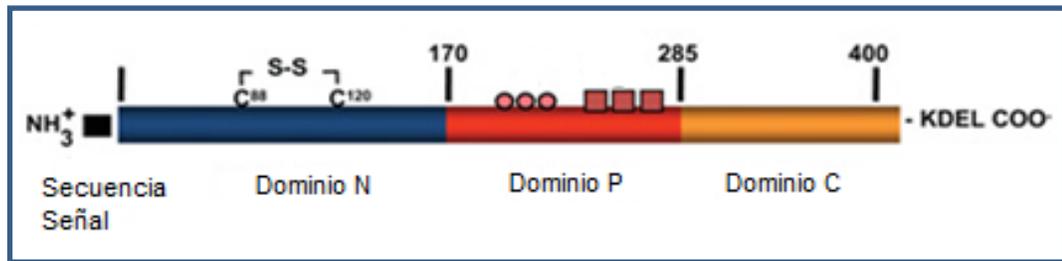


Figura 4: Esquema de la estructura de Calreticulina.

CRT está compuesta por tres dominios principales, N, P y C, siendo estos altamente homólogos entre diversas especies. En el dominio N (azul), posee una secuencia N terminal y en el C terminal (naranja) una secuencia de retención al RE. Posee alta capacidad de unión a calcio en su dominio P (rojo), y su dominio S (no descrito en la imagen) es el principal responsable de la interacción de CRT con la porción colagenosa de C1q. Imagen modificada de (46).

1.5 Calreticulina de *Trypanosoma cruzi*.

Calreticulina de *T. cruzi* (TcCRT), es una proteína de 45 kDa (47), aislada, clonada y caracterizada en el Laboratorio de Inmunología de la Agresión Microbiana (LIAM), ICBM, Facultad de Medicina, de nuestra Universidad (47-50). En su secuencia se han descrito los mismos dominios (N, P, C y S) con funciones similares a los presentes en CRT humana. *In vitro*, se ha observado que TcCRT es translocada, desde el RE, a la zona de emergencia flagelar en los tripomastigotes, donde, gracias a su dominio S, captura C1 (51), primer componente de la vía clásica del sistema del complemento. La interacción de TcCRT con las colas colagenosas de C1q inhibe la activación de C1, impidiendo la iniciación de esta vía (51, 52). Éste, constituye un mecanismo de los tripomastigotes para resistir la lisis mediada por el sistema del complemento de su hospedero. Adicionalmente, la unión de C1q a TcCRT en la superficie de los tripomastigotes produce un aumento de la infectividad (53), ya que imitan una señal fisiológica de remoción de células en apoptosis. Las células en apoptosis exponen CRT en su membrana. Al unir C1q, se genera una señal “eat me” que es reconocida por los macrófagos, a través de su CRT (también translocada a la superficie celular) (54-56) con lo que eliminan a la célula en apoptosis mediante fagocitosis (57). En consecuencia, la unión de TcCRT a C1q en los tripomastigotes le permite al parásito evadir la lisis mediada por el complemento y aumentar su

infectividad (51). Una vez fagocitado el parásito, escapa de la vacuola fagocitaria y continúa el ciclo. Es por esto que TcCRT es considerada un factor importante en el proceso de infección del parásito. Esto queda confirmado al bloquear TcCRT con fragmentos $F(ab')_2$ anti-rTcCRT, ya que la internalización de los parásitos por macrófagos disminuye considerablemente (58). Recientemente, se ha logrado la disminución en la expresión de TcCRT mediante modificaciones genéticas en epimastigotes (hemialélicos). Estos muestran una disminución de la resistencia a la lisis por el sistema del complemento o en sus niveles de replicación y transformación al estadio tripomastigote (metacicloogénesis) (59). En la Figura 5 se muestra un resumen de las funciones de TcCRT.

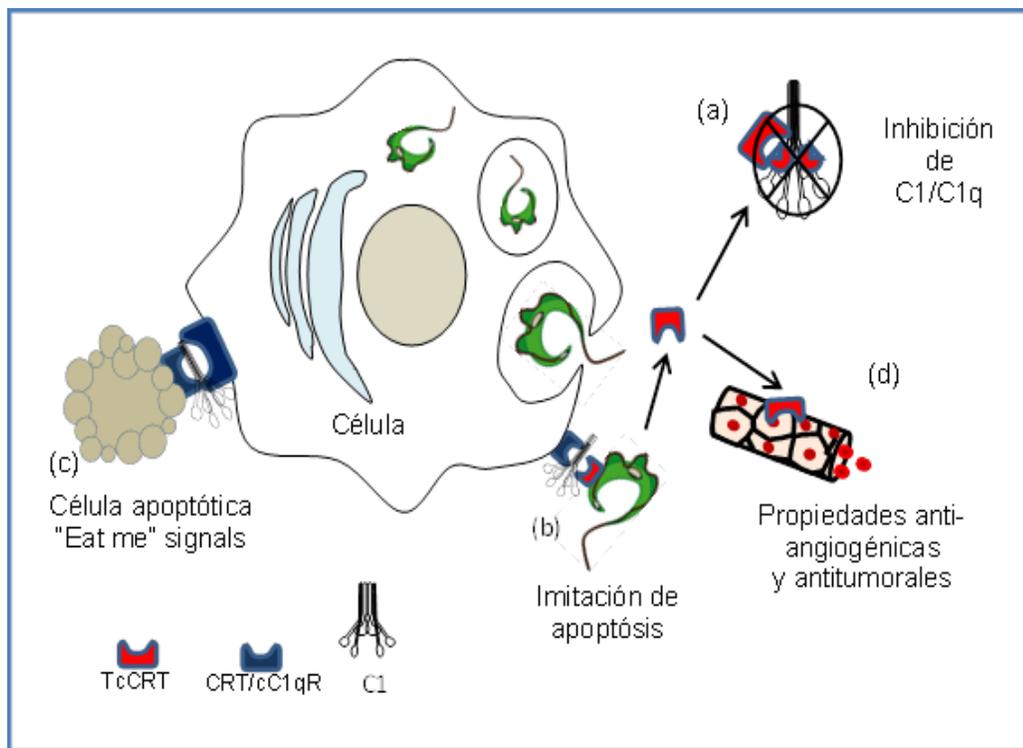


Figura 5: Esquema resumen de las diversas funciones de TcCRT.

Hasta el momento se han descrito funciones anti-tumorales, anti-angiogénicas, de inhibición del sistema del complemento y de imitación de apoptosis para TcCRT. Algunas de estas funciones ocurren gracias a la capacidad de CRT de interactuar con las colas colagenosas de C1. Modificado desde (53).

1.6 El Sistema del Complemento

El Sistema del Complemento está constituido por más de 40 proteínas séricas e integrales de membranas celulares. Su activación ocurre a través de tres vías. Todas ellas se activan porque poseen mecanismos para reconocer distintas señales de peligro. En la vía clásica, el primer componente C1 se activa al detectar complejos antígeno-anticuerpo ubicados a una distancia crítica, siendo por ello efectora de la inmunidad humoral. La vía de las lectinas involucra el reconocimiento de carbohidratos específicos en la superficie de patógenos a través de MBL (lectina que une manosa por sus siglas en inglés) y Ficolinas, y la activación subsiguiente de serino proteasas asociadas (MASPs). La vía alterna no involucra el reconocimiento de moléculas específicas, ya que se activa principalmente por reconocer como señal de peligro la ausencia de ácido siálico en la superficie de una variedad de agresores (60, 61).

Se describirá la activación de la vía clásica, porque su primer componente (C1) es relevante en la línea central de este trabajo (51, 52, 58). Esta vía se inicia por la unión de C1¹ a complejos inmunes mediante la porción globular de C1q (Fig. 6). Esta unión genera un cambio conformacional en la región colagenosa de C1q que conduce a la activación de las serino proteasas C1r y C1s (62). Luego, C1s activado digiere a C4, generando un fragmento C4a soluble y un fragmento C4b que, unido covalentemente a la membrana del agresor, actúa como atrayente de C2b, también activado por C1s, formándose así la convertasa clásica de C3 (C4b,2b). Posteriormente, esta convertasa, a través de C2b, digiere a C3, generando los fragmentos C3a y C3b. El fragmento C3b se asocia con C4b,2b, uniéndose también covalentemente a la membrana, para formar la convertasa clásica de C5 (C4b,2b,3b), la que inicia la activación de los componentes C5-C9 y formación del complejo de ataque a membranas (MAC) (63).

¹ C1 ó C1q 2(r, s), corresponde a C1q, asociado a las serino-proteasas

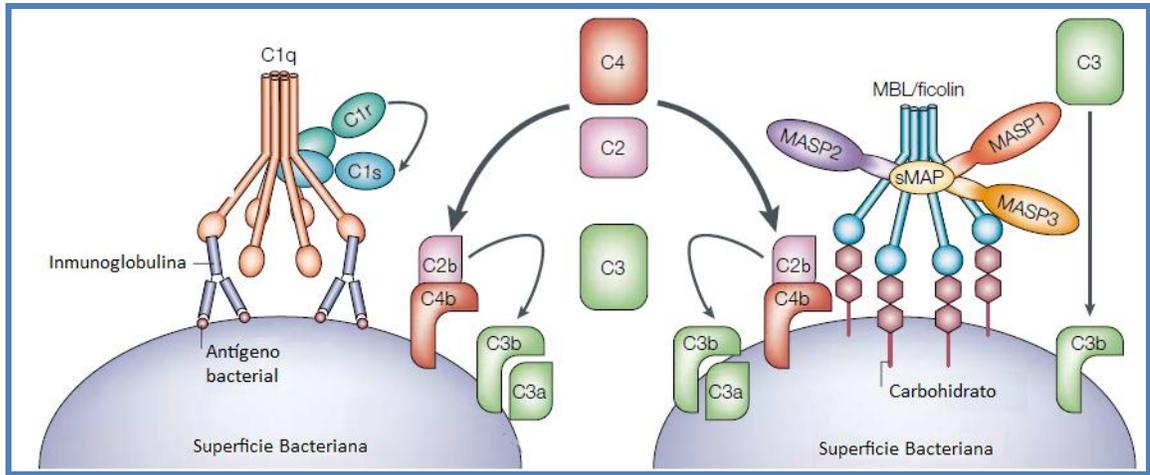


Figura 6: Activación del Sistema del Complemento.
Ver texto para descripción de vía clásica (63).

