



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

**CALRETICULINA DE *Trypanosoma cruzi*:
MODULACION, POR FRAGMENTOS
INMUNOGLOBULINICOS F(ab')₂, DE SU
CAPACIDAD INHIBIDORA DEL SISTEMA DEL
COMPLEMENTO HUMANO.**

GALIA ANDREA RAMIREZ TOLOZA

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

PROFESOR GUIA: Dr. ARTURO FERREIRA VIGOUROUX

**SANTIAGO, CHILE
2005**



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

**CALRETICULINA DE *Trypanosoma cruzi*:
MODULACION, POR FRAGMENTOS
INMUNOGLOBULINICOS F(ab')₂, DE SU
CAPACIDAD INHIBIDORA DEL SISTEMA DEL
COMPLEMENTO HUMANO.**

GALIA ANDREA RAMIREZ TOLOZA

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

NOTA FINAL:

	NOTA	FIRMA
PROFESOR GUIA: Dr. ARTURO FERREIRA
PROFESOR CONSEJERO: Dr. FERNANDO FREDES
PROFESOR CONSEJERO: Dr. GUSTAVO FARIAS

SANTIAGO, CHILE
2005

INDICE

INTRODUCCION	1
REVISION BIBLIOGRAFICA.....	4
2.1. Historia	4
2.2. Distribución geográfica	5
2.3. Epidemiología	5
2.4. El parásito	7
2.5. El vector	9
2.6. Ciclo biológico	10
2.7. Patología	11
2.8. Diagnóstico	14
2.9. Definición de casos patológicos	15
2.10. Tratamiento	15
2.11. Control	16
2.12. Calreticulina	17
2.13. Origen de calreticulina de <i>T. cruzi</i>	18
2.14. TcCRT: secuencia y dominios funcionales	20
2.15. Localización	21
2.16. Sistema del complemento	21
2.17. Calreticulina y sistema del complemento	28
HIPOTESIS	32
Hipótesis	32
Hipótesis complementaria	32
OBJETIVOS	33
General	33
Específicos	33

MATERIALES Y METODOS	34
5.1. Obtención de anticuerpos policlonales lapinos, biológicamente activos contra el dominio S de TcCRT.....	34
5.2. Generación de fragmentos inmunoglobulínicos F(ab') ₂ anti-rTcCRT y anti-TcS	38
5.3. Determinación de la capacidad de los fragmentos F(ab') ₂ anti-rTcCRT y anti TcS para modular la interacción de rTcCRT o TcS con C1q del sistema del complemento	40
 RESULTADOS	 42
6.1. Generación de anticuerpos policlonales lapinos, biológicamente activos contra TcS	42
6.2. Generación de fragmentos F(ab') ₂ anti-rTcCRT y anti-TcS	48
6.3. Determinación de la capacidad de los fragmentos F(ab') ₂ anti- rTcCRT y anti- TcS para modular la interacción de rTcCRT con C1q del sistema del complemento	54
 DISCUSION	 57
 CONCLUSIONES	 65
 BIBLIOGRAFIA	 66

ABSTRACT

Chagas' diseases, caused by the protozoan *Trypanosoma cruzi*, affects about 18 million people in Latin America, and there are near 200.000 people infected in Chile. At present, there is no vaccine for this infection, being a major public health and socioeconomic problem in our continent. Pharmacological treatment for chronic cases has marginal efficacy. Although the causal agent, *Trypanosoma cruzi*, infects all mammals, there is no information about the pathological impact in animals with affective or productive value. There are many immunodominant antigens in this parasite. Calreticulin (CRT), a highly conserved multifunctional protein, is present in the endoplasmic reticulum in every cell of higher organisms, except erythrocytes. At present, the laboratory where this Pregraduate Thesis was executed (Immunology of Microbial Aggression, Immunology Program, ICBM, Faculty of Medicine, University of Chile) has concentrated efforts in the study of three functions of *T. cruzi* CRT (TcCRT): inhibition of the complement system, calcium binding capacity and anti-angiogenic effects. Infective *T. cruzi* trypomastigotes, are known for their capacity to evade the immune response. *In vitro*, the functional S domain of TcCRT (TcS) (aa. 159-281) binds C1q, the first component of human complement, inhibiting the classical pathway activation. Since TcCRT induces humoral immunity (IgG) *in vivo*, we have developed an *in vitro* correlate of possible *in vivo* immunomodulatory situations, aimed at blocking the interactions between TcCRT and C1q. We generated F(ab')₂ immunoglobulinic fragments anti-TcS and anti-recombinant TcCRT (rTcCRT). With this purpose, we immunized rabbits with both antigens. The animals generated high titer of antibodies. The IgG fractions were obtained after affinity chromatography. The polyclonal antibodies were enzymatically digested and F(ab')₂ fragments were generated. In ELISA, these purified fragments inhibited the binding, between rTcCRT or TcS with C1q of human complement.

In synthesis, this study shows that rTcCRT and its functional TcS domain were immunogenic and able to generate polyclonal antibodies. The F(ab')₂ fragments from these antibodies inhibit the binding between rTcCRT or TcS

with C1q of human complement, representing a possible correlate of the *in vivo* situations.

RESUMEN

La enfermedad de Chagas, producida por el protozoo *Trypanosoma cruzi*, afecta aproximadamente 18 millones de personas en Latinoamérica, existiendo alrededor 200.000 individuos infectados en Chile. En nuestros días, aún no existe vacuna y el tratamiento farmacológico de los casos crónicos es de escasa eficacia, constituyendo uno de los más importantes problemas de salud pública y socioeconómicos de nuestro continente. Aunque el agente causal infecta a todos los mamíferos, no existe información sobre el impacto patológico en animales con valor afectivo o productivo. Numerosos son los antígenos inmunodominantes que se han descrito relacionados con el agente. Uno de ellos es calreticulina, proteína multifuncional altamente conservada presente en el retículo endoplásmico de todas las células de los organismos superiores, con excepción de eritrocitos. Actualmente, el Laboratorio donde se realizó esta Memoria (Inmunología de la Agresión Microbiana, Programa de Inmunología, ICBM, Facultad de Medicina, Universidad de Chile) ha centrado su interés en tres funciones de calreticulina de *T. cruzi* (TcCRT), tales como: inhibición del sistema del complemento, capacidad ligante de calcio y propiedades anti-angiogénica. Los tripomastigotes infectantes de *Trypanosoma cruzi*, evaden la respuesta inmune. *In vitro*, el dominio S de TcCRT (TcS), une C1q del complemento humano, inhibiendo la activación de la ruta clásica. TcCRT induce inmunidad humoral (IgG) *in vivo*. Por ello, en un intento para generar un correlato *in vitro* de posibles situaciones inmunomoduladoras de la interacción *in vivo* entre TcCRT y C1q, se generaron fragmentos inmunoglobulínicos F(ab')₂ anti-TcS y anti-TcCRT recombinante (rTcCRT). Para esto, se inmunizaron conejas con ambos antígenos. Todas respondieron a las inmunizaciones produciendo sueros con alto título de inmunoglobulinas. Estas fueron purificadas por cromatografía de afinidad y se obtuvo la fracción IgG. Los anticuerpos policlonales se sometieron a una digestión enzimática, obteniendo sus fragmentos F(ab')₂, los cuales, fueron purificados y utilizados en un ensayo de ELISA para intentar bloquear la unión de rTcCRT a C1q del complemento humano.

En síntesis, tanto rTcCRT como su dominio funcional TcS fueron inmunogénicos, obteniéndose anticuerpos policlonales, de los que se generaron fragmentos F(ab')₂, capaces de bloquear la unión de rTcCRT y TcS a C1q del complemento humano, representando un posible correlato de las situaciones *in vivo*.

I. INTRODUCCION.

La enfermedad de Chagas o Tripanosomiasis Americana es una patología normalmente incurable, considerada uno de los mayores problemas de salud pública y socioeconómicos en América Latina, donde 18 millones de personas están infectadas y 90 millones están en riesgo (Kirchhoff, 2003). Su importancia radica en que es una enfermedad crónica, que causa discapacidad (7 a 15% de los pacientes) y muerte, siendo la causa del 10% de las defunciones en la población adulta de algunas regiones endémicas.

Trypanosoma cruzi, el agente causal de la enfermedad de Chagas, es un parásito que se aproxima al siglo de su descripción (Calderón, 2001). Un creciente número de investigadores de América y otros continentes se han preocupado del estudio de la enfermedad de Chagas, la cual, en sus más variados parámetros, se ha constituido en un fascinante desafío.

Además de su importancia por su impacto en patología humana, *T. cruzi* es un modelo de agresión microbiana intracelular, donde las estrategias, tanto parasitarias como del hospedero, alcanzan grados insospechados de sofisticación. Constituye, entonces, un modelo muy atractivo para el estudio de aspectos centrales del funcionamiento del sistema inmune frente a una agresión exógena.

Este protozoo flagelado, *T. cruzi*, se transmite a través de vectores hematófagos infectados. En Chile, los principales son *Triatoma infestans* y *Mepraia spinolai*, conocidos comúnmente como vinchucas, actuando como reservorio de la enfermedad, el humano y alrededor de 150 especies de mamíferos, tanto silvestres como domésticos. Aunque *T. cruzi* es normalmente transmitido por insectos triatominos infectados, frecuentes son los casos asociados a transfusiones sanguíneas, transplante de órganos e infección congénita, en países no endémicos (Szarfman *et al.*, 1968; Bittencourt, 1976).

Se han descrito una gran variedad de antígenos inmunogénicos, sin embargo, aún no se cuenta con un método inmunoproláctico adecuado para humanos. Por otro lado, sólo dos drogas son utilizadas para el tratamiento clínico de los pacientes chagásicos, exhibiendo baja eficacia farmacológica en los casos crónicos.

El Laboratorio de Inmunología de la Agresión Microbiana (Programa Disciplinario de Inmunología, ICBM, Facultad de Medicina, Universidad de Chile) ha aislado un antígeno de *T. cruzi* y lo ha identificado como calreticulina (CRT). Calreticulina de *T. cruzi* (TcCRT), como su contraparte humana, es multifuncional, altamente conservada y tiene una alta capacidad para unir calcio. CRT de vertebrados está presente en el retículo endoplásmico (RE) de todas las células con excepción de los eritrocitos. Entre las importantes y sorprendentes funciones de CRT se encuentran el actuar como chaperona de tipo lectina y el participar en procesos tales como el almacenamiento de calcio y la señalización intracelular, modulación de la expresión génica, adhesión celular, fagocitosis de células apoptóticas, autoinmunidad, anti-angiogénesis, inhibición de crecimiento tumoral y de la actividad lítica de perforinas de células T y NK. De gran interés para esta Memoria es la capacidad de TcCRT para inhibir la actividad del complemento humano *in vitro*. Esta capacidad se ejecuta en virtud de la habilidad de TcCRT para unirse a las porciones colagenosas de C1q. Algunas de estas funciones podrían modular *in vivo* mecanismos inmunes efectores. También, CRT está presente en variados compartimentos sub-celulares.

Una característica fundamental del ciclo de vida de los parásitos, es su capacidad para adaptarse a cambios de temperatura, pH y estrategias de defensa del hospedero. Como CRT de parásitos es altamente conservada en sus dominios funcionales, sus contribuciones a las relaciones hospedero/parásito deberían ser evaluadas, en particular la modulación de la infectividad del parásito y la evasión de la respuesta inmune del hospedero.

TcCRT fue descrita por primera vez en el Laboratorio de Inmunología de la Agresión Microbiana y llamada Tc45 (Ramos *et al.*, 1991). Luego se aisló la proteína nativa (Aguillón *et al.*, 1995), clonó, secuenció, y expresó el gen de TcCRT (Aguillón *et al.*, 2000). CRT de otra cepa de *T. cruzi* ha sido también caracterizada (Labriola *et al.*, 1999). TcCRT es un antígeno inmunodominante de 45 kDa dimórfico (diferentes clones del parásito presentan formas alternativas de 45 y 43 kDa), con múltiples copias de genes localizadas en un número variable de cromosomas (Aguillón *et al.*, 2000; Marcelain *et al.*, 2000). Importante es que ciertas regiones dentro del dominio S de TcCRT (TcS) (aminoácidos 159 - 281) tienen 80% de identidad con CRT humana (HuCRT). Dado este importante grado de similitud, en estos dominios funcionales relevantes, se ha demostrado que tanto TcCRT recombinante (rTcCRT) como sus dominios funcionales TcS y TcCRT R (TcR) (aminoácidos 136 - 281) se unen a las colas colagenosas de C1q humano, inhibiendo la ruta clásica del complemento. De esta forma TcCRT podría contribuir en la incapacidad de la ruta clásica del complemento para jugar un rol preponderante en la defensa contra los parásitos. En concordancia con este hallazgo se demostró también que TcCRT está presente en la superficie de tripomastigotes vivos, donde interactúa con C1q humano, inhibiendo la activación de la ruta clásica del sistema del complemento (Ferreira *et al.*, 2004a).

En el contexto de esta Memoria de Título nos preguntamos si fragmentos inmunoglobulínicos F(ab')₂, específicos contra rTcCRT o contra TcS, inhiben sus interacciones con C1q del sistema del complemento humano. Se intenta así establecer un correlato *in vitro* de posibles efectos que la inmunidad humoral (IgG) anti-TcCRT pudiera tener *in vivo*.

II. REVISION BIBLIOGRAFICA.

2.1. HISTORIA.

La enfermedad de Chagas o Tripanosomiasis Americana fue descubierta por Carlos Chagas en los primeros años del siglo XX (1907-1909). Este se encontraba trabajando como oficial controlador de la malaria en el Estado de Minas Gerais, Brasil, cuando detectó los altos niveles de infestación con hemípteros reduvídeos que prevalecían en la zona. La curiosidad de Chagas lo llevó a estudiar más a fondo estos insectos, en los cuales encontró, a nivel del lumen intestinal, un tipo particular de protozoo flagelado, que posteriormente denominó *Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi*. La exposición de los triatominos a marmosetas permitió evidenciar la presencia de estos protozoarios en el torrente sanguíneo de los vertebrados, lo que determinó el comportamiento enzoótico-epizoótico del organismo. Años después, Chagas encontró estos protozoarios en la sangre de un humano, lo que constituyó el primer caso de la enfermedad que hoy lleva su nombre (Calderón, 2001).

Sin embargo, la enfermedad existe en el continente americano desde tiempos muy remotos. Afectaba a comunidades humanas prehistóricas que poblaron el extremo norte de Chile hace alrededor de 2.000 años. Esto lo revela el hallazgo de megacolon chagásico, y muy probablemente de cardiopatías, en momias exhumadas en un sitio arqueológico situado a 1.100 metros de altitud sobre el nivel del mar, al interior de la provincia de Tarapacá. Estas momias pertenecen a indígenas wankarani (o huancarani), inmigrados hacia allí desde la región altiplánica de la actual Bolivia. Junto con confirmar la antigüedad de la parasitosis en el continente, hablan a favor del origen boliviano de ella en Chile, lo cual también se completa con el hecho que el zimodema Z2b (boliviano) de *T. cruzi* es el que con mayor frecuencia se ha encontrado en las áreas endémicas del norte de Chile (Apt y Reyes, 1990).

Es posible suponer que el parásito circulaba primero entre mamíferos y vectores silvestres para luego, adaptarse al ciclo doméstico de transmisión con el desarrollo de la vida sedentaria de las tribus precolombinas, la construcción de viviendas más duraderas y el domesticamiento de animales. Sin duda, la vivienda estable representó el nexo más importante para la adaptación domiciliaria de los triatomíneos, determinando así, el factor más decisivo para darle a la infección chagásica las características endémicas que, desde entonces, posee en el continente (Apt y Reyes, 1990).

2.2. DISTRIBUCION GEOGRAFICA.

El territorio en que prevalece la infección se extiende desde el sur de los EE.UU. de Norteamérica, en el paralelo 35 Latitud Norte, hasta Chile y Argentina. En Chile, el área endémica comprende desde el paralelo 18° en el norte (I Región) hasta el paralelo 34,5° Latitud Sur (VI Región), en la parte central de Chile. Dentro del área endémica también se incluye la Región Metropolitana (Olea, 1998). Por Argentina avanza hasta el paralelo 45 Latitud Sur, en la región patagónica (Apt y Reyes, 1990; Atías, 1998).

2.3.EPIDEMIOLOGIA.

La enfermedad de Chagas constituye uno de los principales problemas de salud pública en diversos países latinoamericanos.

La prevalencia total de la infección por *T. cruzi* se pudo estimar de una manera confiable en la década de 1980. Empleando protocolos estandarizados, se demostraron 18 millones de casos en 21 países endémicos con 100 millones de personas en riesgo de infección. De acuerdo a los datos del Banco Mundial, en 1993 se estableció que la enfermedad de Chagas en Latinoamérica ocupa el

primer lugar entre las enfermedades tropicales y el cuarto entre las enfermedades transmisibles, sólo debajo de las infecciones respiratorias agudas, de las enfermedades diarreicas y del SIDA. También representa una pérdida económica para los países endémicos equivalente a cerca de 6,5 billones de dólares por año. Algunos gobiernos de América Latina han dado prioridad al control de la enfermedad. Así es como en 1991, la iniciativa del Cono Sur agrupó a Argentina, Bolivia, Brasil, Chile, Paraguay y Uruguay e iniciativas recientes, como la del pacto de los Andes, que agrupa a Colombia, Ecuador, Perú y Venezuela y, en América Central, en 1997, a El Salvador, Guatemala, Honduras y Nicaragua (Imbert *et al.*, 2003).