TcCRT es expresada normalmente a nivel citoplasmático en epimastigotes. Sin embargo, es notorio e importante para este trabajo el que, de acuerdo a nuestros estudios, TcCRT no se expresa en la membrana plasmática de epimastigotes de las cepas MF, Tulahuén y del clon Dm28, o lo hace muy marginalmente (58). Esto podría explicar, al menos parcialmente, la alta sensibilidad que tienen los epimastigotes a la lisis por el sistema del complemento (64).

HIPÓTESIS

Calreticulina recombinante de *Trypanosoma cruzi*, al unirse exógenamente a la membrana celular de epimastigotes, promueve la penetración de éstos a células hospederas.

OBJETIVOS

General

Contribuir al conocimiento de la participación de Calreticulina de *Trypanosoma cruzi* en el proceso de infectividad del parásito.

Específicos. Proponemos cuantificar:

1.-... la unión de rTcCRT exógena a la membrana celular de epimastigotes.

2.-... el efecto de TcCRT, C1q y de CRT de la célula hospedera murina (MmCRT) sobre la penetración de epimastigotes.

2.1.-... la penetración de epimastigotes tratados con rTcCRT y C1q a fibroblastos embrionarios murinos CRT suficientes (MEF K41 CRT +/+).

2.2.-... la penetración de epimastigotes tratados con rTcCRT y C1q a fibroblastos embrionarios murinos "knock out" para CRT (MEF K42 CRT -/-).

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Cuantificación de la unión de rTcCRT exógena a la membrana celular de epimastigotes:

1.1. Evaluación funcional de rTcCRT: Se sensibilizaron placas de microtitulación de cloruro de polivinilo (PVC) con 100 μ l/pocillo de rTcCRT (5 μ g/ml) y se incubaron durante toda la noche a 4°C. Luego, los sitios activos remanentes se bloquearon con 200 μ l/pocillo de solución PBS 1x/BSA 1% por 2 horas a 37°C y se lavaron cuatro veces con 250 μ l/pocillo de PBS 1x/Tween-20 0,05%. Las placas así sensibilizadas fueron incubadas con distintas diluciones de C1q en tampón Veronal (VB^{2+}) (sal sódica de ácido 5,5-dietilbarbitúrico 5 mM, NaCl 140 mM, $MgCl_2$ 0,5 mM, $CaCl_2$ 0,15 mM), durante 1 hora a 37°C. Después de lavar como se mencionó antes, la unión de C1q humano se detectó mediante anticuerpo de conejo anti-C1q humano (1/4.000 en PBS 1x/BSA 1%) (DAKO, USA) y anticuerpo de cabra anti-Ig de conejo-peroxidasa (1/10.000 en PBS 1x/BSA 1%) (DAKO, USA). Como sustrato se utilizó ABTS y se detectó la reacción colorimétrica a 405 nm. Como controles se incluyeron pocillos: **i)**... sin rTcCRT, **ii)**... sensibilizados con rTcCRT (detectado con anticuerpos de conejo anti-rTcCRT (1/4.000 en PBS 1x/BSA 1%) (obtenido según metodología previamente descrita (65)) y anticuerpos de cabra anti-Ig de conejo-peroxidasa (1/10.000 en PBS 1x/BSA 1%) (DAKO, USA), **iii)**... sensibilizados con C1q (detectado con anticuerpos de conejo anti-HuC1q (1/4.000 en PBS 1x/BSA 1%) (DAKO, USA), seguido de anticuerpos de cabra anti-Ig de conejo-peroxidasa (1/10.000 en PBS 1x/BSA 1%) (DAKO, USA). Los datos fueron analizados mediante prueba de t de una cola, no pareado. El análisis fue realizado con el software GraphPad Prism 5.

1.2. Evaluación funcional de rTcCRT conjugada a Fluoresceína Isotiocianato

(FITC): Se conjugó rTcCRT con FITC mediante el uso de un kit comercial (FluoReporter® FITC Protein labeling kit, Invitrogen, USA). 100µl/pocillo (5µg/ml) de la rTcCRT conjugada a FITC (F-rTcCRT) fue utilizada para sensibilizar placas de microtitulación de PVC. Luego de incubar toda la noche a 4°C, los sitios activos remanentes se bloquearon con 200 µl/pocillo de solución PBS 1x/BSA 1% por 2 horas a 37°C. Posteriormente, las placas fueron lavadas cuatro veces con 250 µl/pocillo de PBS 1x/Tween-20 0,05%. Las placas sensibilizadas con F-rTcCRT se incubaron con distintas diluciones de C1q en tampón VB²⁺, durante 1 hora a 37°C. Después de lavar como se mencionó antes, la unión de C1q humano se detectó mediante anticuerpos de conejo anti-C1q humano (1/4.000 en PBS 1x/BSA 1%) (DAKO, USA) y anticuerpos de cabra anti-Ig de conejo-peroxidasa (1/10.000 en PBS 1x/BSA 1%) (DAKO, USA). Como sustrato se utilizó ABTS y se detectó la reacción colorimétrica a 405 nm. Como controles se incluyeron pocillos: **i)**... sin F-rTcCRT, **ii)**... sensibilizados con F-rTcCRT y detectados con anticuerpos de conejo anti-rTcCRT (obtenido según metodología descrita previamente (65)) (1/4.000 en PBS 1x/BSA 1%), y anticuerpos de cabra anti-Ig de conejo-peroxidasa (1/10.000 en PBS 1x/BSA 1%) (DAKO, USA), **iii)**... sensibilizados con C1q y detectados con anticuerpos de conejo anti-C1q (1/4.000 en PBS 1x/BSA 1%) (DAKO, USA), y anticuerpos de cabra anti-Ig de conejo-peroxidasa (1/10.000 en PBS 1x/BSA 1%) (DAKO, USA). Los datos fueron analizados mediante prueba de t de una cola, no pareado. El análisis fue realizado con el software GraphPad Prism 5.

1.3. Unión de F-rTcCRT a epimastigotes cepa Dm28c: Los parásitos fueron obtenidos desde cultivos axénicos (cultivos de un solo tipo de parásito proveniente de una sola célula, en ausencia de células hospederas). La unión de F-rTcCRT a la superficie de los epimastigotes se analizó mediante citometría de flujo (FACScan, BD Biosciences). Para esto, los parásitos se lavaron dos veces con PBS 1x/BSA 2% mediante centrifugación a 450 g por 5 minutos a 4°C. Después del último lavado, los parásitos se resuspendieron en PBS 1x/BSA 2% y se incubaron con F-rTcCRT (3 µg de F-rTcCRT/5x10⁵ parásitos) durante 30 minutos a temperatura ambiente (volumen final de 50 µl). Posteriormente, los parásitos se lavaron 3 veces mediante

centrifugación como se describió previamente. Antes de realizar los análisis, se adicionaron 100 µl de buffer FACS a cada muestra y se adquirieron 10.000 eventos por muestra. Como controles se incluyeron parásitos en condiciones nativas y ensayos de competencia entre rTcCRT y F-rTcCRT. En el ensayo de competencia se empleó una concentración base de 3 µg de F-rTcCRT/5x10⁵ parásitos, y se mezcló 3 µg de F-rTcCRT con 3, 6, 9 y 12 µg de rTcCRT. Los resultados se analizaron estadísticamente mediante prueba de t de una cola, no pareado. Para analizar las lecturas del citómetro se utilizó el software FCS Express 4 Flow Research Edition, y para el análisis estadístico GraphPad Prism 5.

2.- Cuantificación de los efectos de TcCRT, C1q y de CRT de la célula hospedera murina (MmCRT) sobre la penetración de epimastigotes.

2.1.- Infección de MEF K41, CRT +/+ con epimastigotes tratados con rTcCRT y C1q.

Se realizó mediante metodología descrita anteriormente (58). Las células K41 (Donación del Dr. Marek Michalak, University of Alberta, Canada) fueron cultivadas en medio DMEM (SIGMA, USA), suplementado con Suero Fetal Bovino (SFB) 10%, L-Glutamina 2 mM y penicilina/estreptomomicina, a 37°C, en atmósfera de 5% de CO₂. Se incubaron 10⁶ epimastigotes: a)... sin tratamiento, b)... con 6 µg de rTcCRT, c)... con 10 µg de C1q, d)... con 6 µg de rTcCRT, seguido de 10 µg de C1q, e)... con 6 µg de rTcCRT seguido de 15 µg de fragmento F(ab')₂ de anticuerpo policlonal de conejo anti-rTcS, y 10 µg de C1q f)... con 6 µg de rTcCRT, seguido de 15 µg de fragmento F(ab')₂ de anticuerpo policlonal de conejo anti-rTcS, g)... con 15 µg de fragmento F(ab')₂ de anticuerpo policlonal de conejo anti-rTcS, h)... con 15 µg de fragmento F(ab')₂ de anticuerpo policlonal de conejo anti-rTcS seguido de 10 µg C1q. Todos los ensayos se incubaron 30 min, a temperatura ambiente. Entre cada condición los parásitos se lavaron mediante centrifugación con PBS 1x/BSA 2%. Posteriormente, se incubaron con MEF K41 CRT +/+ en razón 10/1 (1.000.000 parásitos/100.000 células) durante 4 horas a 37°C en atmósfera de 5% de CO₂. Los parásitos no internalizados se removieron mediante lavados exhaustivos con PBS 1x y se tiñeron los núcleos con

DAPI según metodología descrita en 2.1.1. Los resultados se observaron mediante microscopía de fluorescencia (Nikon Eclipse E400) y se contaron el número de parásitos internalizados por 100 células por cada condición. Los resultados se analizaron mediante prueba de t de una cola, no pareado. El análisis estadístico de los datos fue realizado con el software GraphPad Prism 5.