Los focos más importantes están en Sudamérica, donde se registran las más altas tasas de prevalencia de infección humana, animal y de los vectores, además de la alta frecuencia de casos severos de enfermedad chagásica en el hombre. Se calcula que, en la actualidad, en el continente sudamericano hay aproximadamente entre 15 y 20 millones de personas infectadas, de las cuales 7 millones corresponden a Brasil, 3 millones a Argentina y 1 millón 200 mil a Venezuela (Apt y Reyes, 1990).

En Chile, la población expuesta corresponde aproximadamente a 850.000 personas. Basándose en algunos estudios, se estima que el número de personas infectadas en el área endémica sería de 142.000 aproximadamente (Olea, 1998).

Las tres principales vías de transmisión de la enfermedad son: La vectorial, forma clásica de transmisión en el área endémica y que consiste en una transmisión indirecta donde influyen factores tales como la pobreza, ruralidad, malas condiciones de la vivienda, temperaturas altas o moderadas y el clima seco. Luego, tenemos la vía transfusional, cuyo riesgo efectivo de transmisión con 500 ml de sangre infectada es de 15,5 a 25 %. En Chile no se refieren casos de transmisión por esta vía desde el año 1985. Por último, la vía transplacentaria

(Enfermedad de Chagas connatal) corresponde a un 10% del total de casos (Olea, 1998).

Otras vías de escasa significación epidemiológica, o aún no dimensionadas son la transmisión por alimentos, lactancia materna y accidentes de laboratorio (Olea, 1998). La OMS estableció la meta de la eliminación de la enfermedad de Chagas para el año 2000 y Chile, en 1999, habría alcanzado la interrupción de la transmisión vectorial de *T. cruzi*, en base al control realizado sobre *T. infestans* (Chile, 2000).

La mortalidad para el año 1997 alcanzó una tasa de 0,4 por 100.000 habitantes, lo que significó un total de 55 muertes (un 0,07% del total de muertes del país), correspondientes en un 70% a hombres. El Servicio de Salud Coquimbo concentró el 53% del total de esas muertes (Chile, 2000).

En cuanto a la morbilidad, las notificaciones para 1998 fueron 553, lo que significa una tasa de 3,8 por 100.000 habitantes. Se debe tener en cuenta que el 83% de estas notificaciones corresponden a diagnóstico serológico y no a casos clínicos, por lo que la tasa podría ser menor. Además, se trata de una enfermedad crónica que puede causar la muerte y un 10 a 15% de los enfermos queda discapacitado como consecuencia de daños cardíacos o digestivos (Chile, 2000).

2.4. EL PARASITO.

El agente causal de la enfermedad de Chagas es *T. cruzi*, protozoo flagelado, perteneciente a la familia *Trypanosomatidae*, en cuyo ciclo biológico intervienen mamíferos y un insecto vector (Atías, 1998). Los tripanosomas en general sufren uno o más ciclos de desarrollo y multiplicación en el tracto alimentario del insecto, antes que las formas infectivas sean transmitidas a un nuevo vertebrado por la saliva, por contaminación con heces o por ingestión del vector (Imbert *et al.*, 2003). Los hospederos mamíferos pueden ser el hombre y

algunos animales domésticos (el perro o el gato) o silvestres (diversos mamíferos, especialmente, roedores y carnívoros) (Atías, 1998).

En sus diversos hospederos y en medios de cultivo, *T. cruzi* presenta tres aspectos morfológicos fundamentales:

- Tripomastigote: de aspecto fusiforme, de unos 20 μm de largo, con citoplasma granuloso y un núcleo central vesiculoso. Posee un kinetoplasto subterminal, posterior al núcleo, del cual emerge una membrana ondulante que recorre al parásito y en cuyo borde libre lleva un flagelo que emerge por la extremidad anterior. Se lo encuentra en la sangre de mamíferos y en el intestino posterior de los triatomíneos. No se multiplica, pero constituye la forma infectante para los mamíferos y los triatómos. En los mamíferos es el diseminador de la infección por vía sanguínea (Atías, 1998).
- Epimastigote: de aspecto fusiforme, de 20 μm de largo, con un kinetoplasto localizado por delante del núcleo, o a su nivel, y presenta una corta membrana ondulante y un flagelo libre. Es la forma de multiplicación del parásito en el intestino del triatómos y la predominante en los medios de cultivo (Atías, 1998).
- Amastigote: elemento redondeado, de unos 2 μm de diámetro, en el cual se distingue el núcleo y el kinetoplasto. Aparentemente es aflagelado al microscopio de luz, pero en la ultraestructura se observa que posee un corto flagelo no emergente. Es la forma de multiplicación del parásito y lo hace en el interior de las células del mamífero por fisión binaria (Atías, 1998).

2.5. EL VECTOR.

Actualmente, hay 130 especies reconocidas agrupadas en 15 géneros de triatominos, todas están caracterizadas por un hábito obligado de succionar sangre y varias adaptaciones asociadas que incluyen modificaciones de la boca, de la saliva y de las funciones digestivas; esto significa que probablemente se hayan originado de formas predatorias bastante diferentes (Imbert *et al.*, 2003).

Las especies de mayor significación epidemiológica son las que colonizan fácilmente las viviendas de los humanos, viven en las grietas y hendiduras de las casas rurales y salen por las noches para alimentarse de la sangre de los ocupantes dormidos. Muchas de las especies principalmente silvestres invaden las casas (atraídas por la luz) contribuyendo, así, a la transmisión de *T. cruzi* (Imbert *et al.*, 2003). Los vectores son hematófagos estrictos y oportunistas, por tanto el impacto sobre una especie particular depende de la probabilidad de contacto entre un vector y el posible hospedero (Canals *et al.*, 1998).

Las principales especies de hábito domiciliario pertenecen a los géneros *Rhodnius*, *Triatoma* y *Panstrongylus*, que pueden ser diferenciados con cierta facilidad por la zona de la cabeza donde emergen las antenas (Apt y Reyes, 1990).

En Chile, se describen dos especies de vinchucas vectores de la enfermedad de Chagas. La primera, el vector doméstico: *T. infestans* y la segunda, el vector silvestre: *M. spinolai*. Recientemente se ha descrito otra especie, también silvestre, *M. gajardoi*, desde ejemplares recolectados en el desierto costero entre los 18° a 26° S (Canals *et al.*, 2001). Sin embargo, aún no ha sido asociada a la transmisión de la enfermedad de Chagas.

- *T. infestans*: es considerada la principal especie vector de *T. cruzi* en gran parte de América del Sur, estando distribuida desde el sur de Argentina hasta

la región noreste del Brasil. En Chile, se encuentra distribuido desde el paralelo 18° a 34° 30' S (Apt y Reyes, 1990). Sus hábitos son casi exclusivamente domésticos, encontrándose en las grietas de las paredes de adobe o de "quincha" (ramas entramadas revestidas con barro), techos de ramas, habitáculos y gallineros de la zona peridoméstica. Es de hábito nocturno (Canals *et al.*, 1998).

- *M. spinolai*: especie silvestre cuya presencia ha sido comprobada sólo en Chile. Presenta un acentuado polimorfismo, con hembras ápteras y machos ápteros, alados o braquípteros. Se la encuentra entre los paralelos 18 y 34° de latitud Sur desde el nivel del mar hasta los 3.000 m de altura. Su hábitat lo constituyen zonas pedregosas, en especial canteras, grietas, guaneras de aves, cuevas de animales y ocasionalmente se encuentra en corrales, pircas periantrópicas y en la vivienda humana. Además, se mantiene activo durante el día (Canals *et al.*, 1998). Desde esta perspectiva, *M. spinolai* es una especie potencialmente peligrosa, especialmente en las zonas en que se produce el contacto habitual con el hombre (Canals *et al.*, 2001).
- *M. gajardo*: en Chile se encuentra distribuida entre el paralelo 18 y 26°S (Canals *et al.*, 2001).

2.6. CICLO BIOLÓGICO.

T. cruzi realiza su ciclo de vida en dos tipos de hospederos, uno vertebrado y otro invertebrado (Calderón, 2001).

El vector (hospedero invertebrado) se infecta al ingerir sangre de los mamíferos que contienen tripomastigotes. Una vez en el lumen del intestino medio del insecto, los parásitos se multiplican muy activamente, en su estado de epimastigotes, por fisión binaria y, al cabo de quince a treinta días, se desarrollan

los tripomastigotes metacíclicos en el intestino posterior del triatoma. Cuando el insecto infectado pica al mamífero, emite deyecciones con tripomastigotes, que atraviesan la piel por el sitio de la picadura o por las mucosas (Atías, 1998).

En el mamífero, los tripomastigotes metacíclicos se introducen en las células del tejido celular laxo, vecino al sitio de penetración, y adquieren la forma de amastigote. Los amastigotes se reproducen por fisión binaria, hasta repletar la célula, que termina por romperse, saliendo los parásitos a la circulación bajo el aspecto de tripomastigotes, para diseminarse por todo el organismo. Estos tripomastigotes penetran en nuevas células y se transforman en amastigotes para reproducirse, romper las células repletas de parásitos y volver a circular como tripomastigotes, repitiendo muchas veces este ciclo, el cual se completa una vez que los tripomastigotes son ingeridos por triatomas hematófagos no infectados (Atías, 1998).

2.7. PATOLOGIA.

La infección por *T. cruzi* tiene un período de incubación de cuatro a diez días, casi siempre sin síntomas. Posteriormente pueden presentarse tres fases:

- Aguda: puede durar de uno a cuatro meses; cuando ocurre en niños puede ser desde asintomática hasta grave o letal, se caracteriza por fiebre variable, malestar general, irritabilidad, dolor de cabeza, hepato y esplenomegalia, y crecimiento ganglionar. En el sitio de inoculación es común encontrar una reacción inflamatoria local con crecimiento de los nódulos linfáticos regionales denominado chagoma de inoculación. Cuando ésta ocurre cercana al área ocular, se produce un edema unilateral de ambos párpados, conocido como signo de Romaña. Las manifestaciones que amenazan la vida o que son mortales incluyen inflamación del músculo del corazón, así como del cerebro y las meninges (Imbert *et al.*, 2003). En la fase aguda también puede observarse

meningoencefalitis y cardiomegalia. El período agudo se presenta en alrededor del 5% de los infectados chagásicos y entre los infectados cerca del 90% son niños (Atías, 1998). Durante esta etapa, el diagnóstico de la enfermedad es muy difícil y a veces suele confundirse con otras enfermedades. Los exámenes de laboratorio pueden aislar el parásito en estudios de sangre directo en fresco, frotis o gota gruesa teñida con Giemsa, inoculación en animales y cultivo en medios difásicos de agar sangre (Imbert *et al.*, 2003).

- Fase indeterminada: transcurrido el período agudo, la sintomatología se apaga y se entra en un estado de latencia, caracterizado por una lenta multiplicación intracelular de los parásitos y oligoparasitemias, sin signos claros. La curación espontánea, con eliminación del parásito, es rara. Este período puede durar indefinidamente durante toda la vida o pasar a la forma crónica de la enfermedad (Atías, 1998). Sin embargo, las pruebas serológicas son positivas y si se estudia adecuadamente al paciente, se encontrarán datos sugerentes de miocarditis (Imbert *et al.*, 2003).
- Fase crónica: las manifestaciones aparecen casi siempre en personas de 20 a 50 años de edad (Imbert *et al.*, 2003) o después de diez o más años desde la primoinfección (Atías, 1998). En esta fase, el compromiso se centra fundamentalmente en el miocardio y tubo digestivo. En este caso, se desarrollan enormes cardiomegalias con zonas de adelgazamiento de la pared ventricular que puede ocasionar un verdadero aneurisma, sobre todo en la punta del corazón (Atías, 1998). La enfermedad cardíaca generalmente conduce a la muerte. También se observan otros órganos hipertróficos (visceromegalias o dilatación visceral), especialmente el esófago y el colon. Con menos frecuencia se encuentran formas que afectan el sistema nervioso central, o bien inflamación de mucosas o glándulas. Después de un período asintomático de muchos años, el 27% de las personas infectadas desarrolla daño cardíaco que conduce a la muerte; el 6% desarrolla daño visceral, y el

3% puede desarrollar daño del sistema nervioso (Imbert *et al.*, 2003). Las lesiones inflamatorias de la fase crónica se producirían por mecanismos inmunitarios. En efecto, en la fase crónica las lesiones del corazón y del tubo digestivo se caracterizan por la presencia de infiltrados linfocitarios difusos y son muy escasos los parásitos tisulares. En la cardiopatía crónica, es probable la existencia de una respuesta inmune mediada por linfocitos contra el tejido cardíaco, puesto que se puede observar una citólisis de las células musculares vecinas a los linfocitos, sin la presencia de parásitos (Atías, 1998).

En el caso de la transmisión transplacentaria de *T. cruzi*, ésta ocurre en la segunda mitad del embarazo; por lo tanto, al igual que en la toxoplasmosis, este agente parasitario es capaz de producir fetopatías y no embriopatías. La transmisión es siempre un accidente, en el cual se conjugan dos hechos contemporáneos: niveles de parasitemia de tripomastigotes y aumento de la permeabilidad placentaria o multiplicación del parásito en ella. Una madre que ha tenido un hijo chagásico, es posible que vuelva a tener otro hijo infectado por vía transplacentaria, lo cual, sin embargo no es frecuente. No está todavía esclarecida la posibilidad de producción de aborto. Los parásitos producen en el feto una infección generalizada, aguda, sin los signos de puerta de entrada o chagoma de inoculación, con parasitemias e innumerables nidos de multiplicación en los tejidos, especialmente a nivel de SNC, del miocardio, del sistema retículoendotelial y de la musculatura esquelética. El niño, al momento del nacimiento, puede presentar bajo peso, prematurez, hepato y esplenomegalia, y compromiso variable del corazón y SNC (Atías, 1998).

La infección por *T. cruzi* a través de transfusión sanguínea, puede producir un cuadro clínico de acuerdo con el estado inmunológico del receptor. En inmunocompetentes (pacientes previamente sanos), la infección pasa habitualmente inadvertida y si aparece sintomatología (fiebres prolongadas por meses, adenopatías, hepatomegalia, etc.), es tardía, y raramente se le asocia con la transfusión, haciendo la detección de *T. cruzi* dificultosa. En cambio, en el

paciente inmunocomprometido el cuadro clínico generalmente es agudo y se manifiesta por fiebre alta y mantenida, con compromiso progresivo del estado general; en estos casos, la pesquisa del *T. cruzi* en la sangre es relativamente fácil (Atías, 1998).

2.8. DIAGNOSTICO

Durante la fase crónica o indeterminada de la enfermedad, es de gran importancia el diagnóstico de laboratorio ya que se puede demostrar la presencia de anticuerpos específicos generados por la infección de *T. cruzi*. El xenodiagnóstico y las biopsias de ganglios son estudios que se realizan en esta fase. Las pruebas diagnósticas recomendadas por la OMS y OPS son: hemaglutinación, ELISA e inmunofluorescencia, todas indirectas. Es necesario realizar dos pruebas simultáneas, pues se incrementa la certeza diagnóstica. Además, por ser una enfermedad de difícil curación, salvo durante las primeras fases, y que hasta el momento no hay vacunas, el control depende mucho de la eliminación de las poblaciones domésticas de los insectos transmisores (Imbert *et al.*,2003).

En Chile se dispone de 2 tipos de métodos diagnósticos:

Directos:

- Frotis sanguíneo
- Lámina/laminilla
- Gota Gruesa
- Microstrout
- Xenodiagnóstico
- Reacción de polimerasa en cadena (PCR)

Indirectos:

- Detección de anticuerpos IgG e IgM por técnicas tales como la inmunofluorescencia indirecta y enzimoimmunoensayo (ELISA) (Chile, 2000).

2.9. DEFINICION DE CASOS PATOLÓGICOS.

- Caso Sospechoso Agudo: persona con fiebre, sin otra explicación, y/o hepatoesplenomegalia y/o chagoma que:
 - a. Es residente o ha estado en zona endémica en los últimos 6 meses.
 - b. Haya estado en contacto con sangre (a través de transfusiones, uso de drogas intravenosas o accidentes laborales) u otro material biológico.
- Caso Confirmado: caso clínicamente compatible que es confirmado por laboratorio.
- Enfermedad de Chagas Congénita: recién nacido hijo de madre infectada con *T. cruzi* y con examen directo positivo o PCR positiva.
- Donante de sangre positivo: serología positiva para *T. cruzi* (Chile, 2000).