2.1.1.- Tinción de núcleos con DAPI. Las muestras se fijaron con metanol frío al 90% durante 20 min a 4°C. Se lavó 2 veces con PBS 1x y se incubó con solución DAPI (1 mg/ml) diluido 1/1000 en buffer para DAPI durante 2 min a temperatura ambiente. Después de lavar 1 vez con PBS 1x, las células se montaron en portaobjetos para ver fluorescencia. Los resultados se observaron mediante microscopio de fluorescencia.

2.2.- Infección de MEF K42 CRT -/- con epimastigotes tratados con rTcCRT y C1q. Se realizó mediante metodología descrita anteriormente (58). Los MEF K42 CRT -/- (Donación del Dr. Marek Michalak, University of Alberta, Canada) fueron cultivadas en medio DMEM, en un diseño experimental que implica los mismos grupos, condiciones y tratamiento estadístico descritos en 2.1.

RESULTADOS

1.- rTcCRT exógena se une a la membrana celular de epimastigotes:

1.1 - 1.2.- rTcCRT une C1q, y F-rTcCRT no pierde esta función al ser marcada con el fluoróforo.

Como se describió anteriormente, TcCRT une C1q a través de las porciones colagenosas de este último. Utilizamos este criterio para evaluar si la conjugación con el fluoróforo (FITC) altera la funcionalidad de la proteína.

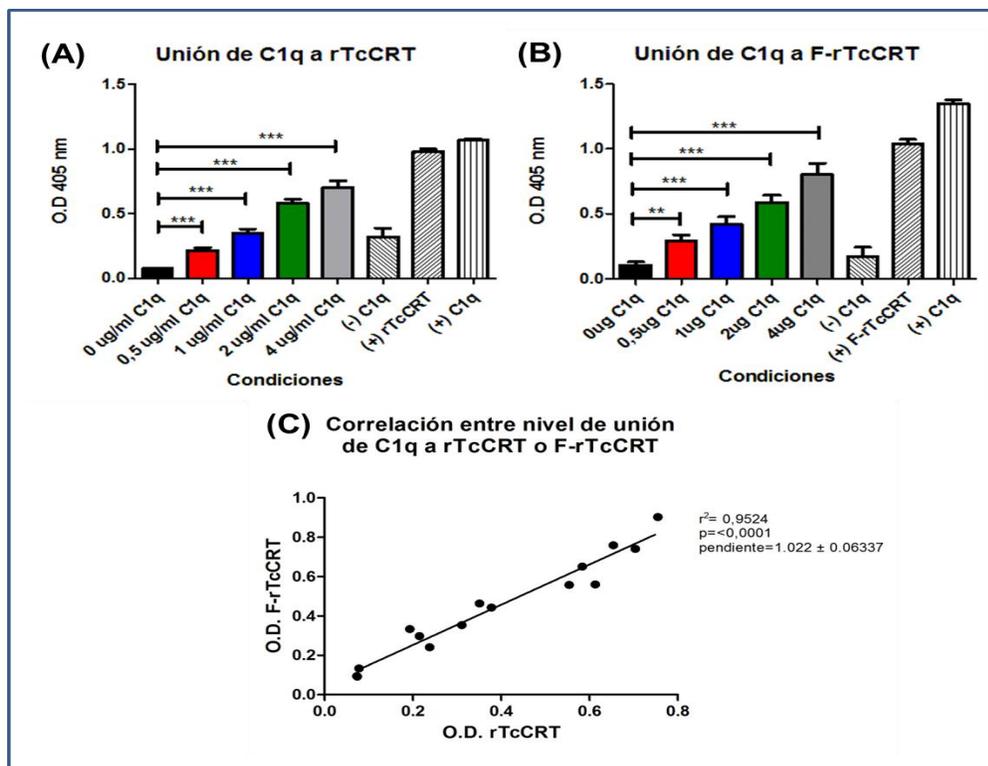


Figura 7: F-rTcCRT conserva la capacidad de unirse a C1q en forma dosis dependiente.

Se evaluó la capacidad de unión de rTcCRT y F-rTcCRT a C1q mediante ELISA. Placas de microtitulación fueron sensibilizadas con rTcCRT (A) o F-rTcCRT (B) y posteriormente incubadas con concentraciones crecientes de C1q. La unión de C1q a rTcCRT se detectó con anticuerpo anti-IgG de conejo conjugado a peroxidasa. Como control negativo se usaron pocillos sin rTcCRT y como controles positivos se sensibilizaron con rTcCRT, F-rTcCRT o C1q, según correspondiese. Las barras representan un ensayo en triplicado, indicando el error medio. Los datos fueron analizados mediante prueba de t de una cola, no pareada. En (C) se muestra la correlación de ambos ensayos.

Tal como estaba descrito (51), en la Figura 7.A observamos que a una concentración fija de rTcCRT, la incubación con cantidades crecientes de C1q lleva a una mayor detección de esta proteína. A su vez, en la figura 7.B observamos que la marcación con FITC no alteró la capacidad funcional de TcCRT de unir C1q. Por lo tanto, podemos afirmar que la unión del fluoróforo a rTcCRT no altera la capacidad de la proteína parasitaria de unirse a las porciones colagenosas de C1q. Por esto, utilizamos F-rTcCRT (rTcCRT unida a FITC) para evaluar su adhesión a la membrana celular de epimastigotes clon Dm28c. En la Figura 7.C se muestra una correlación entre ambos ensayos, siendo el coeficiente de correlación 0,9524, con un $p < 0,0001$, indicando que en este ensayo el uso de cualquiera de los receptores solubles, es equivalente en cuanto a sus capacidades de unir C1q.

1.3.- F-rTcCRT se une a la membrana de epimastigotes clon Dm28c:

Una vez confirmada la funcionalidad de F-rTcCRT, determinamos que ésta se une a la membrana celular de los epimastigotes, de manera concentración dependiente (Figura 8.A). Por otra parte, al elegir una concentración determinada de F-rTcCRT, y luego enfrentarla a concentraciones crecientes de rTcCRT se observa que ambas compiten por un receptor de membrana, lo que conduce a la disminución de la unión de F-rTcCRT y por consiguiente, a una disminución de la intensidad de fluorescencia observada (Figura 8.B).

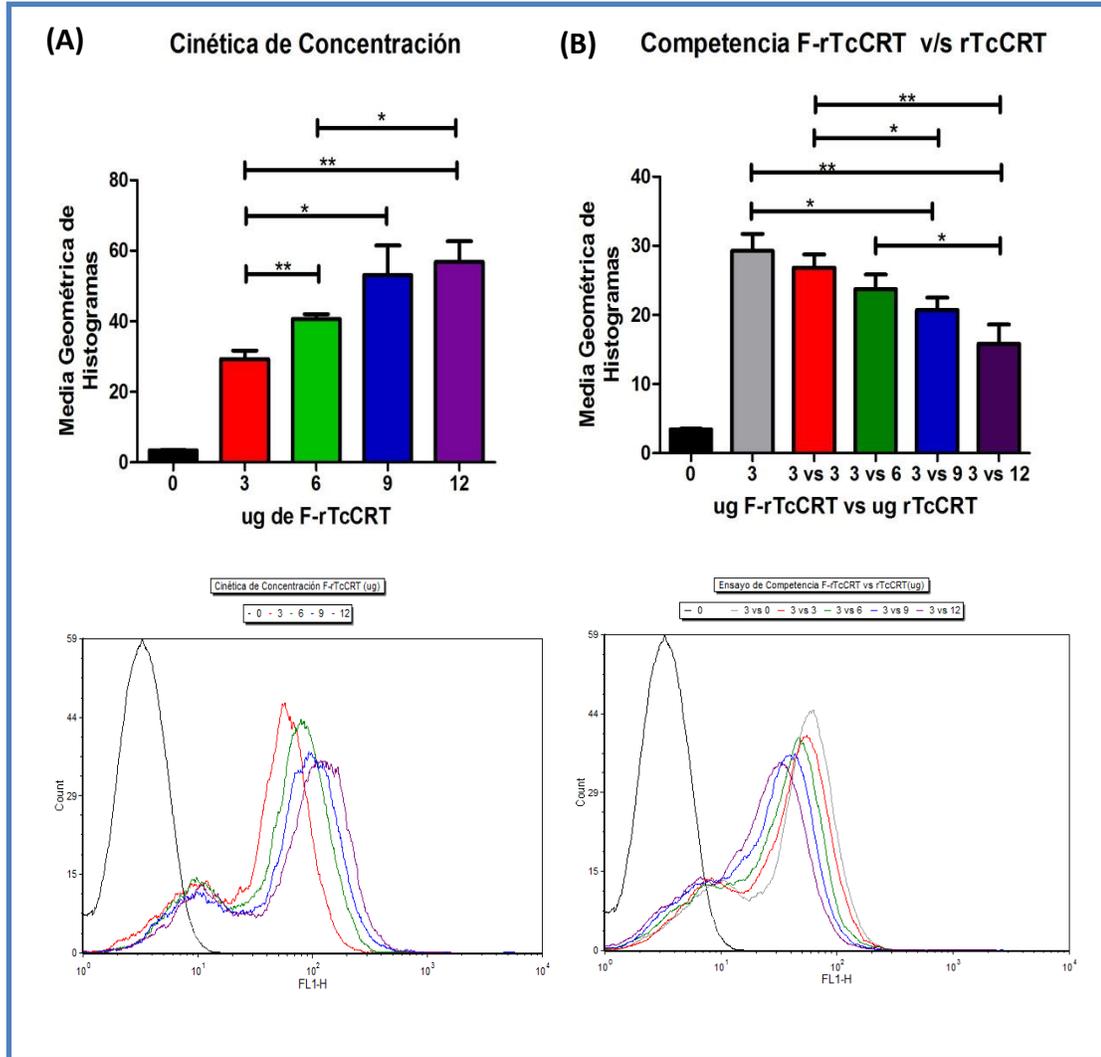


Figura 8: TcCRT se une de manera concentración dependiente y específica a la membrana de epimastigotes. Mediante citometría de flujo se evaluó la unión directa de rTcCRT a la membrana de epimastigotes. **(A)** Curva de concentraciones crecientes de F-rTcCRT. **(B)** En una concentración fija de F-rTcCRT, mayores niveles de rTcCRT disminuyen su unión con la membrana. Los gráficos de barras representan la media geométrica de las lecturas obtenidas, y son representativos de tres experimentos realizados en duplicado. Los datos fueron analizados con t de una cola. Se muestra el error medio.

2.- Cuantificación del efecto de TcCRT, C1q y de CRT de la célula hospedera murina (MmCRT) sobre la internalización de epimastigotes.

2.1.- El tratamiento de epimastigotes con rTcCRT, en presencia o ausencia de C1q, aumenta el índice de internalización del parásito en células MEF K41 CRT (+/+)

Una vez que se confirmó que rTcCRT se une a la membrana de epimastigotes, se realizaron los ensayos de infección. Los grupos de tratamiento se muestran en la Figura 9.

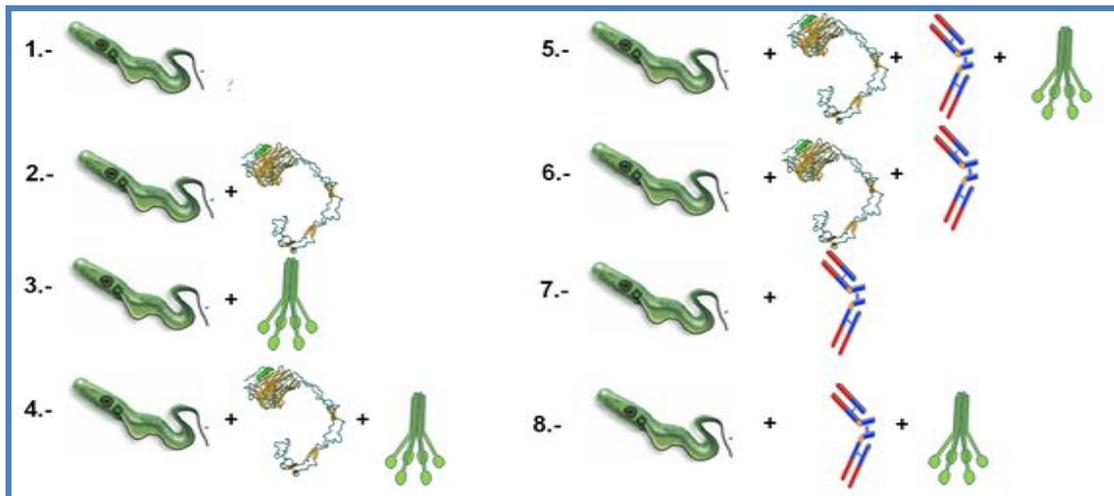
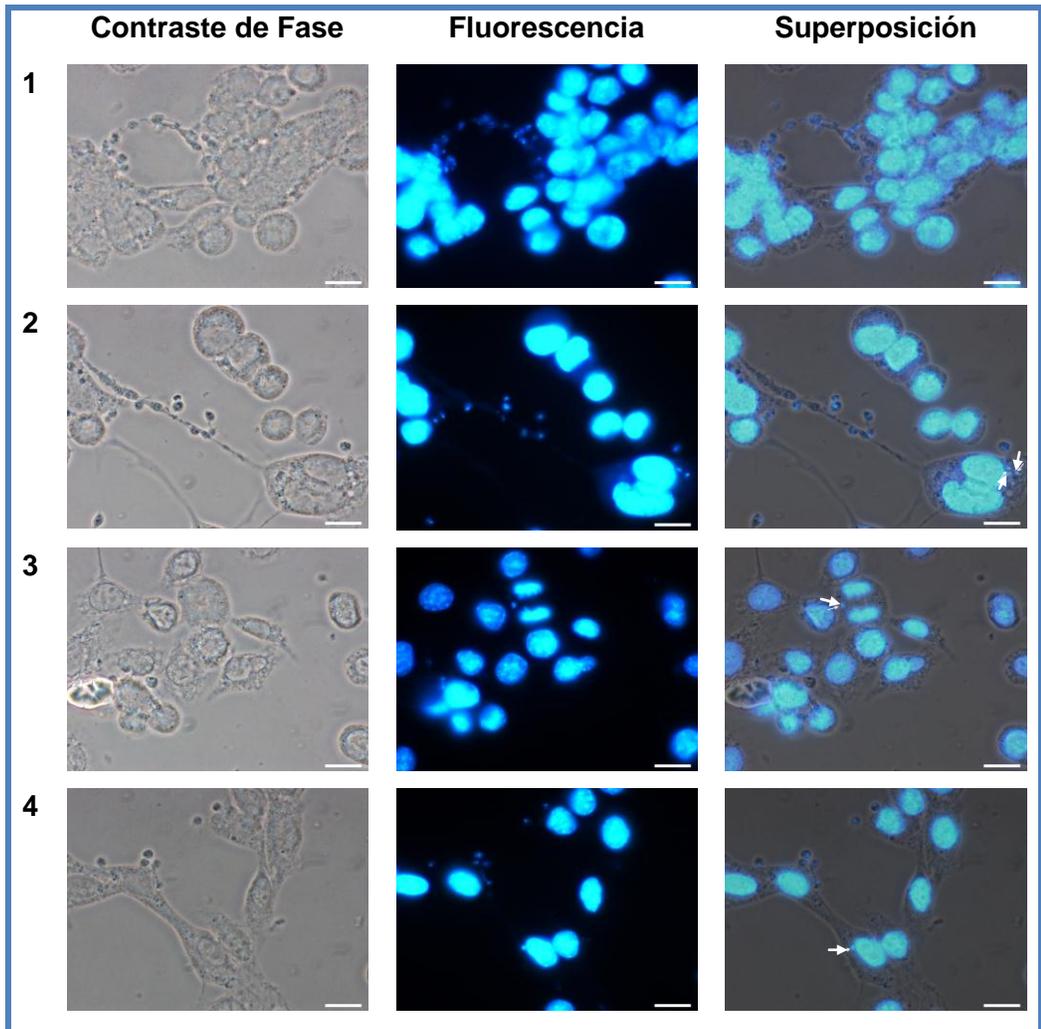


Figura 9: Tratamientos de epimastigotes en los ensayos de infección.

Los parásitos fueron tratados de manera secuencial con: **(2)** rTcCRT; **(3)** C1q; **(4)** rTcCRT + C1q; **(5)** rTcCRT + F(ab')₂ α-rTcS + C1q; **(6)** rTcCRT + F(ab')₂ α-rTcS; **(7)** F(ab')₂ α-rTcS; or **(8)** F(ab')₂ α-rTcS + C1q.

La internalización de los epimastigotes, tratados de acuerdo a la Fig 9, en los fibroblastos murinos, se observó por microscopía de fluorescencia. Se utilizó la tinción de núcleos con DAPI, que marca tanto los núcleos de la célula hospedera como del parásito, y se cuantificaron las células con al menos un parásito en su interior. Para contabilizar un parásito internalizado, se consideraron tanto su cercanía al núcleo, como la intensidad de la fluorescencia. Si en contraste de fase el parásito se observa por fuera de la célula, esta señal no se contabiliza. En las Figuras 10.A y 10.B se muestran fotos representativas de los ensayos de microscopía.

A.



B.

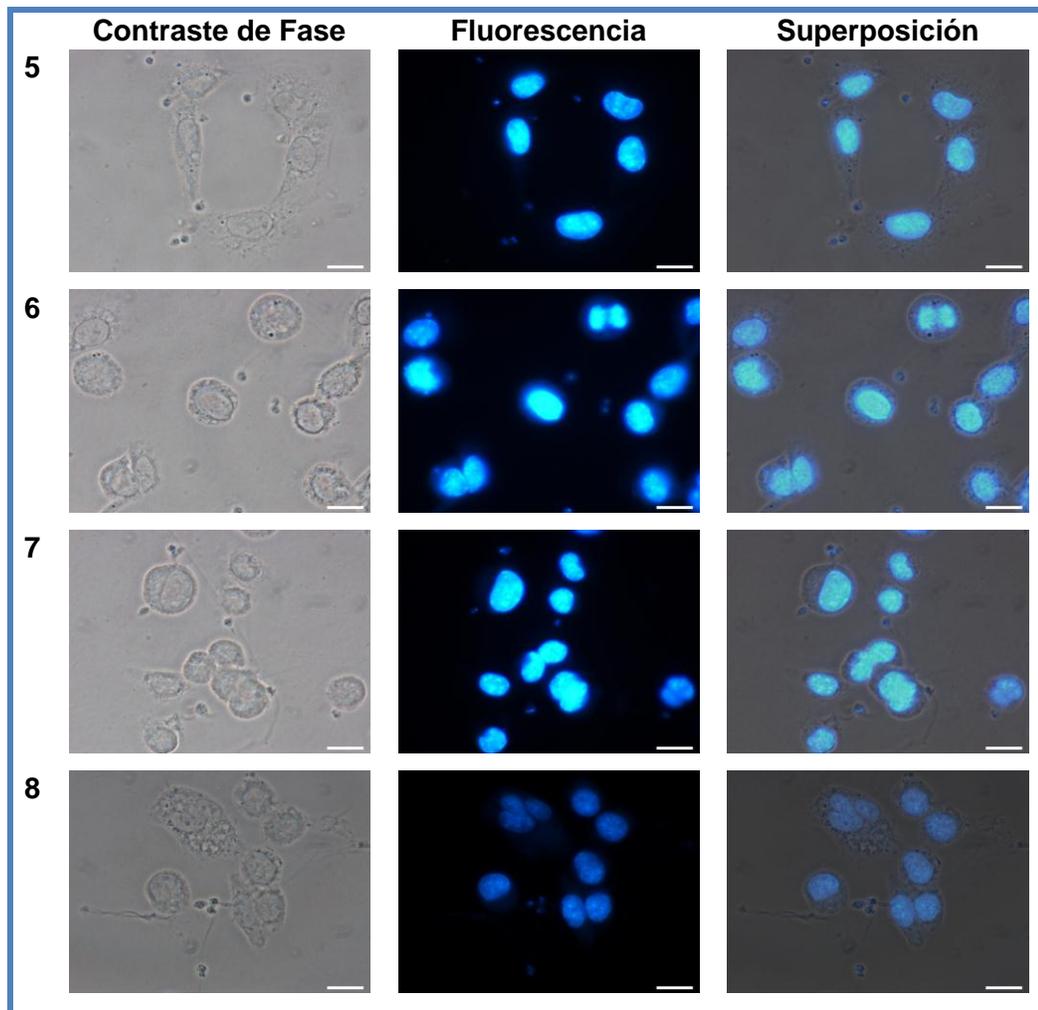


Figura 10: El tratamiento de epimastigotes con rTcCRT, en presencia o ausencia de C1q, aumenta la internalización del parásito en células MEF K41 CRT (+/+).