2.10. TRATAMIENTO.

Sólo 2 drogas nitroheterocíclicas, 5-nitrofurano (Nifurtimox) y 2-nitroimidazol (Benznidazol), son usadas para el tratamiento clínico de los pacientes chagásicos. Ambas drogas reducen la duración y severidad clínica de la infección aguda con *T. cruzi* y guía a la cura parasitológica en la mitad de los pacientes tratados en las etapas tempranas de la enfermedad de Chagas. Sin embargo, estas drogas exhiben una mucho más baja eficacia en el tratamiento de los infectados crónicamente o de los pacientes chagásicos inmunosuprimidos

(Romanha *et al.*, 2002). Nuevas aproximaciones a una quimioterapia específica están siendo probadas. Rutas bioquímicas tales como la biosíntesis de esteroides *de novo*, proteólisis mediada por cruzipaina y metabolismo de pirofosfato han sido químicamente validadas y las actividades selectivas anti-*T. cruzi* *in vitro* e *in vivo* de los inhibidores de esta vía han sido demostrados. Varias de estas combinaciones han completado ya los estudios pre-clínicos y están esperando para ser probadas clínicamente en un futuro cercano. Otra aproximación prometedora incluye interferencia con la síntesis de tripanotión y metabolismo redox, además de la inhibición del rescate de purinas, dihidrofolato-reductasa, biosíntesis de fosfolípidos, y prenilación y acilación de proteínas (Urbina y Docampo, 2003).

2.11. CONTROL.

De acuerdo al perfil epidemiológico de la enfermedad de Chagas, la profilaxis racional debe perseguir la eliminación del insecto vector como medida fundamental. Lo más importante radica en el mejoramiento de la vivienda campesina, para hacer poco probable su infestación por triatomas. Las viviendas infestadas deben ser rociadas con insecticidas de acción remanente. En estos casos, el rociado debe alcanzar a todas las viviendas del área y repetirse con regularidad. Sin embargo, cualquier acción anti-triatómica debe ser acompañada de una intensa educación sanitaria de los campesinos, de los niños y del público en general, con el propósito de enseñar los peligros de la convivencia con esos insectos y crear actitudes desfavorables para su desarrollo en la vivienda y en sus alrededores (Atías, 1998).

2.12. CALRETICULINA

Calreticulina es una proteína multifuncional altamente conservada que une calcio y que está presente en el RE de todas las células de organismos superiores, a excepción de eritrocitos. Entre las importantes y sorprendentes funciones de esta proteína se encuentran el actuar como chaperona de tipo lectina y participar en procesos tales como el almacenamiento de calcio y señalización intracelular, modulación de la expresión génica, adhesión celular, fagocitosis de células apoptóticas, autoinmunidad, angiogénesis, crecimiento tumoral, actividad lítica de perforinas en células T y NK, interacciones potenciales con receptores del hospedero e inhibición, C1q dependiente, de la actividad del complemento *in vitro*. Algunas de esas funciones podrían modular mecanismos inmunes efectores. Por otro lado, calreticulina está presente en variados compartimentos sub-celulares (Ferreira *et al.*, 2002).

Calreticulina es la única proteína residente en el lumen del RE. Afecta muchas funciones celulares tanto dentro del lumen del RE, como fuera del ambiente luminal. En el lumen del RE tiene dos funciones principales: chaperona y proteína reguladora de la homeostasis del calcio. CRT es una chaperona tipo lectina, altamente versátil y participa durante la síntesis de una variedad de moléculas, incluyendo canales iónicos, receptores de superficie, integrinas y transportadores. La proteína también afecta la homeostasis intracelular del calcio, modulando el almacenamiento y transporte de éste (Michalak *et al.*, 1999).

Además, se conoce que CRT humana (HuCRT) se une a las regiones colagenosas de C1q y otros miembros de la familia de las colectinas, tales como, mannan binding lectin (MBL), la proteína A del surfactante pulmonar, congulinina bovina y la colectina 43 (Maholtra *et al.*, 1990).

Por otro lado, un péptido de CRT (aminoácido 120-180), una molécula más larga (aminoácidos 1-180), llamado vasostatina, así como CRT completa, son

potentes inhibidores de la angiogénesis, tanto *in vitro* como *in vivo* (Ferreira *et al.*, 2004b).

2.13. ORIGEN DE CALRETICULINA DE *Trypanosoma cruzi*.

Intentando describir el curso de la infección con *T. cruzi*, la presencia de anticuerpos protectivos y el desarrollo de la respuesta inmune en un par de cepas de ratones congénicas para su *H2*, se realizó un ensayo en el cual se inocularon ratones con 10.000 tripomastigotes sanguíneos de la cepa Tulahuén. Los resultados obtenidos en el par de ratones congénicos A.CA-A.SW demostraron que los ratones A.CA (*H2^f*) eran extremadamente susceptibles (todos morían 15 días post inyección), en cambio los ratones A.SW (*H2^s*) eran altamente resistentes (81% sobrevivía al día 35 post inyección). Por otro lado, al intentar medir el efecto de los anticuerpos protectivos, se demostró que el suero obtenido a los 35 días post inyección, desde la cepa resistente A.SW, protegía en un 100% a los animales A.CA, los cuales sobrevivían 60 o más días post-inyección. La parasitemia fue significativamente más baja, con sólo un pequeño peak al día 12 post-inyección y sin parasitemias detectables después del día 20 (Juri *et al.*, 1990).

Estos hallazgos sugerían fuertemente que la resistencia a la infección con este agente infeccioso estaba correlacionado con la producción de anticuerpos IgG específicos anti-*T.cruzi*. Los resultados con el par de cepas congénicas (resistentes y susceptibles) sugería que uno de varios genes ligados al complejo *H2* modulan la producción de anticuerpos protectivos específicos anti-*T.cruzi* (Juri *et al.*, 1990).

Anteriormente, el mismo laboratorio había detectado un polipéptido de *T. cruzi*, reconocido por la cepa A.SW pero no por la cepa A.CA (Ramos *et al.*, 1988). Este hallazgo sugería la existencia de diferentes genes relacionados con la

respuesta inmune entre los componentes de ambas cepas congénicas A.SW/A.CA (Juri *et al.*, 1990).

Posteriormente, se realizó una purificación de esta molécula (Aguillón *et al.*, 1991), para luego ser clonada y secuenciada (Aguillón *et al.*, 2000), determinándose que este polipéptido de *T. cruzi* de 45 kDa denominado Tc45 tiene cerca de un 50% de homología con RAL, una CRT de 41 kDa asociada a un antígeno de *Litomosoides sigmodontes*. Con estos antecedentes se llegó a la conclusión que Tc45 es TcCRT (Aguillón *et al.*, 2000).

CRT vertebrada fue aislada por primera vez por Ostwald y MacLennan en 1974, y luego, clonada en 1989 por Smith y Koch, y Fliegel *et al.* (Michalak *et al.*, 1999). Originalmente, la proteína fue identificada como una molécula ligante de calcio localizada principalmente en el RE (Nakhasi *et al.*, 1998). Actualmente, CRT ha sido aislada desde humanos, insectos, nemátodos, protozoos y plantas, detectándose una marcada conservación genómica y de secuencia aminoacídica entre todas ellas a lo largo de la evolución (Ferreira *et al.*, 2004b). Además, se le describen una variedad de importantes roles claves en la regulación de la funcionalidad celular, estando presentes en muchos compartimentos sub-celulares (Michalak *et al.*, 1999).

Paralelamente, en el laboratorio del Dr. Ferreira (Facultad de Medicina, Universidad de Chile), se comenzó a trabajar con esta molécula derivada del parásito *T. cruzi*, desarrollándose un anticuerpo monoclonal (AcMo) anti-TcCRT incapaz de detectar homólogos en *Leishmania mexicana*, *L. brasiliensis*, *L. donovani*, o *Chritidia fasciculata* (Aguillón *et al.*, 1997). En el mismo laboratorio se ha demostrado, recientemente, que TcCRT tiene un interesante efecto antiangiogénico (Molina *et al.*, 2004; Ferreira *et al.*, 2004c)

Actualmente, en este contexto se han generado anticuerpos policlonales (AcPo) anti-TcCRT y sus dominios funcionales con los que se ha logrado purificar

calreticulina nativa (nTcCRT) a partir de epimastigotes de cultivo (Aguilar, 2003). Estos mismos anticuerpos y en el contexto de esta Memoria de Título, se generarán fragmentos F(ab')₂ y se estudiará su posible rol inhibitor de la unión de rTcCRT a C1q, proteína clave en la activación de la ruta clásica del sistema del complemento. Además, en el mismo laboratorio se están estudiando otras funciones de esta molécula como su posible rol ligante de calcio, propiedad conocida en otras CRTs de variados orígenes; proteína de shock térmico, su interacción con el sistema del complemento y su rol como proteína anti-angiogénica, tal como HuCRT también conocida como vasostatina.

2.14. Calreticulina de *T. cruzi*: secuencia y dominios funcionales.

HuCRT tiene aproximadamente un 50 % de identidad con CRT de *Onchocerca volvulus*, *Schistosoma mansoni*, *L. donovani* y *T. cruzi*. Las características comunes de todas las CRTs son un dominio globular N-terminal, uno P rico en prolina y un dominio ácido C-terminal (Ferreira *et al.*, 2002). La secuencia aminoacídica de ambos dominios N-terminal y P de CRT están bien conservadas entre especies, sugiriendo un importante rol en las funciones básicas de esta proteína. La secuencia primaria de CRT se inicia con un péptido señal y con una secuencia de retención KDEL-ER, o una variante aceptable para la retención de proteínas residentes en el RE (Michalak *et al.*, 1999).

- Dominio N: dominio globular, encargado de la interacción proteína-proteína, unión de auto-anticuerpos y RNA (Nakhasi *et al.*, 1998). Además este dominio también incluye la mitad N-terminal del dominio S, capaz de unirse a componentes del sistema del complemento (Ferreira *et al.*, 2002).
- Dominio P: dominio rico en prolina. Es un sitio ligante de calcio de baja capacidad, pero alta afinidad. Además es un sitio ligante de lectinas, con funciones chaperonas, y altamente conservado desde organismos unicelulares

a multicelulares (Nakhasi *et al.*, 1998). TcCRT tiene tres sitios comunes de unión a Ca^{+2} , los mismos que están presentes en su contraparte humana (KPEDWDE o sus variantes conservadas), y además ambos residuos Cys presentes en posiciones conservadas en otras CRTs. Este dominio interactúa con perforinas, un componente de los gránulos de las células-T citotóxicas y está incluido en el extremo C-terminal del dominio S (Ferreira *et al.*, 2002).

- Dominio C: dominio rico en aminoácidos acídicos, con sitios ligantes de Ca^{+2} , de alta capacidad y baja afinidad (Nakhasi *et al.*, 1998). Este es un sitio pobremente conservado entre CRTs de distintos orígenes y termina con una secuencia de retención para el RE, KEDL (Ferreira *et al.*, 2002).

2.15. Localización.

A pesar de contar con una señal de retención para el RE en su dominio C-terminal (KEDL), CRT tiene otras localizaciones, las que incluyen: gránulos citotóxicos en células T, superficie celular, saliva de garrapatas, suero sanguíneo, núcleos, citoplasma, acrosoma de espermatozoides, y el espacio extracelular de varios tipos celulares estimulados *in vitro*. Recientemente, el laboratorio del Profesor Tutor de esta Memoria de Título ha determinado que TcCRT es expresada en la superficie de tripomastigotes infectantes (Ferreira *et al.*, 2004b).

2.16. Sistema del Complemento.

El sistema del complemento es un sistema extremadamente pleiotrópico, conformado por alrededor de 40 proteínas plasmáticas o integrales de membranas. Su función es interrelacionar múltiples funciones efectoras, frecuentemente relacionadas con mecanismos inflamatorios y de inmunidad innata y adaptativa. Durante su activación se generan tres grupos de péptidos con

funciones que, en condiciones fisiológicas, promueven la fagocitosis, la inflamación, la inmunogenicidad y la destrucción de membranas biológicas de agentes agresores. Tal como ocurre en los procesos de activación de las serino-proteasas responsables de la coagulación y de la hemostasis, la activación del complemento implica la activación sucesiva (“en cascada”) de precursores de serino proteasas plasmáticas. Las principales consecuencias biológicas de este proceso son:

- Lisis de células agresoras: en etapas finales de activación del sistema del complemento se generan Complejos Destruidores (líticos) de membranas biológicas o “MAC” (“Membrane Attack Complex”), formado por C5b, C6, C7, C8 $\alpha\gamma$, C8 β y C9. El MAC es anfifílico, lo que le permite insertarse en membranas biológicas fosfolipídicas que se encuentren en la proximidad inmediata al sitio de activación, generando verdaderos canales circulares, simétricos y equidistantes, que alteran severamente la permeabilidad celular.
- Oponización de antígenos por C3b y C4b: estas opsoninas se unen covalentemente a la superficie de células agresoras cercanas al sitio de activación. Por sí solas no producen daño, pero si las células extrañas sensibilizadas con ellas, son detectadas por una célula fagocítica profesional, como los macrófagos, serán fagocitadas eficientemente y luego destruidas intracelularmente.
- Activación de linfocitos por C3d y C4d: fragmentos pequeños (d), producidos por degradación de C3b y de C4b, unidos covalentemente a antígenos, contribuyen a su focalización antigénica hacia nódulos y ganglios linfáticos, donde hay una gran concentración de linfocitos B que expresan receptores para esos fragmentos (CR2 o “complement receptor 2” o CD21).
- Solubilización de complejos inmunes: por otra parte, como los complejos inmunes pueden activar al sistema, se depositará covalentemente sobre ellos

fragmentos C3b y C4b. La unión de estos fragmentos a las regiones epitópicas o paratópicas de esos complejos inmunes, promueve la solubilización de los mismos, al interferir con la reacción antígeno/anticuerpo.

- Inflamación: las anafilotoxinas, C3a, C4a y C5a, son fragmentos peptídicos de 5-10 kDa. Su función principal es aumentar la permeabilidad capilar. Inducen la liberación local de varios productos de las células mastoideas, siendo el más importante, la histamina. Una reacción similar ocurre con los basófilos circulantes que tienen receptores para C3a y C5a. Los neutrófilos, en cambio, tienen receptores sólo para C5a, induciendo en ellos una fuerte actividad leucotóxica (Ferreira y Scharfstein, 2002).

2.16.1. Activación.

C3 ocupa una posición central en el sistema, siendo un objetivo principal de activación.

Muchas serinoproteasas del sistema del complemento circulan como precursores no funcionales (zimógenos). La activación del complemento puede ser definida, entonces, como una cascada de reacciones en que precursores enzimáticos no funcionales son activados por proteólisis limitada y específica en un proceso unidireccional e irreversible. La consecuencia principal de esto es que un pequeño estímulo inicial puede ser amplificado tremendamente. Mecanismos de este tipo requieren un sistema de control riguroso, que opera en diversas etapas de la cascada. Por otro lado, en ausencia de estímulo, muchas proteínas circulan en el plasma ya laxamente asociadas entre sí, listas para actuar (Ferreira y Scharfstein, 2002).

El complemento puede activarse a través de tres rutas principales: clásica, de las lectinas y alterna.

- Ruta Clásica: Esta ruta es iniciada por la unión de C1q del complejo C1 a un activador. La activación *in vivo* requiere la unión de C1q a agregados o complejos inmunes unidos a IgG o IgM. C1 está formado por una molécula de C1q y dos moléculas de C1r y de C1s asociadas de manera no covalente, en un complejo Ca^{+2} dependiente (Morgan y Harris, 1999), donde también es esencial la presencia de Mg^{+2} . C1q, es un complejo macromolecular de 18 cadenas, agrupadas en seis unidades, cada una con porciones colagenosas y globulares. Por su parte, la porción globular de C1q se une no covalentemente a los dominios CH2 de la porción Fc de las IgGs, agregadas por el antígeno, o a dominios CH3 de IgM. Esta unión conduce a auto activación de la serinoproteasa C1r, la que activa proteolíticamente a C1s (Ferreira y Scharfstein, 2002). C1 activado, se une a una superficie a través de la IgG, dividiendo a C4 plasmático en un pequeño fragmento C4a y un gran fragmento C4b, que se une a la membrana plasmática, sirviendo como receptor para el siguiente componente del sistema, C2, que generará dos fragmentos, C2a y C2b (Morgan y Harris, 1999).

El paso siguiente, es generar una convertasa de C3 (C4bC2b), por la acción secuencial de C1s sobre C4 y C2. Esta convertasa actúa sobre C3 generando dos fragmentos, C3b y C3a (Ferreira y Scharfstein, 2002). C3 es el componente del complemento más abundante e importante (Morgan y Harris, 1999). C2 y C4 circulan preasociados. C2b debe combinarse con C4b para poder actuar sobre C3. La C3 convertasa genera muchos fragmentos C3b. La mayor parte de ellos pasa a la fase fluida, una proporción menor actúa como opsoninas o también como “direccionador” de antígenos hacia órganos linfoides. Una mucho menor de estos, se asocia a la misma convertasa, produciéndose, así, un cambio en la especificidad del sitio enzimático presente en C2b (Ferreira y Scharfstein, 2002). C4b es un cofactor enzimático y es esencial para que la subunidad catalítica C2b pueda romper un enlace peptídico en C3. Este último se une no covalentemente al complejo, formando dos fragmentos C3a y C3b. Ahora, C3b unido a la convertasa C4bC2b, formará

un nuevo complejo C4bC2bC3b, conocido como la convertasa de C5. C5 es el componente final de la ruta clásica de activación del sistema del complemento, y a su vez, es el primer componente del MAC (Morgan y Harris, 1999).

- Ruta de las lectinas: es la vía de descripción más reciente. Provee de una tercera ruta de activación, independiente de anticuerpos, sobre bacterias y otros microorganismos (Morgan y Harris, 1999). El componente clave de esta ruta es MBL (“manose binding lectin”), una colectina sérica (parte colagenosa y parte lectina), formada por múltiples copias de una cadena única de 32 kDa. El rol de MBL *in vivo* es unirse a manosa y residuos de N-acetil glucosamina abundantes en las paredes celulares de las bacterias. MBL se une a serinoproteasas MASP-1 (“MBL-associated serine protease 1”), MASP-2, MASP-3 y sMAP. El complejo MBL-MASP activa a C4 a través de la serinoproteasa MASP-2, de una manera similar a la acción de C1s activado. El resto de la cascada es idéntica a la vía clásica, con formación de ambas convertasas de C3 y C5 (Ferreira y Scharfstein, 2002). Sin embargo, la capacidad de activar el complemento no es exclusiva de MBL. Otras lectinas también son capaces de realizar esta función, proveyendo de una ruta de activación distinta, gatillada por residuos de carbohidratos ubicados, principalmente, en bacterias (Morgan y Harris, 1999).
- Ruta Alternativa: Su objetivo también es activar a C3. El mecanismo se realiza en ausencia de anticuerpos específicos (al igual que en la ruta de las lectinas). Difiere de la ruta clásica, mediada por anticuerpos, en que proporciona una línea de defensa que está inmediatamente disponible pues no requiere de inmunización previa. Participan seis proteínas plasmáticas: C3, B, D, H, I y P (properdina), pero sólo B, D, y P son exclusivas de esta ruta. El Mg^{+2} es esencial en la mantención de las convertasas de esta ruta, al igual que de la clásica y de las lectinas. Se desconoce el mecanismo exacto de generación de las primeras moléculas de C3b metaestables (enlace tioléster activado). En su etapa de iniciación se generaría una forma de C3 alterada por hidrólisis de su

enlace tioléster, formando $C3(H_2O)$, el que genera un complejo con B nativo, en presencia de concentraciones fisiológicas de Mg^{+2} . El complejo $C3(H_2O),B$ es activado por D formándose una C3 convertasa de fase fluida $C3(H_2O),Bb$. Ésta es la primera enzima capaz de generar C3b metaestable que puede difundir en 60 μ seg, hasta encontrar una superficie receptiva (grupos aminos o hidroxilos). La ruta alterna está siempre iniciada espontáneamente. Si continúa o no dependerá de la naturaleza de la superficie receptiva. La habilidad del enlace tioléster del C3b para reaccionar con una gran variedad de carbohidratos y proteínas, capacita a esta ruta para depositar C3b sobre una amplia gama de microorganismos. C3b se unirá covalentemente a superficies, haciéndolas detectable por fagocitos profesionales o conformando la base para la generación alternativa de convertasas de C3 y de C5. C3b en fase fluida y C3b unido a superficies o membranas del hospedador es rápidamente inactivado por H e I. En cambio, cuando C3b se une a partículas invasoras activantes, las C3 y C5 convertasas son protegidas de la destrucción mediada por las proteínas reguladoras de la fase fluida. Así, se ha determinado que C3b unido a superficies activantes, no muestra afinidad por el factor H, mientras que su afinidad por el factor B y la properdina permanecen inalteradas. La retroalimentación positiva, dependiente de C3b, es una característica exclusiva de la activación de esta ruta, es decir, la convertasa de C3 es capaz de generar muchas moléculas de C3b que tienen la habilidad potencial de generar nuevas convertasas de C3 y C5. Es importante señalar que D convierte a B en Bb sólo cuando éste está unido a C3b. Este proceso es controlado por los factores H e I. Así, la C3 convertasa y el C3b depositado en una superficie activadora son relativamente resistentes a la inactivación por H e I. Este balance entre amplificación y control permite a la ruta depositar C3b en la fase fluida al azar sobre partículas activantes y no activantes, mientras que sólo le permite amplificar aquellas pocas moléculas que se han unido a superficies activantes. La convertasa de C3 estabilizada, $C3b,Bb,P$, al actuar sobre C3, genera una gran cantidad de fragmentos C3b parte de los cuales, en presencia de Mg^{+2} , pueden combinarse con el factor B que se hace sensible a la acción

de D. Se genera así la convertasa de C3 alterna que puede repetir el proceso (Ferreira y Scharfstein, 2002).

2.16.2. Generación del complejo destructor de membranas.

En esta fase participan siete componentes del Sistema: C5-C7, C8 α - γ , C8 β , C9 y la proteína reguladora S. El ensamblaje del MAC puede visualizarse en dos etapas: el ensamblaje del complejo C5b-7, y la unión de C8 y polimerización de C9.

2.16.2.1. Generación de C5b-C7: C5b unido al C3b de la convertasa, expone brevemente un sitio hidrofóbico aceptor para C6, generándose el complejo C5b-6, el que facilita la incorporación de C7. La adhesión de C7 al complejo C5b-7, causa un cambio conformacional en éste, que resulta en la liberación de la C5 convertasa a la fase fluida (Morgan y Harris, 1999). La exposición de un sitio hidrofóbico en C7 permite su penetración inicial en la bicapa lipídica de la membrana celular (Ferreira y Scharfstein, 2002). Sin embargo, existen varias proteínas que inhiben la lisis reactiva mediante su unión a C5b-7 en la fase líquida, antes que se una a la membrana de las células propias (Roitt *et al.*, 2000).

2.16.2.2. Unión de C8 y polimerización de C9: C8 es una molécula compleja formada por tres cadenas: alfa, beta y gama (Morgan y Harris, 1999). Éste, se une al pilar heteropolimérico C5b-C7 a través de su subunidad beta. La porción alfa-gama de C8 pasa a formar parte del dominio hidrofóbico del heteropolímero. Un número variable de moléculas de C9 se asocia a C5b-C8, generándose así, un MAC maduro (C5b-C9), muy eficiente para promover la lisis celular, principalmente por la formación de canales permeables a los iones. Esta estrategia es similar a la usada por las células T killer o citotóxicas y NK que destruyen a la célula blanco insertando una estructura tubular (perforina) en su membrana plasmática.

Los componentes terminales del complemento son hidrofóbicos en su estado no activado. Para expresar su función, consistente en la destrucción o alteración drástica de las membranas externas de los organismos invasores, estos componentes deben sufrir una transición a un estado anfifílico, para poder insertarse en la fase lipídica de éstas. La transición es una característica que define a las proteínas terminales del complemento (Ferreira y Scharfstein, 2002).

Entre otros efectos provocados por la inserción del MAC se encuentran la entrada de Ca^{+2} al ambiente intracelular con la activación indiscriminada de una variedad de rutas metabólicas y la salida de K^{+} con entrada de Na^{+} . Con esto, la célula activará una serie de mecanismos de bombeo compensatorios que conducirán a un gasto indiscriminado de ATP, con alto gasto de energía, sucesos que pueden acelerar la muerte celular (Ferreira y Scharfstein, 2002).

Las interacciones entre el sistema del complemento y los microorganismos se pueden considerar el resultado de una incesante batalla evolutiva. Al ir evolucionando el sistema del complemento, probablemente impulsado por la presión selectiva que ejercen las enfermedades infecciosas, los microorganismos han ido desarrollando mecanismos de protección frente al mismo, y en algunos casos incluso se han aprovechado de él, integrándolo en sus propios mecanismos patogénicos. De hecho, el que un microorganismo sea un patógeno supone que es capaz de burlar, al menos en parte, los mecanismos de defensa del hospedero (Roitt *et al.*, 2000).

2.17. Calreticulina y Sistema del Complemento.

Como fue anteriormente mencionado C1q es la proteína que inicia la ruta clásica del complemento. Esta es una estructura compleja formada por seis regiones globulares, cada una unida a una corta triple hélice de colágeno. La

existencia de receptores en la superficie celular para C1q fue reportada por primera vez en 1972.

Existe un receptor de C1q (C1qR) que se une a las regiones colagenosas de C1q, pero no parece ser un receptor general para estructuras colagenosas. C1qR es una glicoproteína ácida con 15 a 20% de carbohidratos. Luego, se demostró que la unión de C1qR es una función común para cuatro proteínas diferentes, las cuales, con excepción de C1q y MBL no tienen funciones fuertemente similares. C1qR se une a las regiones colagenosas de C1q, y de manera similar a los segmentos colagenosos de MBL, proteína A del surfactante pulmonar (SP-A), y congulinina (Malhotra *et al.*, 1990). El receptor de C1q (C1qR/receptor de colectinas/cC1qR) tiene una secuencia aminoacídica casi completamente idéntica con CRT.

Actualmente, este receptor de C1q es conocido también como CRT (C1qR/collectin receptor/ cC1qR/ CRT). C1qR/CRT está ubicado en la superficie de muchos tipos celulares. La unión de C1q a C1qR desencadena un gran número de respuestas inmunológicas, tales como, fagocitosis, aumento de citoquinas y producción de anticuerpos, y citotoxicidad dependiente de anticuerpos (Stuart *et al.*, 1997).

También se ha mencionado que calreticulina estaría vinculada al proceso de remoción de células apoptóticas. C1q, MBL, y miembros de la familia de las colectinas, se unen a células apoptóticas y estimulan la ingestión de éstas por un ligando ubicado en la superficie de los fagocitos que es calreticulina (cC1qR) (Ogden *et al.*, 2001).

Dentro de CRT existe un dominio denominado S (residuos 160-283) que es el que interactúa con las colas colagenosas de C1q y de proteínas de la familia de las colectinas, SP-A, MBL, CL43 y congulinina (Stuart *et al.*, 1997). Se ha detectado un importante grado de similitud entre los dominios funcionales

relevantes de HuCRT y CRT de parásito, sugiriendo que CRT parasitaria puede también unirse a C1q del hospedero, MBL y otras colectinas interfiriendo con la respuesta inmune para ciertos parásitos por inhibición de la ruta clásica o de las lectinas. HuCRT tiene secuencias similares a los dominios CH2 que unen C1q de IgG (ExKxK, y otros relacionados) (Kovacs *et al.*, 1998), una propiedad compartida por TcCRT y CRT (datos no publicados) de *Necator americanus* (Kasper *et al.*, 2001).

En el modelo *T. cruzi* moléculas parasitarias muy importantes para la infectividad que participan directamente en la inhibición específica de ruta alterna de la activación del complemento, tales como CPR, y proteínas tipo DAF (Schenkman *et al.*, 1986; Norris *et al.*, 1994; Norris *et al.*, 1997; Krautz *et al.*, 2000), han sido descritas. Así, los fragmentos F(ab')₂ y Fab dirigidos contra estas proteínas hacen al parásito susceptible a la acción de la ruta alterna del complemento. Aparentemente, la ruta clásica de activación del complemento jugaría un rol amplificador en el modelo *T. cruzi*, pero no sería capaz de producir una eficiente respuesta lítica (Ferreira *et al.*, 2004b).

La secuencia proteica de HuCRT contiene seis secuencias aminoacídicas cortas con motivos similares a las cabezas globulares de C1q, sitios de unión a la IgG (Kovacs *et al.*, 1998). La secuencia aminoacídica de TcCRT comprende varios motivos de unión homólogos a su contraparte humana, ESKAK, TSKHR, TRRTR, EKRKK, y EERKK. Por otro lado, las colas colagenosas de C1q y MBL se unen al dominio S de HuCRT (incluido en el dominio N y P) (Stuart *et al.*, 1997; Kovacs *et al.*, 1998), con consecuencias funcionales en la correspondiente ruta del complemento. De gran importancia es que ciertas regiones fuera del dominio S son 80% idénticas entre TcCRT y HuCRT. Investigaciones recientes, realizadas en este laboratorio han demostrado que C1q y MBL se unen al dominio S recombinante, de manera dosis dependiente, específica y saturable. De esta forma, la unión, inhibe la hemólisis, mediada por complemento de eritrocitos sensibilizados con inmunoglobulinas *in vitro* (Ferreira *et al.*, 2004a). CRT

recombinante de otros parásitos, también se une e inhibe la función biológica de C1q humano, y específicamente, a los dominios de señal citoplasmática de un número de integrinas, moléculas de adhesión consideradas importantes para la función de leucocitos y plaquetas (Kasper *et al.*, 2001).

III. HIPOTESIS.

Hipótesis:

Considerando que TcCRT nativa (nTcCRT) es inmunogénica, tanto en humanos como en ratones infectados o inmunizados con *T. cruzi*, entonces debiera ser posible generar anticuerpos policlonales contra su dominio funcional S (TcS).

Hipótesis Complementaria:

Si TcS induce anticuerpos policlonales en el modelo lapino, entonces es posible que sus fragmentos F(ab')₂ modulen la interacción entre C1q y TcCRT.

IV. OBJETIVOS.

General:

Contribuir al conocimiento de la capacidad antigénica/inmunogénica de TcCRT y demostrar la capacidad de anticuerpos policlonales de unirse con ella, modulando la interacción de esta molécula con el sistema del complemento.

Específicos:

1. Obtener anticuerpos policlonales lapinos, biológicamente activos, contra el dominio S de calreticulina de *T. cruzi*.
2. Generar fragmentos F(ab')₂ anti-calreticulina de *T. cruzi* recombinante (rTcCRT), y anti-TcS.
3. Determinar la capacidad de los fragmentos F(ab')₂ anti-rTcCRT y anti-TcS para modular la interacción de rTcCRT con C1q del sistema del complemento.

V. MATERIALES Y METODOS.

5.1. Obtención de anticuerpos policlonales lapinos, biológicamente activos, contra el dominio S de calreticulina de *T. cruzi*.

5.1.1. Inmunizaciones y sangrías.

5.1.1.1. Conejos: Se utilizaron 3 conejas New Zealand White, hembras, de 6 meses, adquiridas en el bioterio del Instituto de Salud Pública de Chile. Permanecieron en el bioterio del Programa Disciplinario de Inmunología (PDI), en un recinto cerrado, con luz natural, alimentación y agua *ad libitum* y control médico veterinario permanente.

5.1.1.2. Antígeno: Las conejas se inmunizaron con dominio S de TcCRT (TcS, aa 159–281). El DNA que codifica este dominio fue amplificado por PCR, usando *platinum Taq* polimerasa (Invitrogen). El segmento génico fue clonado en el plasmidio pET15b (Novagen). Para la expresión de la proteína *Escherichia coli* BL21(DE3)pLysS fue transformado en el plasmidio correspondiente y cultivado en presencia de cloranfenicol (34 µg/ml) con ampicilina (50 µg/ml). Luego de agregar isopropil β-D-tiogalactósido e incubar por 3 horas, las células fueron cosechadas, sonicadas en hielo y centrifugadas, y el sobrenadante fue filtrado. La proteína recombinante fue purificada usando una resina unida a histidina (Novagen), eluído con un buffer que contiene 1M de imidazol y dializado contra 2 mM de Tris-HCl y 150 mM de NaCl, pH 7,4. Luego, el dominio TcS fue tratado con trombina para remover el HisTag y purificado por cromatografía de intercambio iónico. La pureza del segmento fue comprobada por SDS-PAGE convencional (Ferreira *et al.*, 2004a).

5.1.1.3. Inóculo: Cada coneja fue desafiada con 150 µg de antígeno (Ag) más coadyuvante de Freund Completo o Incompleto de acuerdo al programa. En el caso de la coneja control se inmunizó sólo con buffer fosfato de sodio 0,01M, pH 7,2 (PBS) y el coadyuvante correspondiente (**Cuadro 1**).

5.1.1.4. Protocolo de Inmunización: Tras un período de adaptación de las conejas en el bioterio del PDI, se realizaron los siguientes procedimientos:

Cuadro 1: Programa de inoculaciones y sangrías.

DÍA	SANGRÍA	INMUNIZACIÓN	SITIO	ADYUVANTE
0	Pre-Inm	----	----	----
10	----	1 ^a	SC	CFA
17	----	2 ^a	IP	CFI
24	Inm 1	----	----	----
31	----	3 ^a	SC e IP	CFI
38	Inm 2	----	----	----
45	Inm 3	----	----	----
52	Inm 4	----	----	----
59	----	4 ^a	SC e IP	CFI
66	Inm 5	----	----	----
73	Inm 6	----	----	----
80	Inm 7	----	----	----

Pre-Inm: Preinmune; **Inm:** Inmune; **SC:** subcutánea; **IP:** Intraperitoneal; **CFA:** Coadyuvante de Freund Completo (1^a inmunización); **CFI:** Coadyuvante de Freund Incompleto (siguientes inmunizaciones)

Nota:

- Por razones éticas no se inoculó en los cojinetes plantares.

- Todas las sangrías se realizaron mediante punción en la arteria central de la oreja.

5.1.1.5. Procesamiento de las muestras (Harlow y Lane, 1988): La sangre fue incubada por 60 min a 37 °C y luego por 60 min a 4 °C. A continuación se centrifugó a 680 xg por 10 min. a 4 °C (centrífuga Internacional Centra MP4R), tras lo cual se traspasó el suero a otro tubo que se centrifugó nuevamente, descartando los glóbulos rojos remanentes. Los sueros así obtenidos se alicuotaron en microtubos y se almacenaron a –20 °C hasta su utilización.

5.1.2. Verificación de la presencia de anticuerpos policlonales contra rTcCRT, TcS y nTcCRT, en los sueros de los conejos inmunizados.

Este objetivo se materializó con dos ensayos: “inmunolectrotransferencia” (IWB) y endayo inmunoabsorbente ligado a enzima (ELISA).