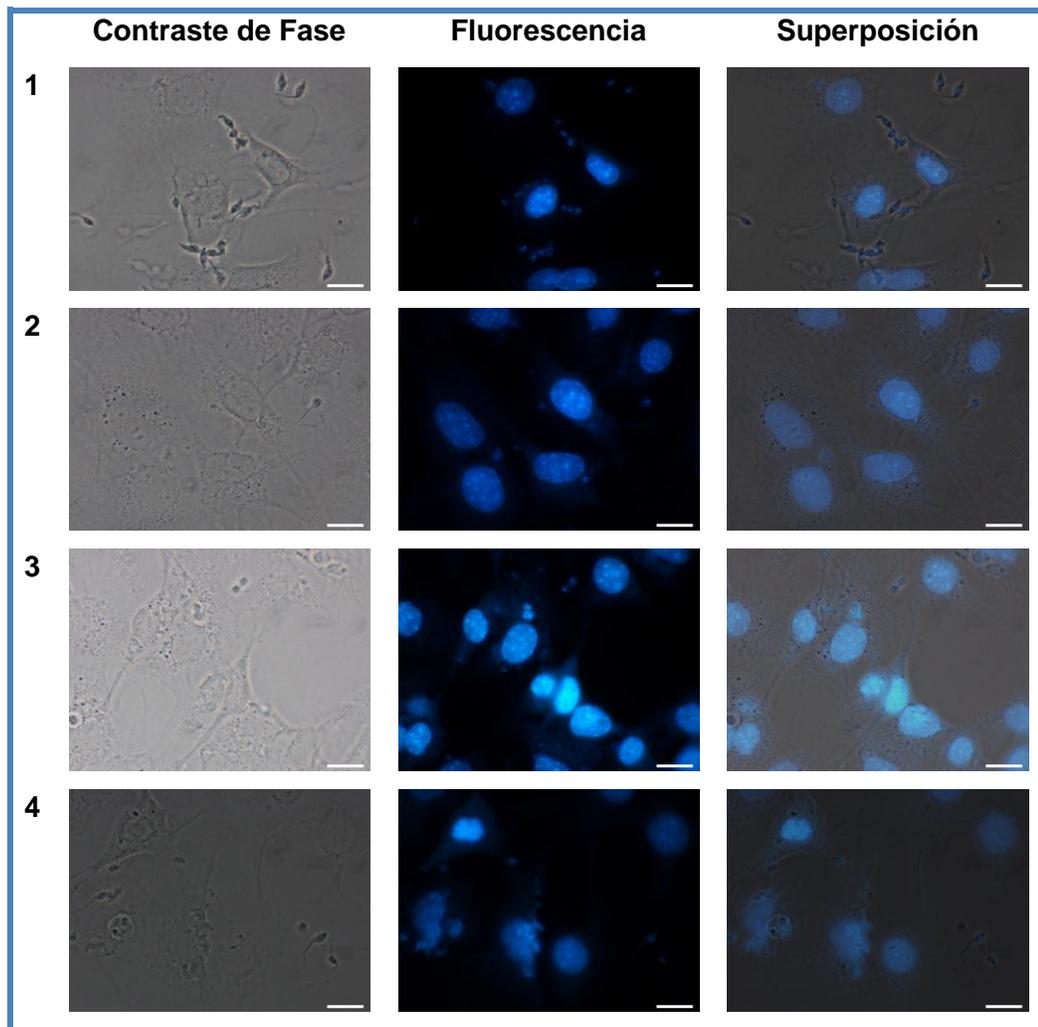
Los epimastigotes fueron tratados como se describió en la figura 9, para luego ser puestos en contacto con células MEF K41. Las muestras fueron fijadas y teñidas con DAPI. Las imágenes son representativas de 3 experimentos individuales. En (A) se muestran los grupos correspondientes a los tratamientos 1-4 y en (B), los tratamientos 5-8 de la figura 9. Las flechas indican epimastigotes internalizados. El largo de la barra corresponde a 10 μ m.

Así se observa que, cuando los epimastigotes son tratados con rTcCRT ya sea en presencia o ausencia de C1q, su penetración a células hospederas aumenta. Este aumento es revertido por la acción de F(ab')₂ anti-dominio S de TcCRT, anticuerpo que inhibe la unión de C1q.

2.2.- Epimastigotes tratados con rTcCRT y C1q no son internalizados en MEF K42 CRT (-/-).

Hemos propuesto que, en el proceso infectivo de *T. cruzi*, C1q actúa como un puente entre CRT parasitaria y del hospedero. Para probar esto en el contexto de epimastigotes, se trabajó con células MEF K42 CRT^{-/-} (66), manteniendo los mismos grupos descritos previamente (Figura 9).

A.



B.

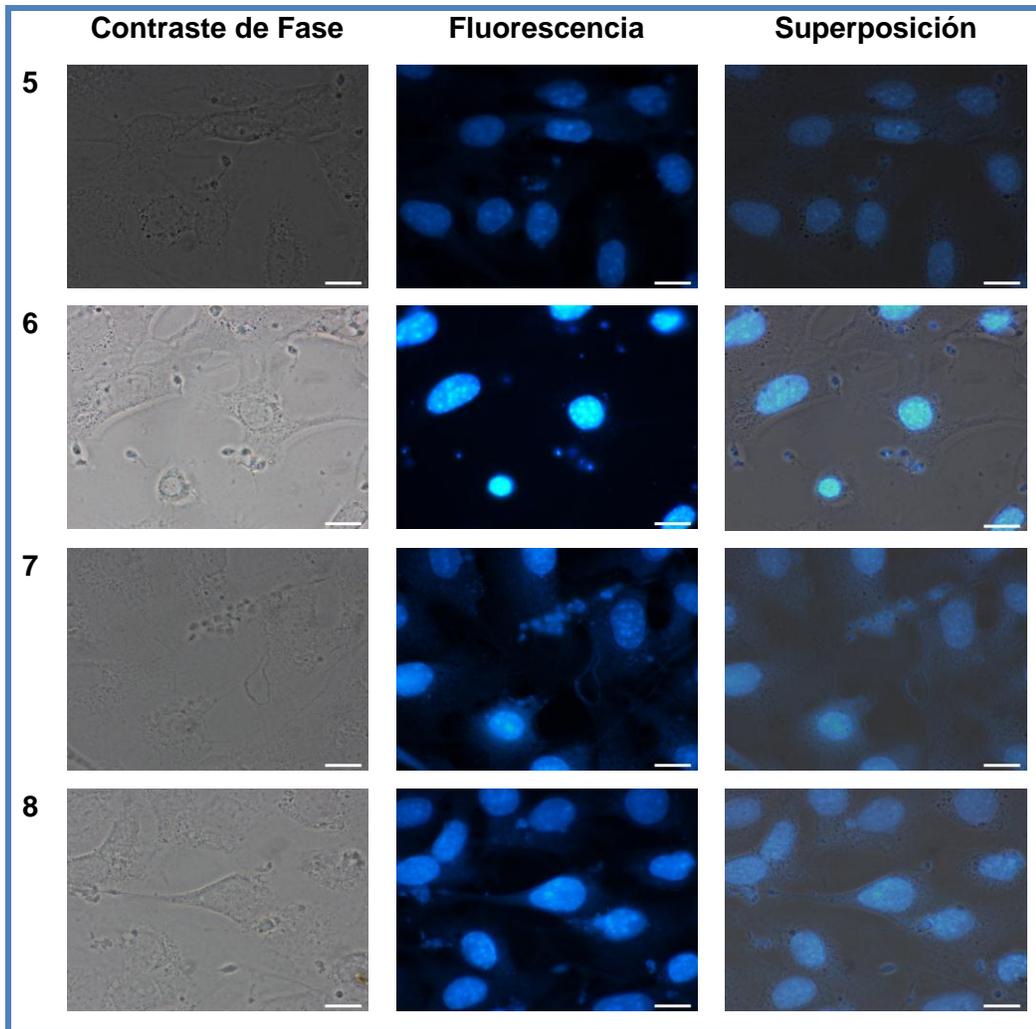


Figura 11: Los epimastigotes disminuyen su nivel basal de penetración a la célula en ausencia de CRT del hospedero, sin importar el tratamiento recibido.

Los epimastigotes fueron tratados como se describió en la figura 9, para luego ser puestos en contacto con células MEF K42 (deficientes en CRT). Luego, las muestras fueron fijadas y teñidas con DAPI. Las imágenes son representativas de 3 experimentos individuales. En (A) se muestran los grupos correspondientes a los tratamientos 1-4 y, en (B), los tratamientos 5-8 de la figura 9. El largo de la barra corresponde a 10 μ m.

Contrario a lo observado en los fibroblastos K41, en esta línea celular la falta de CRT lleva a una disminución en la tasa de internalización de parásitos. Más aún, los distintos tratamientos no conllevan ninguna modificación en el proceso de penetración. Al realizar la cuantificación relativa los ensayos realizados en el objetivo 2, se obtiene el siguiente gráfico comparativo (Fig. 12).

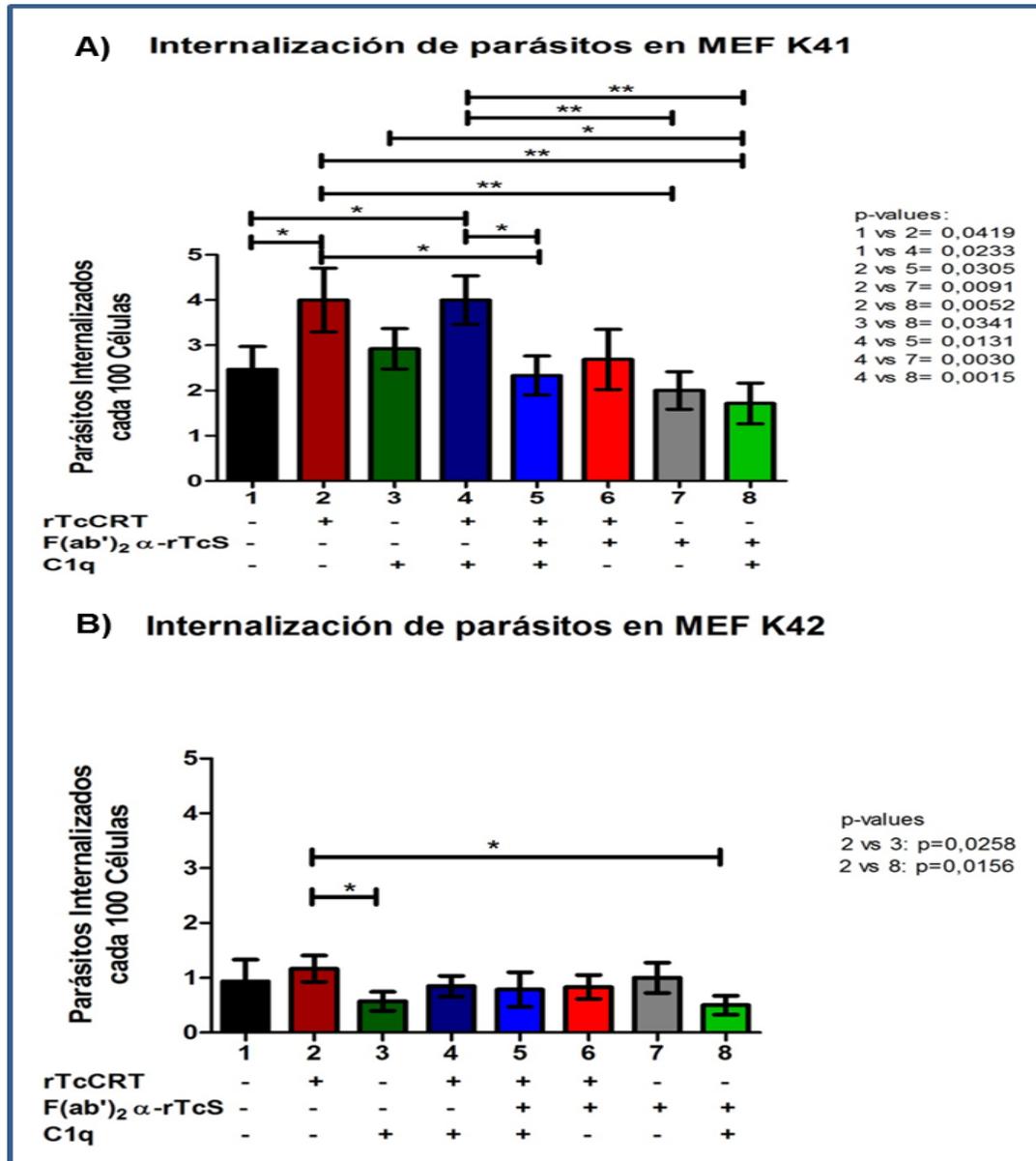


Figura 12: El tratamiento con rTcCRT o rTcCRT, en conjunto con C1q, aumenta la penetración de parásitos en: (A) células MEF K41 (normales) y no en (B) células MEF K42 (CRT deficientes).

La internalización de los parásitos fue evaluada por microscopía de fluorescencia, por tinción con DAPI. Las barras indican el número de parásitos internalizados cada 100 células, y representa un triplicado del ensayo. Los datos fueron analizados por prueba de t de una cola, y se indica el error medio estándar.

En el caso de las células MEF K42, la falta de Calreticulina lleva a una disminución en la internalización basal observada en epimastigotes Dm28c, al compararla con los fibroblastos K41 CRT suficientes. Además, los distintos tratamientos no producen cambios en la tasa de internalización.

DISCUSIÓN

El proceso de infección de *T. cruzi* es altamente complejo, mediado por numerosas moléculas tanto de membrana como del citoplasma del parásito. De acuerdo a resultados previos del Laboratorio de Inmunología de la Agresión Microbiana (LIAM) se ha descrito que dentro de toda la gama de moléculas presentes en los parásitos, Calreticulina (TcCRT), gracias a su capacidad de capturar C1q, da cuenta de un alto porcentaje de la capacidad de infección del tripomastigote (58).

Una vez que se describió TcCRT (47), se detectó que una de las principales diferencias entre epimastigotes y tripomastigotes (no infectivos e infectivos, respectivamente), era la zona donde podía detectarse esta proteína. Mientras que en la forma tripomastigote se encuentra tanto intra como extracelular, especialmente en la zona de emergencia flagelar, en la forma epimastigote la expresión de TcCRT en membrana es marginal o ausente (51, 58).

Considerando la importancia de TcCRT en el proceso infectivo (58), y dado que el epimastigote es una forma no infectiva (67), exploramos si la falta o baja expresión de TcCRT en la membrana celular de epimastigotes de *T. cruzi* clon Dm28c, contribuye a su falta de infectividad.

Dado el hecho de que la secuencia aminoacídica de TcCRT no presenta dominio de transmembrana, fue necesario confirmar que la falta de TcCRT en la superficie del parásito se debía a un problema de translocación y no a la falta de una molécula de anclaje necesaria para completar el proceso de unión a la membrana. Para evaluar si esta proteína se une a la membrana celular de la forma epimastigote, se marcó rTcCRT con FITC (F-rTcCRT). Como la unión del fluoróforo a la proteína podía modificar su funcionalidad, evaluamos si ésta aún mantenía su capacidad funcional de unir C1q (Figura 7.A y 7.B). Esto fue adicionalmente validado mediante

correlación entre ambos ensayos (Figura 7.C). Observamos que la unión de FITC a rTcCRT no influye en la funcionalidad de rTcCRT.

Al realizar los ensayos de unión del F-rTcCRT a la superficie celular de los epimastigotes, observamos que TcCRT recombinante se une a epimastigotes, clon Dm28c (Figura 8). En consecuencia, esta forma parasitaria presentaría en su membrana celular moléculas que permiten la unión de rTcCRT. Más aún, la unión de rTcCRT a los epimastigotes es concentración dependiente (Figura 8.A) y específica, ya que observamos competencia entre F-rTcCRT y rTcCRT, (disminución gradual de la intensidad del fluoróforo a medida que aumentaba la concentración de rTcCRT) (Figura 8.B). Como se mencionó anteriormente, se han descrito proteínas de membrana a las cuales se une CRT, como Integrinas $\alpha 2\beta 1$ (68). Considerando la homología de CRT en diversas especies, la molécula de epimastigotes que une TcCRT podría homologarse putativamente con CD91, receptor de CRT descrito en humanos (56).

Una de las principales limitaciones de este trabajo, es que al no haber sido realizado en ciego, hay un grado de subjetividad en el análisis. La gran laboriosidad implicada (60 campos por grupo experimental, en triplicado y en dos líneas celulares hospederas distintas, sumando entonces un total de 7500 fotos aproximadamente), dificultó el diseñar un experimento de lectura doble ciego. Esta incertidumbre puede eliminarse, al usar técnicas como qPCR o Citometría de Flujo. En el caso del qPCR, y basado en lo observado en las imágenes tomadas por microscopía, la cantidad de DNA parasitario presente en las muestras no sería necesariamente representativa ya que, a pesar de lavados exhaustivos, algunos parásitos permanecían adheridos a la placa o a las células. En citometría de flujo, sería necesario encontrar un anticuerpo para identificar y marcar una proteína propia del parásito y que no interfiera en su ciclo infectivo.

En el desarrollo de los ensayos de infección *in vitro* de células mamíferas se pudo observar que los epimastigotes mostraron un cierto nivel de penetración basal a estas líneas celulares. Si bien esto es contrario a lo descrito para esta forma

parasitaria, podría proponerse que esta penetración *in vivo* sería difícil de lograr, ya que los epimastigotes son lisados por el sistema del complemento del hospedero.

El tratamiento con rTcCRT, en presencia o ausencia de C1q, conduce a un aumento significativo en la penetración a células mamíferas respecto a la población parasitaria sin tratamiento alguno. El alto índice de penetración en presencia sólo de rTcCRT (Figura 12.A) puede explicarse debido a que en el SFB inactivado por calor, podría existir una proporción de C1q bovino que permanezca estructuralmente intacto. El proceso de inactivación del SFB por calor es efectivo en inactivar la funcionalidad del sistema del complemento, ya que actúa sobre proteínas termolábiles de la vía, tal como C2. Es por esto que en este grupo experimental, existe la posibilidad de que rTcCRT capture C1q desde el suero inactivado por calor y lo ocupe para iniciar la penetración de células mamíferas *in vitro*.