5.1.2.1 IWB:

5.1.2.1.1. Electroforesis (Laemmli, 1970): Se prepararon geles de poliacrilamida al 10%, de 1,5 mm de grosor, en presencia de dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE) (Sigma) y en condiciones reductoras. Para el gel separador se utilizó una solución de acrilamida (Gibco) al 30% p/v, agua desionizada, solución tampón (pH 8,8), persulfato de amonio (Sigma) al 10% p/v y N,N,N',N'-Tetrametiletilendiamina (TEMED) (Bio-Rad) 0,065% v/v. Tras la polimerización a 37 °C, del gel de corrida, se preparó sobre él, el gel concentrador (“stacking”), al 4% p/v a partir de los mismos reactivos antes mencionados, excepto que la solución tampón presentaba un pH 6,8. La polimerización de este gel se realizó con un separador discontinuo. Previo a depositar las muestras en el gel, las proteínas fueron denaturadas con β2-mercaptoetanol (Sigma) 5% v/v, en una solución de glicerol al 50% v/v, azul de bromofenol (Merck) al 0,12% p/v, Trizma base (Sigma) 120 mM y SDS al 4% p/v.

Luego, las muestras fueron calentadas a 100°C, durante 3 min. La electroforesis se realizó en una cámara Bio-Rad a 100 V, a temperatura ambiente.

5.1.2.1.2. Transferencia (Towbin *et al.*, 1979): consistió básicamente en la transferencia de las proteínas corridas en el gel SDS-PAGE al 10% a una membrana de nitrocelulosa (Hybond-ECL, Amersham), en un sistema húmedo estándar (Bio-Rad), durante 60 min a 100 V y a 4 °C. Luego, la membrana se bloqueó en PBS-leche al 5% p/v, durante toda la noche a 4°C. Al día siguiente, se incubó con el primer anticuerpo anti-TcCRT diluido 1:1.000 (policlonal o control monoclonal, incluyendo el control negativo (suero de coneja preimmune), durante 90 min a temperatura ambiente. A continuación, se lavó e incubó con un segundo anticuerpo, una Ig conjugada a fosfatasa alcalina diluida 1/1.000 (DAKO), de la especificidad correspondiente (anti-IgG de conejo o ratón), en las mismas condiciones que la anterior. Finalmente se reveló la membrana con sustrato para fosfatasa alcalina (NBT: Nitro Blue Tetrazolium, BCIP: Fosfato 5-bromo-4-cloroindol, Sigma, y buffer para fosfatasa alcalina).

5.1.2.2. ELISA (Engval y Perlman, 1971): placas de microtitulación de cloruro de polivinilo (PVC) (Fisher Scientific) fueron sensibilizadas con rTcCRT (5 µg/ml), en Na₂CO₃ 0.1M (pH 9,6). Se agregó 100 µl en cada pocillo, incubándose toda la noche a 4°C. Luego, se bloqueó cada pocillo con 200 µl de PBS-Proteína de Soya 0,5% p/v-Tween 20 (Sigma) (0,05% v/v), previo lavado con PBS-Tween 20 (0,05% v/v). Se incubó 90 min a 37 °C (Dynamic Incubator, ABBOTT). Posterior a un lavado, como el descrito anteriormente, las placas fueron incubadas con 100 µl de los sueros en distintas diluciones y en triplicado, durante 90 min a 37 °C. Nuevamente, se lavaron las placas y se incubaron con 100 µl de IgG de cabra anti-inmunoglobulinas de conejo conjugada a peroxidasa (DAKO), en dilución 1:1.000, durante 90 min a 37°C. Finalmente, y tras lavar las placas, se agregó en cada pocillo 200 µl de solución sustrato para peroxidasa (DMAB: ácido 3 dimetil amino benzoico, MBTH: ácido 3 metil 2 benzotiazolinona hidrazona, Sigma, y H₂O₂), se dejó en agitación y se leyó a una longitud de onda de 595 nm de

densidad óptica (Microplate reader, Bio-Rad), a los 5, 10, 15 y 25 min. El SPI se utilizó como control negativo del suero inmune de cada coneja. Como control positivo se utilizó el AcMo E2G7.

En las titulaciones de sueros se definió como *valor de corte* (valor de discriminación entre una muestra positiva y una negativa), al promedio de las densidades ópticas del suero preinmune más dos desviaciones estándar (Zwirner, 1996).

5.2. Generación de fragmentos inmunoglobulínicos F(ab')₂ anti-rTcCRT y anti-TcS.

5.2.1. Purificación de IgG por cromatografía de afinidad (Björck y Kronvall, 1987): la purificación de IgG de conejo se realizó mediante cromatografía de afinidad en una columna de Sefarosa–Proteína G (Pharmacia). El suero, previamente precipitado y descomplementado, fue centrifugado a 13.370 xg por 10 min y, el sobrenadante fue filtrado (Millipore 0,2 µm) y sometido al procedimiento cromatográfico. La columna, una vez equilibrada con PBS, se cargó con 1 ml de suero y luego, se lavó exhaustivamente con PBS. Las IgG adsorbidas se eluyeron con glicina–HCl 0,1 M, pH 2,8. Cada ml del eluido se recibió en tubos con 100 µl de buffer Tris base–HCl 0,1 M, pH 8,6. Se determinó la actividad biológica de las fracciones eluidas mediante: ELISA (dilución 1:1.000), IWB (como descrito en 5.2.a.) y un gel SDS-PAGE que fue teñido con Coomassie Blue R-250 (Sigma), para evidenciar las cadenas livianas y pesadas (H y L) de las Igs. El gel se secó (Speed Gel, SG210D, Savant), durante 45 min. a 80°C. Las fracciones que presentaron la mayor cantidad de Igs, se recolectaron en un solo tubo. El combinado se dializó exhaustivamente contra PBS con azida de Na 0,02% p/v, a 4°C. La concentración proteica se determinó mediante Bradford (Bradford, 1976).

5.2.2. Fragmentación enzimática de las IgGs para la obtención de fragmentos bivalentes F(ab')₂ (Coligan, 1991): 5,1 mg de IgG anti-rTcCRT (obtenidas en Aguilar, 2003), anti-TcS y anti-CFA, purificadas por afinidad en columnas de Sefarosa–Proteína G (Pharmacia) fueron dializadas contra 170 ml de buffer acetato pH 4 durante 4 horas a 4°C. Luego se agregó pepsina (Sigma) 0,1 mg/ml en buffer acetato pH 4, en una relación enzima : anticuerpo de 1:20. Las muestras se incubaron en tubos Falcon (Becton Dickinson) de 50 ml, por 12 horas en un baño termostático (Polytest 20, Bioblock Scientific 86507), a 37°C. Transcurridas las 12 horas de incubación, se detuvo la reacción agregando 2,1 ml de Tris base 2M. Cada muestra fue dializada contra 5 Litros de buffer fosfato salino pH 8 durante de 24 horas totales. A cada muestra se le midió la concentración de proteína mediante espectrofotometría a una absorbancia de 280 nm (Ultrospec III, Pharmacia). La lectura se dividió por 1,48, para expresar la concentración proteica en mg/ml de fragmentos F(ab')₂. La concentración de cada muestra fue de aproximadamente 0,67 µg/µl. Luego, de cada muestra, 16 µl de IgG completa con una concentración de 1,7 µg/µl, fueron cargados en un gel de poliacrilamida al 10%, en presencia de SDS (Sigma) en condiciones reductoras y no reductoras para posteriormente ser teñidas con azul de Coomassie R-250 (Sigma). En condiciones no reductoras, los fragmentos F(ab')₂ se visualizan con un peso molecular aproximado de 110 kDa. En condiciones reductoras los mismos tienen un peso molecular aproximado de 25 kDa. Los fragmentos fueron sometidos a cromatografía de afinidad en una columna de Agarosa–Proteína G (Immuno Pure® G), mediante el mismo procedimiento mencionado en 5.3.1. Esto último se hizo con el fin de eliminar la porción Fc de las IgGs. Las muestras obtenidas en las cromatografías fueron concentradas en tubos Centricom (Amicom, Millipore), para ajustar su concentración a 1,5 µg/µl, midiéndose luego la actividad biológica mediante ELISA como se describe en 5.2.2.

5.3. Determinación de la capacidad de los fragmentos F(ab')₂ anti- rTcCRT y anti-TcS para modular la interacción de rTcCRT o TcS con C1q del sistema del complemento.

ELISA.

La **Figura 1** representa esquemáticamente el diseño experimental de este ensayo inmunométrico.

La actividad biológica de los fragmentos F(ab')₂ fue determinada en un ELISA directo similar al descrito en 5.2.b. Brevemente, placas de PVC fueron sensibilizadas con 4 µg/ml de TcS ó rTcCRT en PBS 1X . Luego de lavar y bloquear, las placas fueron incubadas con 100 µl de 3 concentraciones distintas de los fragmentos F(ab')₂ (50, 5 y 0,5 µg/ml) y una concentración constante de C1q humano puro (Sigma), de 1 µg/ml durante 1 hora a 37°C. Luego de lavar, las placas fueron incubadas con un anticuerpo de cabra anti C1q humano (Sigma), diluido 1:4000. Luego de lavar, las placas fueron incubadas con un anticuerpo de conejo anti-IgG de cabra conjugadas a peroxidasa (Calbiochem), en una dilución de 1:12.000. Finalmente, y tras lavar, se agregó en cada pocillo 100 µl de solución sustrato para peroxidasa ABTS (Sigma), se agitó y se leyó a 405 nm, cada 5 minutos durante 1 hora.

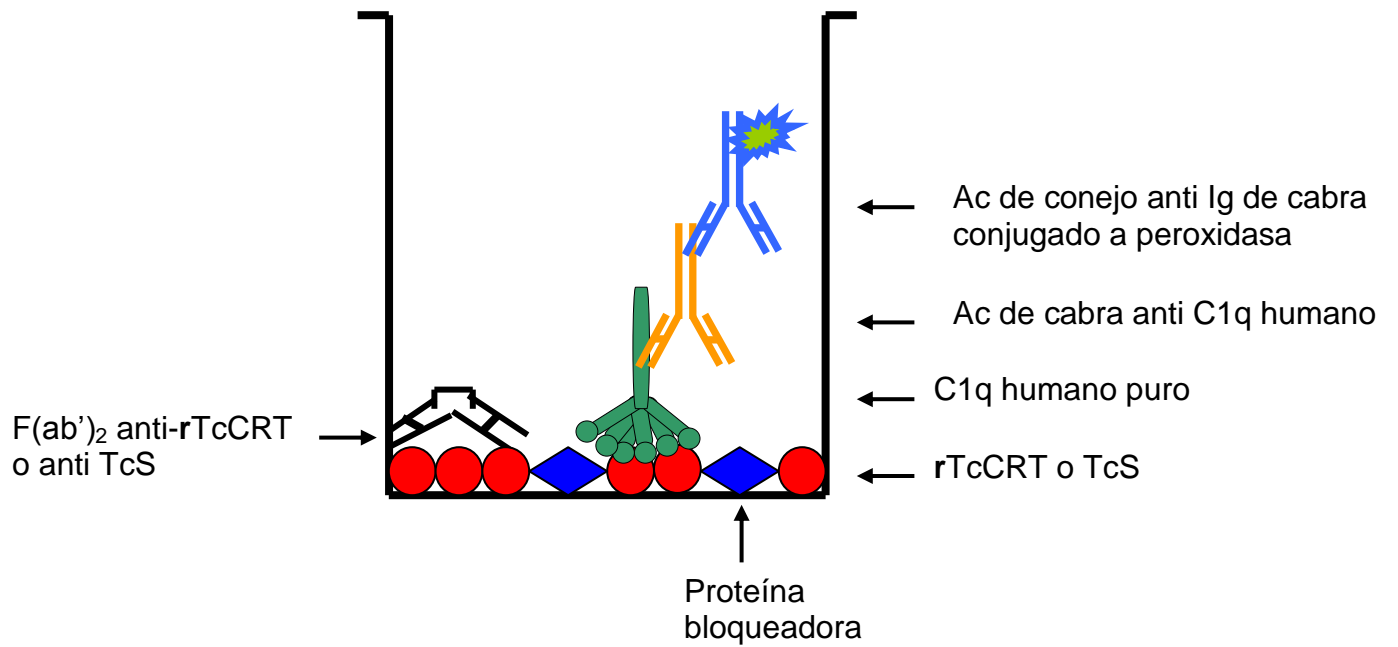


Figura 1. Diseño experimental del ensayo de inhibición de la interacción de C1q del complemento humano con rTcCRT o TcS.

VI. RESULTADOS.

6.1. Generación de anticuerpos policlonales lapinos, biológicamente activos, contra el dominio S de TcCRT.

6.1.1. Inmunizaciones y sangrías.

El procedimiento de inmunización no generó patologías, como granulomas ni abscesos en los animales experimentales. El rendimiento total de los sueros policlonales generados por las 2 conejas inmunizadas con TcS fue aproximadamente de 180 ml, en 7 sangrías. Terminado el procedimiento experimental, los animales fueron donados como mascotas.

6.1.2. Verificación de la presencia de anticuerpos policlonales contra rTcCRT, TcS y nTcCRT, en los sueros experimentales.

6.1.2.1. Inmunoelectrotransferencia: Se realizó un IWB utilizando los sueros obtenidos de la coneja 1 y 2 inmunizadas con TcS, de la segunda sangría inmune y su respectivo suero preinmune. Como control positivo se utilizó el anticuerpo monoclonal E2G7 específico contra TcCRT. Estos resultados se resumen en la **Figura 2.**

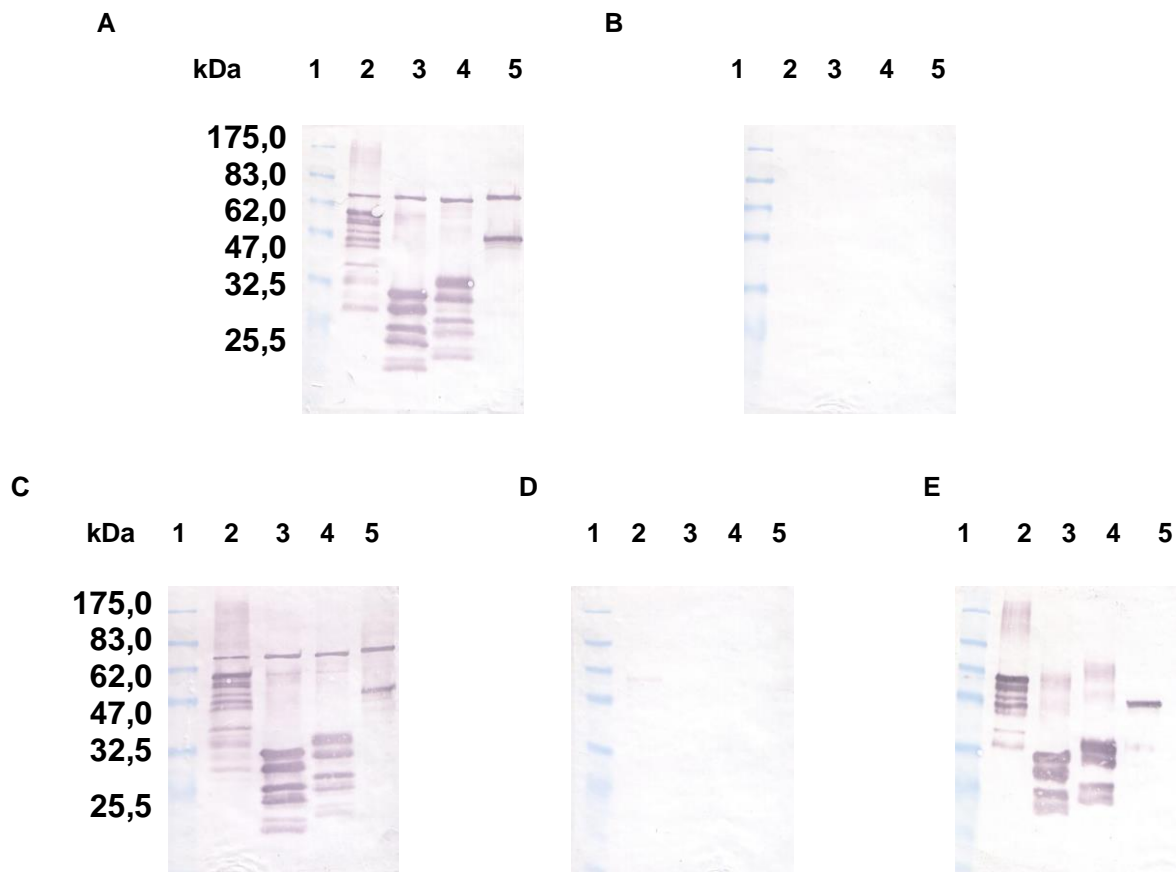


Figura 2. Detección por IWB de anticuerpos anti-rTcCRT, TcS, TcR y nTcCRT *Trypanosoma cruzi* en sueros policlonales lapinos. (1) marcador de peso molecular pre-teñido; (2) 1 μ g de rTcCRT; (3) TcS; (4) TcR; (5) extracto completo de epimastigotes, respectivamente. Las membranas fueron incubadas con una dilución de 1:1.000 de suero inmune anti-TcS (paneles A y C) y preinmune (paneles B y D). El anticuerpo monoclonal E2G7 fue usado como control positivo (panel E).