Previamente, demostramos que la unión de C1q con TcCRT se realiza a través del dominio S de la proteína parasitaria (51). Es por esto que utilizamos fragmentos $F(ab')_2$ de anticuerpo anti-dominio S recombinante de TcCRT (rTcS) para demostrar que rTcCRT actúa como factor de virulencia en la infección mediada por C1. Como se muestra en la Figura 12.A, al preincubar los parásitos con $F(ab')_2$ anti-rTcS, la unión de C1q se bloquea, y la penetración parasitaria vuelve a niveles basales. No fue posible observar este efecto al tratar los parásitos con rTcCRT y los fragmentos $F(ab')_2$ de anticuerpo anti-rTcS. Esto podría deberse al empleo de una concentración más baja de la necesaria para bloquear todas las moléculas de rTcCRT en la superficie del parásito. La titulación necesaria para evitar esto fue omitida debido a la gran laboriosidad y tiempo requerido.

Por otra parte, en las células MEF K42, "knock out" para CRT, se observa que la penetración basal de los epimastigotes disminuye en comparación a la penetración a MEF K41 (Figura 12.B). Adicionalmente, los distintos tratamientos no conllevan una diferencia en la tasa de internalización parasitaria en esta línea celular.

Lamentablemente, en este estadio del estudio aún no se puede hablar de proceso infectivo. Para definir que los epimastigotes tratados con TcCRT exógena, conjuntamente con C1q (humano, o bovino) son infectivos, éstos no solamente debieran penetrar *in vitro* células como MEF K41, Vero, o Raw 264.7 (líneas celulares cuyos protocolos de infección con tripomastigotes están ya establecidos), sino también continuar el proceso de diferenciación a amastigotes y luego a tripomastigotes infectantes.

Otro de los puntos importantes a considerar en el desarrollo de este trabajo es la posible presencia de tripomastigotes en el cultivo de epimastigotes. Se ha visto que en cultivos axénicos envejecidos de epimastigotes, una parte de los parásitos se transforma a tripomastigote (69). Para descartar esto, al recibir los parásitos lo primero que se hizo fue contabilizarlos y evaluar por microscopía simple la existencia de la forma infectiva en la muestra. Junto a esto, en las fotos realizadas para los objetivos 2.1 y 2.2, se vio que, a pesar de los lavados exhaustivos, algunos parásitos permanecían adheridos a los cubreobjetos donde estaban las muestras. Sin embargo, ninguno de los parásitos observados era morfológicamente tripomastigote.

En la línea celular MEF K42, la falta de CRT conlleva a una citología bastante particular, ya que presentan un gran número de vacuolas en su citoplasma. Estas vacuolas son muy similares a las vacuolas con parásitos de las células MEF K41. Sin embargo, al comparar células “infectadas” con células “sin infectar”, gran parte de las marcas observadas resultaron ser falsos positivos, por lo que fueron obviadas en el análisis final.

En síntesis, proponemos que los resultados principales obtenidos en el desarrollo de esta Tesis satisfacen la Hipótesis propuesta (*TcCRT recombinante (rTcCRT), al unirse exógenamente a la membrana celular de epimastigotes, aumenta su penetración a células hospederas*), ya que: **i)** epimastigotes unen rTcCRT a su membrana, **ii)** epimastigotes aumentan su penetración a células CRT suficientes, mediado por la interacción con rTcCRT y C1q, y **iii)** en células CRT deficientes, los

epimastigotes disminuyen su tasa de penetración a células, sin importar el tipo de tratamiento realizado en ellos.

Finalmente, es posible que los epimastigotes vean truncada su capacidad infectiva debido, entre otras posibilidades aún no definidas, a una falla en el proceso de translocación de TcCRT, posiblemente como consecuencia de alguna característica propia del estadio en que se encuentran.

Esta idea queda de cierta forma respaldada porque epimastigotes de la cepa TCC semialélicos para TcCRT (*TcCRT+/-*) o que sobreexpresan el gen (*TcCRT+ / + / +*) presentan menor o mayor resistencia a la lisis por el complemento, respectivamente (59). Más recientemente, en concordancia con los resultados presentados aquí, pero fuera del contexto de esta Memoria de Título, hemos determinado que la infectividad de estas formas parasitarias transgénicas se correlaciona bien con la expresión de TcCRT (Sánchez *et al*, 2013, Manuscrito en preparación).

REFERENCIAS

1. Chagas C. Nova tripanozomíase humana: Estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi* n. gen., n. sp., agente etiológico de nova entidade morbida do homem. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*. 1909(1):159-218.
2. Hotez PJ, Dumonteil E, Woc-Colburn L, Serpa JA, Bezek S, Edwards MS, et al. Chagas disease: "the new HIV/AIDS of the Americas". *PLoS neglected tropical diseases*. 2012;6(5):e1498.
3. Coura JR, Vinas PA. Chagas disease: a new worldwide challenge. *Nature*. 2010;465(7301):S6-7.
4. Canals M, Bustamante RO, Ehrenfeld MH, Cattán PE. Assessing the impact of disease vectors on animal populations. *Acta biotheoretica*. 1998;46(4):337-45.
5. Canals M, Ehrenfeld M, Cattán PE. [Situation of *Mepraia spinolai*, a wild vector for Chagas disease in Chile, in relation to others vectors from the perspective of their feeding profile]. *Revista medica de Chile*. 2000;128(10):1108-12.
6. Ordenes H, Ehrenfeld M, Cattán PE, Canals M. [Tripano-triatomíne infection of *Triatoma spinolai* in a zone with epidemiological risk]. *Revista medica de Chile*. 1996;124(9):1053-7.
7. Chagas C. Nova entidade morbida do homem: Resumo geral de estudos etiológicos e clínicos. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*. 1911(3):219-75.
8. Rassi A, Jr., Rassi A, Marin-Neto JA. Chagas disease. *Lancet*. 2010;375(9723):1388-402.
9. Dias JC. The indeterminate form of human chronic Chagas' disease A clinical epidemiological review. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 1989;22(3):147-56.
10. Apt W, Arribada A, Sandoval J, Ugarte JM. [Chagas cardiomyopathy: an epidemiological, clinical and electrocardiographic survey in the Limari Valley (Chile) (author's transl)]. *Revista medica de Chile*. 1980;108(3):203-9.
11. Arribada A, Apt W, Aguilera X, Solari A, Sandoval J. [Chagas cardiopathy in the first region of Chile. Clinical, epidemiologic, and parasitologic study]. *Revista medica de Chile*. 1990;118(8):846-54.
12. de Souza W. A short review on the morphology of *Trypanosoma cruzi*: from 1909 to 1999. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*. 1999;94 Suppl 1:17-36.
13. De Souza W. Basic cell biology of *Trypanosoma cruzi*. *Current pharmaceutical design*. 2002;8(4):269-85.
14. de Souza W. Cell biology of *Trypanosoma cruzi*. *International review of cytology*. 1984;86:197-283.
15. Ley V, Andrews NW, Robbins ES, Nussenzweig V. Amastigotes of *Trypanosoma cruzi* sustain an infective cycle in mammalian cells. *The Journal of experimental medicine*. 1988;168(2):649-59.

16. Brener Z. Biology of *Trypanosoma cruzi*. Annual review of microbiology. 1973;27:347-82.
17. da Silva AM, Brodskyn CI, Takehara HA, Mota I. Comparison between the antigenic composition of bloodstream and cell culture-derived trypomastigotes of *Trypanosoma cruzi*. Brazilian journal of medical and biological research = Revista brasileira de pesquisas medicas e biologicas / Sociedade Brasileira de Biofisica [et al]. 1988;21(5):991-3.
18. Teixeira DE, Benchimol M, Crepaldi PH, de Souza W. Interactive multimedia to teach the life cycle of *Trypanosoma cruzi*, the causative agent of Chagas disease. PLoS neglected tropical diseases. 2012;6(8):e1749.
19. De Souza W. From the cell biology to the development of new chemotherapeutic approaches against trypanosomatids: dreams and reality. Kinetoplastid biology and disease. 2002;1(1):3.
20. Steverding D, Tyler KM. Novel antitrypanosomal agents. Expert opinion on investigational drugs. 2005;14(8):939-55.
21. Maya JD, Cassels BK, Iturriaga-Vasquez P, Ferreira J, Faundez M, Galanti N, et al. Mode of action of natural and synthetic drugs against *Trypanosoma cruzi* and their interaction with the mammalian host. Comparative biochemistry and physiology Part A, Molecular & integrative physiology. 2007;146(4):601-20.
22. Hall BS, Bot C, Wilkinson SR. Nifurtimox activation by trypanosomal type I nitroreductases generates cytotoxic nitrile metabolites. The Journal of biological chemistry. 2011;286(15):13088-95.
23. Hall BS, Wilkinson SR. Activation of benznidazole by trypanosomal type I nitroreductases results in glyoxal formation. Antimicrobial agents and chemotherapy. 2012;56(1):115-23.
24. Wilkinson SR, Taylor MC, Horn D, Kelly JM, Cheeseman I. A mechanism for cross-resistance to nifurtimox and benznidazole in trypanosomes. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 2008;105(13):5022-7.
25. Rassi A, Jr., Rassi A, Marcondes de Rezende J. American trypanosomiasis (Chagas disease). Infectious disease clinics of North America. 2012;26(2):275-91.
26. Rodrigues Coura J, de Castro SL. A critical review on Chagas disease chemotherapy. Memorias do Instituto Oswaldo Cruz. 2002;97(1):3-24.
27. Urbina JA. Ergosterol biosynthesis and drug development for Chagas disease. Memorias do Instituto Oswaldo Cruz. 2009;104 Suppl 1:311-8.
28. Clayton J. Chagas disease: pushing through the pipeline. Nature. 2010;465(7301):S12-5.
29. Torreele E, Bourdin Trunz B, Tweats D, Kaiser M, Brun R, Mazue G, et al. Fexinidazole--a new oral nitroimidazole drug candidate entering clinical development for the treatment of sleeping sickness. PLoS neglected tropical diseases. 2010;4(12):e923.
30. Buckner FS, Bahia MT, Suryadevara PK, White KL, Shackelford DM, Chennamaneni NK, et al. Pharmacological characterization, structural studies, and in vivo activities of anti-Chagas disease lead compounds derived from tipifarnib. Antimicrobial agents and chemotherapy. 2012;56(9):4914-21.

31. Hucke O, Gelb MH, Verlinde CL, Buckner FS. The protein farnesyltransferase inhibitor Tipifarnib as a new lead for the development of drugs against Chagas disease. *Journal of medicinal chemistry*. 2005;48(17):5415-8.
32. Batista Dda G, Batista MM, de Oliveira GM, do Amaral PB, Lannes-Vieira J, Britto CC, et al. Arylimidamide DB766, a potential chemotherapeutic candidate for Chagas' disease treatment. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2010;54(7):2940-52.
33. de Souza EM, Oliveira GM, Soeiro Mde N. Electrocardiographic findings in acutely and chronically *T. cruzi*-infected mice treated by a phenyl-substituted analogue of furamidine DB569. *Drug target insights*. 2007;2:61-9.
34. Molina J, Martins-Filho O, Brener Z, Romanha AJ, Loebenberg D, Urbina JA. Activities of the triazole derivative SCH 56592 (posaconazole) against drug-resistant strains of the protozoan parasite *Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi* in immunocompetent and immunosuppressed murine hosts. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2000;44(1):150-5.
35. Bahia MT, de Andrade IM, Martins TA, do Nascimento AF, Diniz Lde F, Caldas IS, et al. Fexinidazole: a potential new drug candidate for Chagas disease. *PLoS neglected tropical diseases*. 2012;6(11):e1870.
36. Ostwald TJ, MacLennan DH. Isolation of a high affinity calcium-binding protein from sarcoplasmic reticulum. *The Journal of biological chemistry*. 1974;249(3):974-9.
37. Bergeron JJ, Brenner MB, Thomas DY, Williams DB. Calnexin: a membrane-bound chaperone of the endoplasmic reticulum. *Trends in biochemical sciences*. 1994;19(3):124-8.
38. Michalak M, Corbett EF, Mesaeli N, Nakamura K, Opas M. Calreticulin: one protein, one gene, many functions. *The Biochemical journal*. 1999;344 Pt 2:281-92.
39. Burns K, Duggan B, Atkinson EA, Famulski KS, Nemer M, Bleackley RC, et al. Modulation of gene expression by calreticulin binding to the glucocorticoid receptor. *Nature*. 1994;367(6462):476-80.
40. Gardai SJ, McPhillips KA, Frasn SC, Janssen WJ, Starefeldt A, Murphy-Ullrich JE, et al. Cell-surface calreticulin initiates clearance of viable or apoptotic cells through trans-activation of LRP on the phagocyte. *Cell*. 2005;123(2):321-34.
41. McCauliffe DP, Zappi E, Lieu TS, Michalak M, Sontheimer RD, Capra JD. A human Ro/SS-A autoantigen is the homologue of calreticulin and is highly homologous with onchocercal RAL-1 antigen and an aplasia "memory molecule". *The Journal of clinical investigation*. 1990;86(1):332-5.
42. Pike SE, Yao L, Jones KD, Cherney B, Appella E, Sakaguchi K, et al. Vasostatin, a calreticulin fragment, inhibits angiogenesis and suppresses tumor growth. *The Journal of experimental medicine*. 1998;188(12):2349-56.
43. Obeid M, Tesniere A, Ghiringhelli F, Fimia GM, Apetoh L, Perfettini JL, et al. Calreticulin exposure dictates the immunogenicity of cancer cell death. *Nature medicine*. 2007;13(1):54-61.
44. Andrin C, Pinkoski MJ, Burns K, Atkinson EA, Krahenbuhl O, Hudig D, et al. Interaction between a Ca²⁺-binding protein calreticulin and perforin, a component of the cytotoxic T-cell granules. *Biochemistry*. 1998;37(29):10386-94.

45. Gelebart P, Opas M, Michalak M. Calreticulin, a Ca²⁺-binding chaperone of the endoplasmic reticulum. *The international journal of biochemistry & cell biology*. 2005;37(2):260-6.
46. Michalak M, Groenendyk J, Szabo E, Gold LI, Opas M. Calreticulin, a multi-process calcium-buffering chaperone of the endoplasmic reticulum. *The Biochemical journal*. 2009;417(3):651-66.
47. Ramos R, Juri M, Ramos A, Hoecker G, Lavandero S, Pena P, et al. An immunogenetically defined and immunodominant *Trypanosoma cruzi* antigen. *The American journal of tropical medicine and hygiene*. 1991;44(3):314-22.
48. Aguillon JC, Bustos C, Vallejos P, Hermosilla T, Morello A, Repetto Y, et al. Purification and preliminary sequencing of Tc-45, an immunodominant *Trypanosoma cruzi* antigen: absence of homology with cruzipain, cruzain, and a 46-kilodalton protein. *The American journal of tropical medicine and hygiene*. 1995;53(2):211-5.
49. Aguillon JC, Ferreira L, Perez C, Colombo A, Molina MC, Wallace A, et al. Tc45, a dimorphic *Trypanosoma cruzi* immunogen with variable chromosomal localization, is calreticulin. *The American journal of tropical medicine and hygiene*. 2000;63(5-6):306-12.
50. Aguillon JC, Harris R, Molina MC, Colombo A, Cortes C, Hermosilla T, et al. Recognition of an immunogenetically selected *Trypanosoma cruzi* antigen by seropositive chagasic human sera. *Acta tropica*. 1997;63(2-3):159-66.
51. Ferreira V, Valck C, Sanchez G, Gingras A, Tzima S, Molina MC, et al. The classical activation pathway of the human complement system is specifically inhibited by calreticulin from *Trypanosoma cruzi*. *J Immunol*. 2004;172(5):3042-50.
52. Valck C, Ramirez G, Lopez N, Ribeiro CH, Maldonado I, Sanchez G, et al. Molecular mechanisms involved in the inactivation of the first component of human complement by *Trypanosoma cruzi* calreticulin. *Molecular immunology*. 2010;47(7-8):1516-21.
53. Ramirez G, Valck C, Ferreira VP, Lopez N, Ferreira A. Extracellular *Trypanosoma cruzi* calreticulin in the host-parasite interplay. *Trends in parasitology*. 2011;27(3):115-22.
54. Eggleton P, Tenner AJ, Reid KB. C1q receptors. *Clinical and experimental immunology*. 2000;120(3):406-12.
55. Coppolino MG, Dedhar S. Calreticulin. *The international journal of biochemistry & cell biology*. 1998;30(5):553-8.
56. Basu S, Binder RJ, Ramalingam T, Srivastava PK. CD91 is a common receptor for heat shock proteins gp96, hsp90, hsp70, and calreticulin. *Immunity*. 2001;14(3):303-13.
57. Ogden CA, deCathelineau A, Hoffmann PR, Bratton D, Ghebrehiwet B, Fadok VA, et al. C1q and mannose binding lectin engagement of cell surface calreticulin and CD91 initiates macropinocytosis and uptake of apoptotic cells. *The Journal of experimental medicine*. 2001;194(6):781-95.
58. Ramirez G, Valck C, Molina MC, Ribeiro CH, Lopez N, Sanchez G, et al. *Trypanosoma cruzi* calreticulin: a novel virulence factor that binds complement C1 on the parasite surface and promotes infectivity. *Immunobiology*. 2011;216(1-2):265-73.

59. Sanchez Valdez FJ, Perez Brandan C, Zago MP, Labriola C, Ferreira A, Basombrio MA. Trypanosoma cruzi carrying a monoallelic deletion of the calreticulin (TcCRT) gene are susceptible to complement mediated killing and defective in their metacyclogenesis. *Molecular immunology*. 2013;53(3):198-205.
60. Walport MJ. Complement. Second of two parts. *The New England journal of medicine*. 2001;344(15):1140-4.
61. Walport MJ. Complement. First of two parts. *The New England journal of medicine*. 2001;344(14):1058-66.
62. Wallis R, Mitchell DA, Schmid R, Schwaeble WJ, Keeble AH. Paths reunited: Initiation of the classical and lectin pathways of complement activation. *Immunobiology*. 2010;215(1):1-11.
63. Fujita T, Matsushita M, Endo Y. The lectin-complement pathway--its role in innate immunity and evolution. *Immunological reviews*. 2004;198:185-202.
64. Krettli AU, Weisz-Carrington P, Nussenzweig RS. Membrane-bound antibodies to bloodstream Trypanosoma cruzi in mice: strain differences in susceptibility to complement-mediated lysis. *Clinical and experimental immunology*. 1979;37(3):416-23.
65. Aguilar L, Ramirez G, Valck C, Molina MC, Rojas A, Schwaeble W, et al. F(ab')₂ antibody fragments against Trypanosoma cruzi calreticulin inhibit its interaction with the first component of human complement. *Biological research*. 2005;38(2-3):187-95.
66. Mesaeli N, Nakamura K, Zvaritch E, Dickie P, Dziak E, Krause KH, et al. Calreticulin is essential for cardiac development. *The Journal of cell biology*. 1999;144(5):857-68.
67. Tyler KM, Miles MA. *American trypanosomiasis*. Boston: Kluwer Academic Publishers; 2003. 166 p. p.
68. Gold LI, Eggleton P, Sweetwyne MT, Van Duyn LB, Greives MR, Naylor SM, et al. Calreticulin: non-endoplasmic reticulum functions in physiology and disease. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 2010;24(3):665-83.
69. Bonaldo MC, Souto-Padron T, de Souza W, Goldenberg S. Cell-substrate adhesion during Trypanosoma cruzi differentiation. *The Journal of cell biology*. 1988;106(4):1349-58.