El anticuerpo monoclonal reconoció todos los antígenos presentes en la membrana de nitrocelulosa (rTcCRT, TcS, TcR). También reconoció a nTcCRT presente en el extracto completo de epimastigotes (**Figura 2, E**). Los sueros inmunes de ambas conejas reconocieron bandas correspondientes al peso molecular de rTcCRT y sus dominios funcionales TcS y TcR. Estas proteínas recombinantes presentaron bandas adicionales de un peso molecular inferior correspondientes a productos de degradación y superior, probablemente, correspondiente a dímeros o agregados de la proteína parasitaria. Al enfrentar los sueros inmunes a extracto completo de epimastigotes, se puede apreciar una banda de aproximadamente 45 kDa, correspondiente a nTcCRT (**Figura 2, A y C**). Los sueros preinmunes de ambas conejas no reconocieron bandas al ser enfrentados a las mismas fuentes antigénicas (**Figura 2, B y D**).

En la **Figura 3** se muestra la reactividad comparativa de los anticuerpos de conejo anti-TcS con la del suero de conejo inmunizado con coadyuvante completo de Freund (CFA) y con la del anticuerpo monoclonal E2G7, contra extracto completo de epimastigotes en IWB. Las membranas de nitrocelulosa fueron cargadas con extracto completo de epimastigotes, como fuente de nTcCRT.

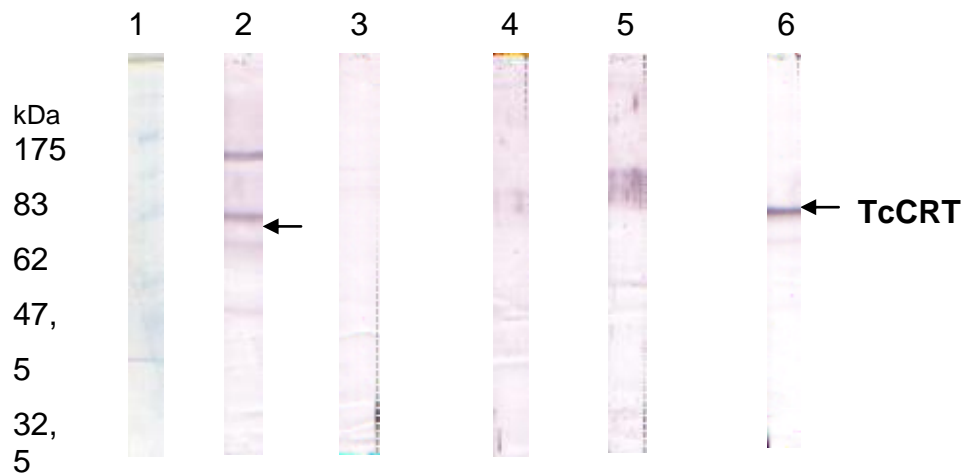


Figura 3. Reactividad comparativa de los anticuerpos de conejo, inmunizados con TcS y CFA con la del anticuerpo monoclonal E2G7. Se usó un extracto completo de epimastigote, en un IWB. La flecha indica TcCRT. (1) Marcador de peso molecular pre-teñido. 2-6, extracto completo de epimastigotes, probados con: (2) anticuerpo policlonal anti-TcS; (3) suero pre-immune, (4) suero de conejo inmunizado con CFA; (5) su suero pre-immune; (6) E2G7. La banda de 72 kDa es reconocida sólo por el suero policlonal anti-TcS.

En los carriles 2 (revelado con el suero policlonal) y 6 (revelado con E2G7), se observan bandas de aproximadamente 47 kDa correspondientes a nTcCRT. En el carril 2 (antisuero policlonal), se observa una banda de aproximadamente 72 kDa no detectada en el carril 6 (E2G7). Presumiblemente, se trata de agregados de nTcCRT, que ocultarían el epítipo reconocido por el anticuerpo monoclonal E2G7. Estas bandas de 47 y 72 kDa, no son reconocidas por el suero pre-inmune, ni por el suero de conejo inmunizado con CFA.

6.1.2.2. ELISA: la **Figura 4** muestra la dinámica en el tiempo de la respuesta humoral anti-TcS de ambas conejas. Se puede observar que la respuesta va en aumento a medida que avanza el número de sangrías, excepto en la sangría inmune 7 de la coneja 1. Para fines posteriores, se eligió el antisuero 6 de la coneja 2, ya que presenta una buena respuesta aparente y se contó con un mayor volumen.

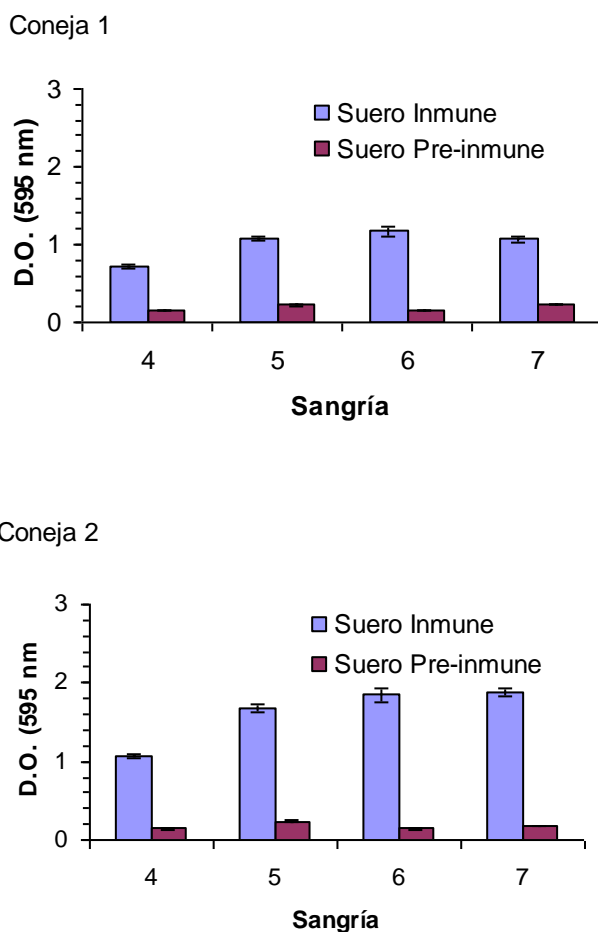


Figura 4. Respuesta inmune humoral lapina anti-TcS de *T. cruzi*, evaluada mediante ELISA. En cada par de barras, la de la izquierda representa la respuesta del antisuero diluido 1:64.000 de la coneja inmunizada con TcS; la de la derecha, representa la sangría preinmune de cada coneja, en la misma dilución.

Cada barra expresa la media de 3 mediciones, indicándose sus respectivas desviaciones estándares.

Se seleccionó la sexta sangría para titularla mediante ELISA. Se calculó el *valor de corte* como el promedio de las densidades ópticas obtenidas en la dilución 1:80.000 del suero pre-inmune más dos desviaciones estándar. En la **Figura 5**, se muestra que aún en la dilución de 1:5.120.000 se obtuvo una señal positiva. Al realizar una prueba de t de comparación de medias, se obtuvo un valor de p significativamente mayor que la generada por el suero preinmune en esta misma dilución.

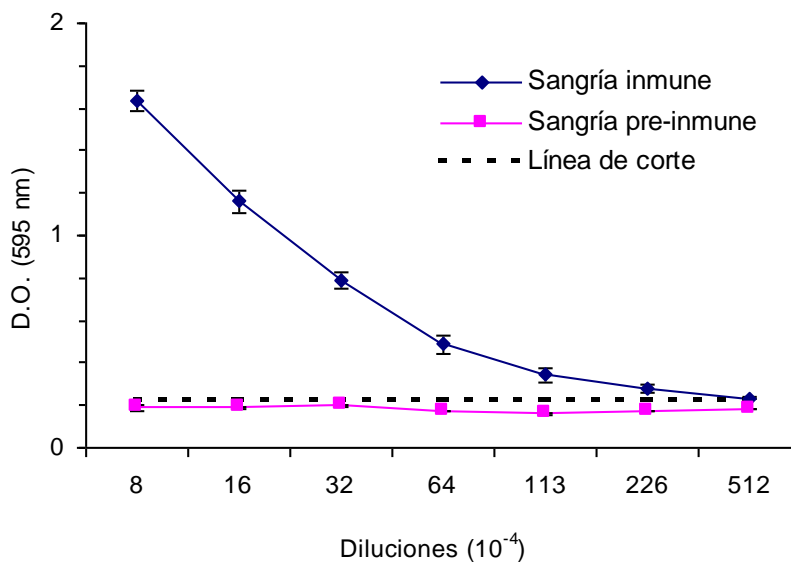


Figura 5. Titulación de suero pre-inmune e inmune de conejo anti-TcS (6° sangría), mediante ELISA. Cada punto corresponde a la media de 3 mediciones para cada dilución, indicándose las respectivas desviaciones estándares (en el caso del suero pre-inmune no se observan, por ser marginales).

6.2. Generación de fragmentos F(ab')₂ anti-rTcCRT y anti-TcS.

6.2.1. Purificación de IgG por cromatografía de afinidad: El suero seleccionado fue purificado por afinidad en una columna de Sefarosa–Proteína G. La **Figura 6** ilustra el resultado de este procedimiento.

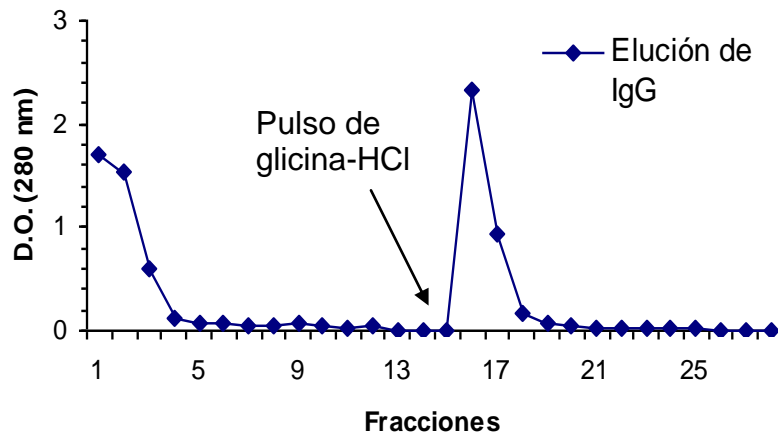


Figura 6. Purificación de IgG anti-rTcCRT, anti-TcS y de animales inmunizados con CFA, por cromatografía de afinidad en columna de Sefarosa–Proteína G. Fracciones 1–5: frente cromatográfico; fracciones 6–15: lavado; fracciones 16–28: Eluido. La flecha señala el momento de aplicación del pulso de bajo pH.

Las primeras 5 fracciones corresponden a diferentes proteínas que no son retenidas en la columna. Las fracciones 6-14 corresponden al lavado, que se efectúa midiendo la concentración de cada fracción por espectrofotometría. Una vez que la densidad óptica llegó a 0,00 nm, se aplicó un pulso de Glicina–HCl 0,1 M; pH 2,8 para eluir las IgG capturadas en la columna, lo que se aprecia como un peak en la fracción 16. Este procedimiento se realizó varias veces purificando distintos tipos de IgG de 3 antisueros distintos anti-rTcCRT, TcS y de animales inmunizados con CFA. Todas las cromatografías realizadas mostraron un resultado similar.

6.2.2. Análisis electroforético de IgGs lapinas anti-TcS purificadas por afinidad: Para evaluar la presencia de Igs en las distintas fracciones cromatográficas, se realizó un SDS-PAGE al 10%, teñido con Azul brillante de Coomassie R en condiciones reductoras. Los resultados se resumen en la **Figura 7**.

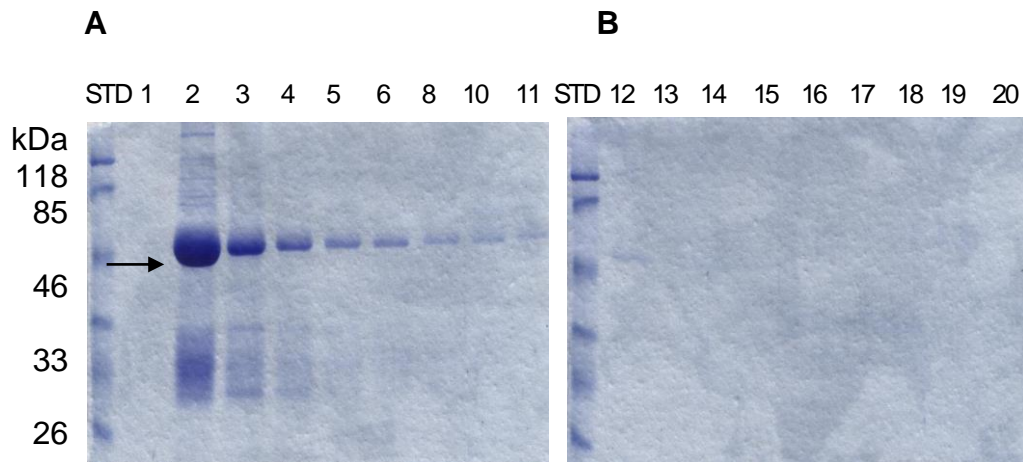


Fig. 7. SDS-PAGE al 10% teñido con Azul de Coomassie R de los anticuerpos anti-TcS purificados por cromatografía de afinidad en columna de Sefarosa-Proteína G. La secuencia de las fracciones eluidas están indicadas por los números 1–20. La flecha indica la posición de la cadena H pesada de la IgG. Las cadenas livianas L sólo son visibles en las fracciones más concentradas y muestran una heterogeneidad esperable.

Se pueden observar las primeras 12 fracciones correspondientes al eluido. Cada fracción está representada principalmente por dos bandas de aproximadamente 46 y 25 kDa, correspondientes a la cadena pesada (H) y liviana (L) de la IgG. Además, se puede observar que las fracciones 2, 3 y 4 tienen la mayor concentración de IgG, disminuyendo de forma gradual en las fracciones

siguientes. Todas las cromatografías realizadas de los 3 diferentes antisueros mostraron el mismo resultado.

6.2.3. Identificación, mediante IWB, de las IgG anti-TcS, purificadas por inmunoafinidad: Estos resultados se resumen en la **Figura 8**.

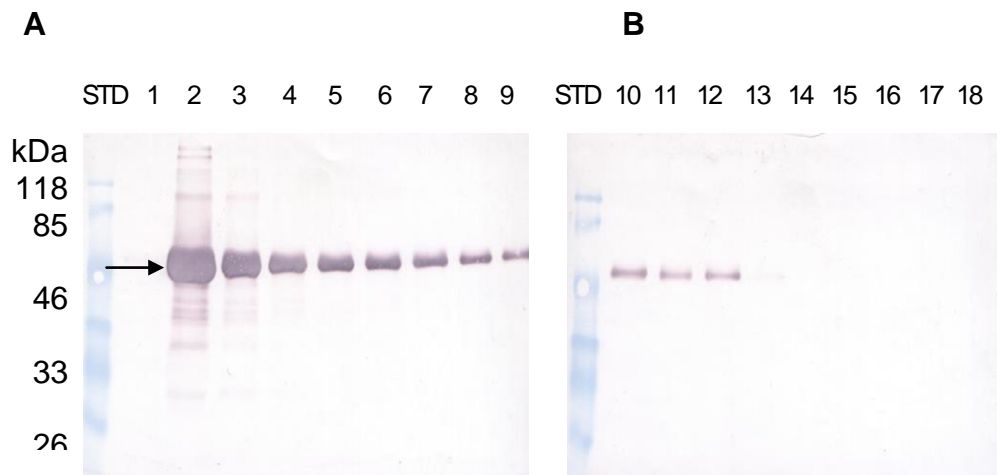


Figura 8. IWB de las IgG de conejo anti-TcS, purificadas por afinidad en columna de Sefarosa-Proteína G. Las inmunoglobulinas transferidas fueron detectadas con un anticuerpo específico para la cadena H de las IgG de conejo (flecha), en un procedimiento inmunoenzimático convencional.

Las primeras 11 fracciones correspondientes al eluido se visualizaron a través de un método enzimático IWB. Dado que el anticuerpo utilizado para detectar la IgG es anti-cadena pesada, no se detectan las cadenas livianas. Además, se observa que las fracciones 2, 3 y 4 tienen la mayor concentración de IgG. Todas las cromatografías, realizadas con 3 antisueros diferentes generaron resultados similares.

6.2.4. Actividad biológica de las IgG obtenidas por inmunoafinidad: Cada fracción, diluida 1/1.000 fue probada en un ELISA convencional. Los resultados se muestran en la **Figura 9**.

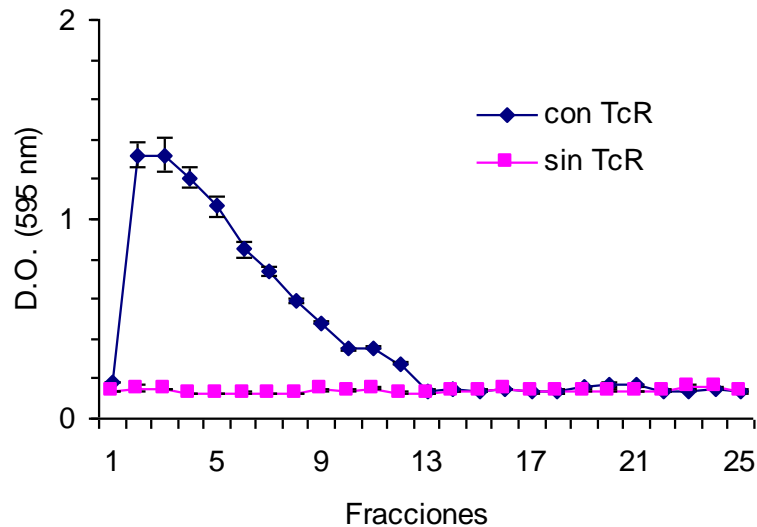


Figura 9. Actividad biológica de las IgG de conejo anti-TcS, purificadas en columna de Sefarosa-Proteína G. Placas de ELISA fueron sensibilizadas con 500 ng/ pocillo de TcR. Como control negativo se usó buffer carbonato. Cada fracción, diluida 1/1000 fue usada como fuente de anticuerpos. Cada pocillo fue probado con una enzima específica anti IgG de conejo en un ELISA convencional.

Se observa que la reactividad se concentra en las fracciones 2 y 3. Como fue señalado anteriormente estas fracciones son las que contienen la mayor cantidad de IgG.

6.2.5. Evaluación de la fragmentación de las IgGs por pepsina, para la obtención de fragmentos F(ab')₂: Para visualizar la fragmentación de las IgGs, se realizaron 2 SDS-PAGE al 10% teñidos con Azul de Coomassie, en condiciones reductoras y no reductoras respectivamente. En ambos geles se cargaron IgGs completas y su respectivo fragmento F(ab')₂ anti-rTcCRT, anti-TcS y anti-CFA . Los resultados se muestran en la **Figura 10**.

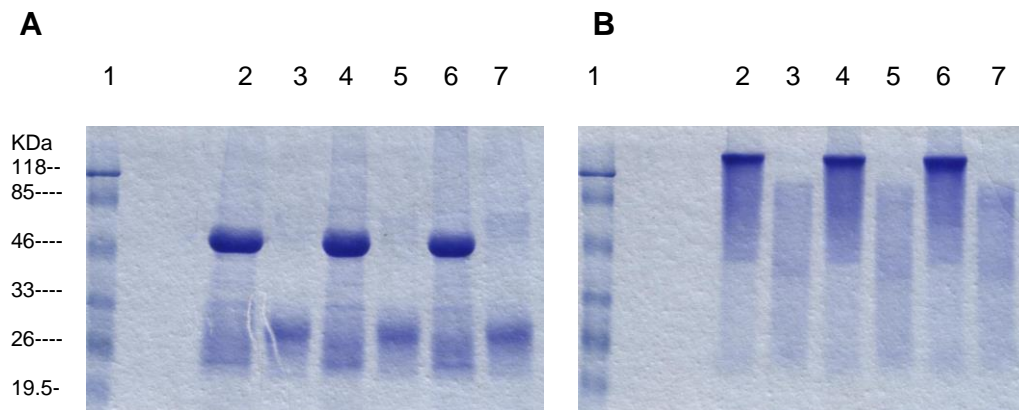


Figura 10. SDS-PAGE al 10%, teñido con Azul de Coomassie, de IgG completa y fragmentos F(ab')₂ anti-rTcCRT, TcS y CFA. 1: Marcador de peso molecular preteñido. 2, 4, 6: IgG completa (anti-rTcCRT, TcS y CFA, respectivamente). 3, 5, 7: Fragmentos F(ab')₂. Condiciones: A, reductoras; B: No reductoras.

En el gel realizado en condiciones reductoras (Panel izquierdo, carriles 2, 4 y 6), se visualizan las IgG completas, representadas por dos bandas de peso molecular 46 y 25 kDa, correspondientes a las cadenas H y L de la IgG. De acuerdo a lo esperado, los fragmentos F(ab')₂ están formados por una banda de alrededor de 25 kDa, correspondiente a las cadenas L y a los fragmentos de la cadena H. En el gel realizado en condiciones no reductoras, las IgG completas se visualizan como una banda de peso aparente superior a 118 kDa (presumiblemente, 150 kDa). Los fragmentos F(ab')₂ están representados por una banda heterogénea de alrededor de 110 kDa.

6.2.6. Actividad biológica de los fragmentos $F(ab')_2$ anti-TcS: Para verificar que los fragmentos fueran funcionales, se realizó un ELISA convencional, cuyo resultado se muestra en la **Figura 11**.

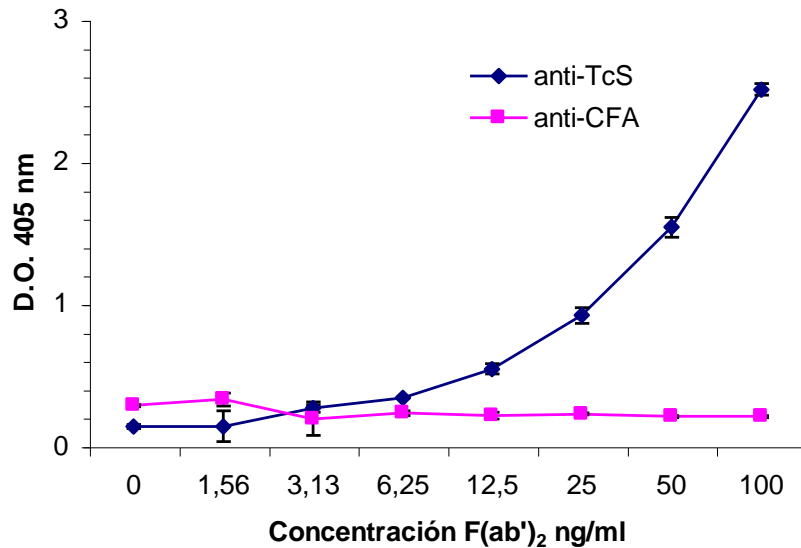


Fig. 11. ELISA de actividad biológica de los fragmentos $F(ab')_2$. Placas de ELISA fueron sensibilizadas con 400 ng / pocillo de TcS. El resto del ensayo se llevo a cabo de manera convencional, como se resume básicamente en la leyenda de la **Figura 5**.

El gráfico representan las densidades ópticas alcanzadas a los 35 minutos de lectura a diferentes concentraciones de los fragmentos $F(ab')_2$ anti-TcS. Como control negativo se usó $F(ab')_2$ obtenidos de un suero de conejo inmunizado con CFA.

6.3. Determinación de la capacidad de los fragmentos F(ab')₂ anti-rTcCRT y anti-TcS para modular la interacción de rTcCRT con C1q del sistema del complemento.

6.3.1. ELISA para comprobar la unión de TcS a C1q del complemento humano: Se enfrentaron distintas concentraciones de TcS a una dosis previamente estandarizada de C1q humano puro. Los resultados se muestran en la **Figura 12**.

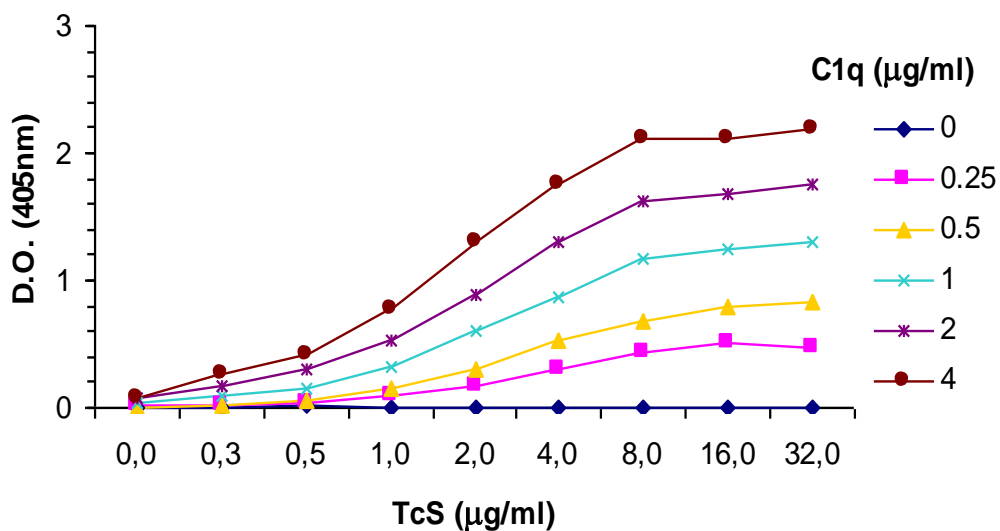


Fig. 12. ELISA para comprobar la unión de TcS a C1q del complemento humano. Cada curva representa la interacción de una concentración de C1q con concentraciones crecientes de TcS. La unión de TcS a C1q es dosis dependiente, específica y saturable.

Se observa una unión concentración dependiente, específica y saturable de TcS a C1q del complemento humano.

6.3.2. Determinación del efecto modulador de fragmentos F(ab')₂ anti-rTcCRT o anti-TcS, en la inhibición de TcCRT sobre la ruta clásica del complemento humano: El efecto de estos anticuerpos sobre la interacción de C1q con las proteínas parasitarias recombinantes rTcCRT y TcS se estudió en ensayos de ELISA convencionales, según lo descrito en Materiales y Métodos. Los resultados obtenidos se resumen en la **Figura 13**.

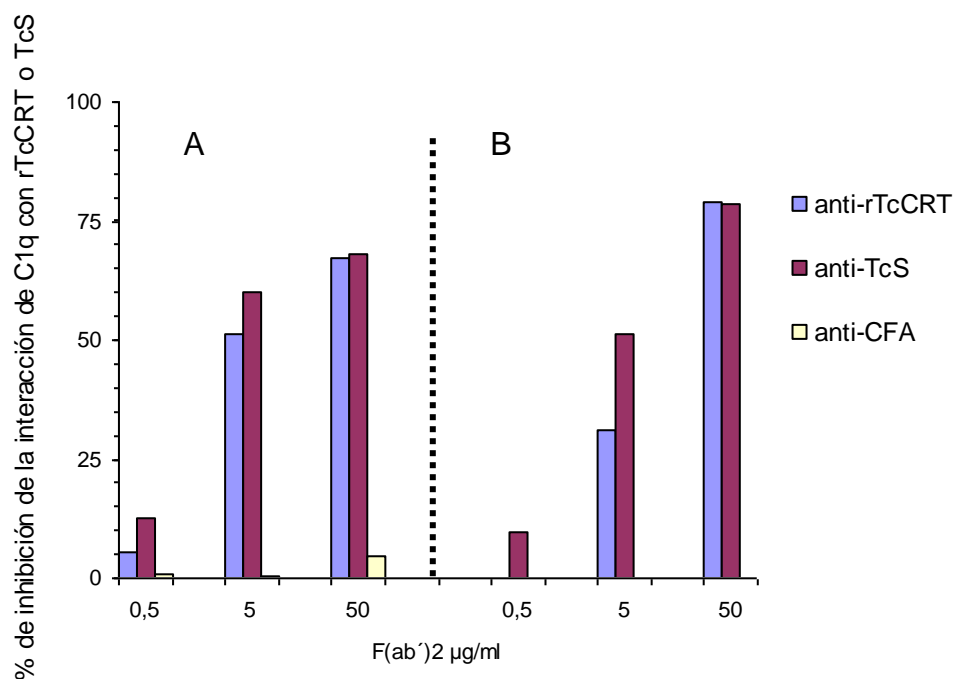


Figura 13. ELISA para determinar el efecto modulador de fragmentos F(ab')₂ anti-rTcCRT o anti-TcS, en la inhibición de TcCRT sobre la ruta clásica del complemento humano. Panel: efecto de fragmentos F(ab')₂ anti-rTcCRT y anti TcS sobre la interacción de C1q con rTcCRT Panel B: efecto de fragmentos F(ab')₂ anti-rTcCRT y anti TcS sobre la interacción de C1q con TcS. Los tres grupos de barras de cada panel muestran el efecto de tres concentraciones logarítmicas de fragmentos F(ab')₂, (0,5-5 y 50 µg/ml). Cada barra de color

representa fragmentos $F(ab')_2$ anti-rTcCRT, anti-TcS y anti-CFA (de izquierda a derecha).

Cuando la sensibilización de las placas se hizo con rTcCRT (**Figura 13A**), se observó una fuerte inhibición de la interacción con C1q, con 5 y 50 $\mu\text{g/ml}$ de fragmentos $F(ab')_2$ anti-rTcCRT y anti-TcS. Un efecto aún mayor se observó en la inhibición de la interacción de TcS con C1q, **Figura 13B**. En este caso los anticuerpos anti-TcS fueron efectivos en concentraciones de 0,5 $\mu\text{g/ml}$. Los fragmentos $F(ab')_2$ derivados de sueros de animales inmunizados con CFA no fueron efectivos en ninguna de las concentraciones utilizadas. $F(ab')_2$ anti-CFA no se observa inhibición de la unión en ninguna de las tres concentraciones de fragmentos utilizadas.

VII. DISCUSION.

Calreticulina (CRT), es altamente conservada y multifuncional, encontrándose en todas las células de los organismos superiores, con excepción de eritrocitos. TcCRT, molécula descrita en nuestro laboratorio, presenta una serie de funciones compartidas con su homóloga vertebrada. TcCRT podría tener varias implicancias en la fisiopatología de la infección tripanosómica, tanto en humanos como en animales.

Entre las funciones estudiadas en este laboratorio, están sus roles como proteína ligante de calcio, inhibidora de la angiogénesis y de shock térmico. Pero de particular interés ha resultado su habilidad para combinarse específicamente con componentes iniciales del sistema del complemento humano. Así, se ha demostrado *in vitro* que rTcCRT y sus dominios (TcS y TcR) se unen específicamente a subcomponentes de la ruta clásica y de las lectinas, específicamente a las colas colagenosas de C1q y de las lectinas que unen manosa. Como consecuencia de esta unión se observó una inhibición funcional específica de la ruta clásica y de las lectinas (Ferreira *et al.*, 2004a).

Por otra parte, TcCRT se ha detectado en la superficie de tripomastigotes infectantes y, por microscopía confocal se ha colocalizado con C1q humano. Más aún, esta interacción se traduce en una fuerte inhibición de la generación de C4b, componente central para la formación de la C3 convertasa clásica, C4b,2B. Así, TcCRT interfiere con el punto inicial de activación de esta ruta. De esta manera, TcCRT parece ser un factor crítico que contribuiría a la habilidad de los tripomastigotes para interferir con estados tempranos de la activación del complemento (Ferreira *et al.*, 2004a).

Basados en estos hallazgos, nos hemos preguntado si es posible interferir inmunológicamente en esta interacción, revirtiendo así una estrategia parasitaria potencialmente importante para su infectividad. Surge así, la

posibilidad de generar herramientas con potencial biotecnológico. De esta forma, las estrategias experimentales de esta Memoria de Título se orientaron a producir fragmentos inmunoglobulínicos $F(ab')_2$ anti-rTcCRT y anti-TcS, dominio directamente involucrado en esta interacción. Como las inmunizaciones se iniciaron incluyendo coadyuvante de Freund completo (CFA), se estimó necesario generar fragmentos $F(ab')_2$ a partir de sueros de conejos inoculados sólo con este producto. Al usar estos fragmentos como controles negativos se puede descartar que los efectos inmunomodulatorios postulados se deban a anticuerpos generados contra componentes antigénicos de micobacterias. El uso de fragmentos $F(ab')_2$ en los experimentos propuestos, se debe a la necesidad de descartar interacciones entre C1q y los fragmentos Fc de estas inmunoglobulinas. Estos fragmentos bivalentes fueron usados en un ensayo inmunométrico de ELISA, donde demostraron ser capaces de unirse a rTcCRT o su dominio funcional TcS, inhibiendo la unión de éstos a C1q del complemento humano, como se demuestra en la Figura 13.

Para la generación de los fragmentos inmunoglobulínicos, fue necesario producir anticuerpos policlonales lapinos específicos contra rTcCRT (Aguilar, 2003) y TcS.

Como se desconocía la capacidad inmunogénica/antigénica de TcS en el modelo lapino, se seleccionó al coadyuvante de Freund completo como agente inmunoestimulador. Las vías de inoculación de elección fueron la subcutánea y la intraperitoneal, descartándose los cojinetes plantares, por tratarse de un procedimiento bioéticamente inaceptable, causante de gran inflamación y sufrimiento en el animal de experimentación. Por esta misma razón en cada sangría, se extrajeron volúmenes no superiores a los 30 ml desde la arteria central de la oreja.

Para verificar la presencia de anticuerpos anti-TcS en los sueros obtenidos en la primera sangría inmune, se realizó un IWB. Los anticuerpos anti-TcS

reconocieron rTcCRT, TcS, TcR y nTcCRT, este último en el contexto de un extracto completo de epimastigotes (Figura 2). Como control negativo, se utilizó el suero pre-inmune de cada animal, el que no reconoció las moléculas parasitarias mencionadas (Figura 2B y 2D). Como control positivo, se utilizó E2G7, anticuerpo monoclonal específico contra rTcCRT, generado en nuestro laboratorio. Este anticuerpo sigue un patrón muy similar de reconocimiento, al compararlo con el suero inmune anti-TcS (Figura 2E). El anticuerpo policlonal probado en este ensayo, reconoce bandas de peso molecular aparente de 72 kDa, no reconocidas por E2G7 (Figura 2A y 2C). Es probable que estas bandas correspondan a homo-oligómeros de rTcCRT, de sus dominios funcionales o de la proteína nativa (Figura 2A y 2C).

En el caso de la proteína nativa, en el contexto del extracto completo de epimastigotes, también es probable que las bandas de alto peso correspondan a moléculas antigénicamente relacionadas con nTcCRT. Si la oligomerización explica los resultados mostrados en las Figuras 2A y 2C, ésta podría ocurrir a través de puentes disulfuro, ya que el β 2-mercaptoetanol es un alcohol no cargado eléctricamente que durante la electroforesis permanece en el pocillo del gel, por lo cual las moléculas proteicas pueden reasociarse a través de puentes disulfuro. Otra posibilidad es que la oligomerización se realice mediante enlaces, no reducibles por β 2-mercaptoetanol (por ejemplo, enlaces tipo amidoéster o hidróxiéster). Por otro lado, la presencia de bandas de peso molecular inferior al esperado, podría interpretarse como productos de degradación enzimática. Como en los carriles que contienen extracto completo de epimastigotes, como fuente de nTcCRT, no se observan estos productos de degradación, es probable que la proteína nativa esté mejor protegida contra la degradación enzimática, que su contraparte recombinante (Figuras 2A y 2C carril 5). En síntesis, este experimento fue informativo y generó un patrón interpretable de bandeo. Estos experimentos demuestran que TcS fue inmunogénico en ambas conejas, generando anticuerpos que reconocen no sólo a este dominio, sino también a rTcCRT, a TcR y a la proteína nativa.

Para comparar la reactividad de los anticuerpos anti-TcS y monoclonal E2G7 con la reactividad de los sueros anti-CFA, probados con un extracto completo de epimastigotes, se realizó un IWB (Figura 3). Ambos anticuerpos, tanto policlonal como monoclonal, reconocieron una banda de alrededor de 45 kDa correspondiente a TcCRT (Figura 3, carriles 2 y 6). El anticuerpo policlonal anti-CFA (Figura 3 carril 4) y los sueros pre-inmunes (Figura 3 carriles 3 y 5), no reconocieron la banda de 45 kDa.

Una vez determinado que los sueros obtenidos de ambas conejas eran portadores de anticuerpos anti-TcS, se procedió a analizar la dinámica en el tiempo, mediante ELISA, de las 4 últimas sangrías inmunes. Aunque la máxima respuesta fue detectada en la sangría 7 de la coneja 2, se escogió para las siguientes etapas experimentales, la sangría inmune 6 de esta misma coneja, por encontrarse en mayor volumen (Figuras 4). Esta sangría 6 se tituló mediante ensayo inmunoenzimático de ELISA (Figura 5).

Luego, se precipitaron las Igs con sulfato de amonio y se purificaron mediante cromatografía de afinidad en columnas de Sefarosa-Proteína G (Figura 6).

Las fracciones inmunoglobulínicas eluidas, fueron visualizadas a través de un SDS-PAGE al 10% (Figura 7), donde se detectaron sus cadenas H y L, en las proporciones esperadas.

Estas fracciones fueron probadas en IWB, donde las cadenas H fueron detectadas con anticuerpos específicos (Figura 8).

Todos los procedimientos antes mencionados se realizaron, también, con otros 2 anticuerpos policlonales, anti-rTcCRT y anti-CFA. Ambos mostraron el mismo patrón de reconocimiento antigénico, tanto en el SDS-PAGE al 10%

como en IWB. Estos resultados formaron parte de otra Memoria de Título (Aguilar, 2003).

Dado que, durante el proceso de purificación, las inmunoglobulinas fueron sometidas a precipitación con sulfato de amonio, descomplementación por calor y cambios de pH, fue necesario determinar sus actividades biológicas (capacidad de reconocer al antígeno), cada fracción fue probada en ELISA. La Figura 9, muestra una concentración de la actividad biológica en las fracciones 2-7. Esto concuerda con los resultados obtenidos en SDS-PAGE al 10%, donde se observa una mayor concentración de inmunoglobulinas en esas fracciones (Figura 7). Por tanto, podemos concluir, que a pesar de los drásticos procedimientos usados, las IgG mantuvieron su actividad biológica.

Comprobada la funcionalidad de los anticuerpos (Ac) purificados, éstos fueron fragmentados con pepsina para generar fragmentos inmunoglobulínicos bivalentes $F(ab')_2$. Estos contienen dos fragmentos Fab unidos covalentemente por puentes disulfuro en la región bisagra de la IgG. Además, producto de la digestión, se obtienen pequeños fragmentos peptídicos derivados de la degradación de la región carboxiterminal Fc de las cadenas pesadas. Los 3 tipos de IgG (anti-TcS, anti-rTcCRT y anti-CFA) fueron incubados con pepsina por un tiempo, pH, temperatura y proporciones previamente estandarizadas en experimentos preliminares, y de acuerdo a metodología convencional (Coligan, 1991). Una vez terminado el proceso de incubación, el producto obtenido debió llevarse a un pH adecuado mediante diálisis. Luego, se verificó que las IgG fueron correctamente fragmentadas. Para ello, se las analizó en SDS-PAGE al 10% teñidos con Azul de Coomassie R en condiciones reductoras y no reductoras (Figuras 10A y 10B). En ambos geles se depositaron los 3 tipos de fragmentos (anti-rTCCRT, anti-TcS y anti-CFA), cada uno acompañado de su IgG homóloga completa. En el gel en condiciones reductoras (Figura 10A), en las IgG no digeridas, se observa una banda ligeramente sobre los 46 kDa, para los 3 tipos de anticuerpos (Figura 10A, carriles 2, 4 y 6). En el mismo gel, y de

acuerdo a lo esperado, los fragmentos $F(ab')_2$ se observan con un peso relativo, cercano a los 26 kDa, para los 3 casos (Figura 10A, carriles 3, 5 y 7). La molécula $F(ab')_2$, reducida, conserva sus cadenas livianas intactas y porciones similares de las cadenas pesadas, cada una de ellas con pesos cercanos a 26 kDa. La mayor heterogeneidad de esta banda pudiera deberse, entre otros factores a glicosilaciones diferenciales. Los carbohidratos unidos covalentemente contribuyen en el tamaño, viscosidad y localización de muchas glicoproteínas (Schulz y Schirmer, 1979). En cambio, en el gel no reductor, las IgG completas, se observan con un peso molecular superior a los 118 kDa (Figura 10B, carriles 2, 4 y 6) y los fragmentos como un bandeo heterogéneo entre los 85 y 46 kDa (Figura 10B, carriles 3, 5 y 7). Esto se puede deber a la heterogeneidad en el tipo de IgG policlonales. Con estos resultados, podemos concluir que los anticuerpos fueron efectivamente fragmentados, generando fragmentos $F(ab')_2$ anti-TcS, anti-rTcCRT y anti-CFA.

Posteriormente, estos fragmentos fueron sometidos a cromatografía de afinidad en columnas de Sefarosa-Proteína G, para eliminar las regiones Fc remanentes. En este caso, los fragmentos $F(ab')_2$ no son retenidos por la columna, ya que carecen de la región que tiene afinidad por la proteína de la región CH2, que tiene un dominio afín con la Proteína G. Por el contrario, las regiones Fc presentes en la muestra serán, adsorbidas por la columna (y luego eliminadas de ésta aplicando un pulso de glicina-HCl 0,1 M, con pH ácido, para regenerar la columna). Luego se realizó un *pool* con cada uno de los tres tipos de fragmento y se concentraron las muestras.

Una vez purificados los fragmentos $F(ab')_2$, fue necesario verificar, también, su actividad biológica. Para esto, diseñamos un ensayo de ELISA (Figura 11). Las placas se sensibilizaron con TcS y se enfrentaron a los fragmentos anti-TcS y anti-rTcCRT. En cada placa se utilizó como control negativo el fragmento $F(ab')_2$ de animales inmunizados con CFA. Como era de esperarse, los fragmentos anti-CFA no reconocieron el antígeno TcS, a diferencia de los

fragmentos anti rTcCRT y anti-TcS. Por lo tanto, a pesar de la gran variedad de procedimientos drásticos a que se sometieron las inmunoglobulinas, éstas conservaron su capacidad de reconocer a los inmunógenos que indujeron su producción.

Luego, fue necesario corroborar la unión de TcS, dominio funcional de TcCRT, a C1q humano puro (Figura 12). Se enfrentaron distintas concentraciones de TcS a una concentración fija de C1q, previamente estandarizada. Las distintas curvas obtenidas, demuestran, una vez más, que la unión de TcS a C1q es estrictamente concentración dependiente, específica y saturable, como ya se ha descrito en nuestro laboratorio (Ferreira *et al.*, 2004a). Basados en estos resultados, elegimos una concentración sub-óptima de TcS para realizar los siguientes experimentos de inhibición de modulación de esta unión, por los fragmentos inmunoglobulínicos F(ab')₂ generados. Estos resultados se resumen en la Figura 13.

La Figura 13 reúne los resultados de una serie de experimentos realizados simultáneamente. En la ordenada se expresa el porcentaje de inhibición de la interacción de C1q con rTcCRT (Panel A) o con su dominio funcional TcS (Panel B). Las concentraciones de C1q, rTcCRT y TcS son invariantes. En la abscisa se indica tres concentraciones de fragmentos F(ab')₂, válidas para los resultados mostrados en ambos paneles. Cada set de tres barras señala, de izquierda a derecha, el efecto inmunomodulador de fragmentos F(ab')₂ anti-rTcCRT, anti-TcS o anti- CFA. La Figura 1, indica, esquemáticamente el diseño de este experimento. En síntesis, estos resultados muestran que fragmentos F(ab')₂, tanto anti-rTcCRT como anti-TcS, inhiben la interacción entre C1q y la molécula parasitaria completa o su dominio funcional, en aproximadamente un 70%, cuando la concentración de los fragmentos es de sólo 5 µg/ml.

Resultados recientes, generados en nuestro laboratorio, señalan que TcS juega un importante papel en la interacción con las colas colagenosas de C1q

(Ferreira *et al.*, 2004a). Los epimastigotes, no infectantes, obtenidos de cultivos axénicos, son altamente susceptibles a la acción de la ruta clásica del complemento. Curiosamente, si bien TcCRT está presente en las superficies de epimastigotes y tripomastigotes (resistentes al complemento), en los primeros el dominio S no es detectado por anticuerpos lapinos específicos. Quizás en esta forma parasitaria no infectante TcCRT no puede interactuar con C1q, derivando de esto su incapacidad de controlar el sistema del complemento (Ferreira, 2004).

Finalmente, en mamíferos superiores (*Homo sapiens*, incluido), la concentración sérica total de IgGs (policlonales y poliespecíficas) es de aproximadamente 12.000 µg/ml. Por ello, el hecho que una concentración de 5 µg/ml de una Ig lapina (también policlonal y poliespecífica), reduzca la interacción de C1q con rTcCRT o TcS, indica que los reactivos inmunoglobulínicos generados son altamente eficientes. Resta definir si los estudios *in vitro* mostrados en esta Memoria de Título representan un correlato válido de situaciones *in vivo*, generadas en hospederos inmunizados con las proteínas parasitarias.

VIII. CONCLUSIONES

1. El dominio S de calreticulina de *T. cruzi* (TcS) es inmunogénica en conejos, generando anticuerpos policlonales específicos que se presentan en alto título y que reconocen a la molécula nativa.
2. Estos anticuerpos generados fueron purificados, obteniéndose IgG activas y con una pureza superior al 90%. Estas inmunoglobulinas se sometieron a digestión enzimática, obteniéndose fragmentos F(ab')₂ biológicamente activos .
3. rTcCRT se une a C1q del sistema del complemento humano en forma concentración dependiente, específica y saturable. Los fragmentos F(ab')₂ tienen la capacidad de modular esta interacción, inhibiendo parcialmente la unión de C1q a rTcCRT o TcS.

BIBLIOGRAFIA

AGUILAR, L. 2003. Purificación por inmunoafinidad, de calreticulina nativa de *Trypanosoma cruzi*. Memoria para optar al Título Profesional de Médico Veterinario. Santiago, Chile. Universidad de Chile, Fac. de Cs. Veterinarias y Pecuarias. 53 pp.

AGUILLON, C.J.; RAMOS, R.; CHABALGOITY, A.; NIETO, A.; MORELLO, A.; REPETTO, Y.; FERREIRA, A. 1991. Tc45, un antígeno inmunogenéticamente definido de *Trypanosoma cruzi*: Estrategias cromatográficas para su purificación. Parasitol. al Día 15: 79-86.

AGUILLON, J.C.; BUSTOS, C.; VALLEJOS, P.; HERMOSILLA, T.; MORELLO, A.; REPETTO, Y.; HELLMAN, U.; ORN, A.; FERREIRA, A. 1995. Purification and preliminary sequencing of Tc45, an immunodominant *Trypanosoma cruzi* antigen: absence of homology with cruzapain, cruzain, and a 46- Kilodalton protein. Am. J. Trop. Med. Hyg. 53(2): 211-215.

AGUILLON, J.C.; HARRIS, R.; MOLINA, M.C.; COLOMBO, A.; CORTES, C.; HERMOSILLA, T.; CARREÑO, P.; ORN, A.; FERREIRA, A. 1997. Recognition of an immunogenetically selected *Trypanosoma cruzi* antigen by seropositive chagasic human sera. Acta Trop. 63: 159–166.

AGUILLON, J.C.; FERREIRA, L.; PEREZ, C.; COLOMBO, A.; MOLINA, M.C.; WALLACE, A.; SOLARI, A.; CARVALLO, P.; GALINDO, M.; GALANTI, N.; ORN, A.; BILLETTA, R.; FERREIRA, A. 2000. Tc45, a dimorphic *Trypanosoma cruzi* immunogen with variable chromosomal localization, is calreticulín. Am. J. Trop. Med. Hyg. 63(5, 6): 306–312.

APT, W.; REYES, H. 1990. Algunos aspectos de la enfermedad de Chagas en Latinoamérica. Parasitol. al Día. 14: 23-40.

ATIAS, A. 1998. Enfermedad de Chagas In: Parasitología Médica. Publicaciones Técnicas Mediterráneo. Santiago, Chile. pp. 251-264.

BITTENCOURT, A. L. 1976. Congenital Chagas' disease. Am. J. Dis. Chil. 130: 97-97.

BJÖRCK, L.; KRONVALL, G. 1987. Purification and some properties of streptococcal protein G, a novel IgG-binding reagent. J. Immunol. 133: 969-974.

BRADFORD, M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem. 72: 248-254.

CALDERON, O. 2001. *Trypanosoma cruzi*: un parásito del que queda mucho por conocer. Rev. Col. de MQC de Costa Rica. 8(2): 1-5.

CANALS, M.; EHRENFELD, M.; SOLIS, R.; CRUZAT, L.; PINOCHET, A.; TAPIA, C.; CATTAN, P. 1998. Biología comparada de *Mepraia spinolai* en condiciones de laboratorio y terreno: cinco años de estudio. Parasitol. al Día 22: 72-78.

CANALS, M.; CRUZAT, L.; MOLINA, M. C.; FERREIRA, A.; CATTAN, P. 2001. Blood Host Source of *Mepraia spinolai* (Heteroptera: Reduviidae), Wild Vector of Chagas Disease in Chile. J. Med. Entomol. 38 (2): 303-307.

CHILE. MINISTERIO DE SALUD. DIVISION DE LAS PERSONAS. DEPARTAMENTO DE EPIDEMIOLOGIA. 2000. Normas técnicas de vigilancia de enfermedades transmisibles; Enfermedad de Chagas. Santiago, Chile. MINSAL. 144p.

COLIGAN, J. E. 1991. Purification and Fragmentation of antibodies. **In:** Current Protocols in Immunology. Ed. John Wiley & Sons Inc. New York, USA. 1: 2.7.1-2.8.10.

ENGVAL, E.; PERLMAN, P. 1971. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Quantitative assay of immunoglobulin. Immunochemistry 8(9): 871-874.

FERREIRA, V.; MOLINA, M.C.; VALCK, C.; ROJAS, A.; FERREIRA, A. 2002. Parasite calreticulin: Possible role in the parasite/host interface?. Inmunología. 21(3): 156-168.

FERREIRA, V.; SCHARFSTEIN, J. 2002. Sistema del Complemento. **In:** Fundamentos de Inmunología Básica y Clínica. E. Universidad de Talca. Santiago, Chile. pp. 327-363.

FERREIRA, V. 2004. Calreticulina de *Trypanosoma cruzi* y el sistema del complemento humano: Regulación de la relación hospedero/parásito. Tesis para optar al grado de Doctor en Ciencias Biomédicas. Santiago, Chile. Universidad de Chile, Fac. de Medicina. 132pp.

FERREIRA, V.; VALCK, C.; SANCHEZ, G., GINGRAS, A.; TZIMA, S.; MOLINA, M.C.; SCHWAEBLE, W.; FERREIRA, A. 2004(a). Activation of the human complement system is specifically inhibited by calreticulin from *T. cruzi*. J. Immunol. 172 : 3042-3050.

FERREIRA, V.; MOLINA M. C.; VALCK, C.; ROJAS, A.; AGUILAR, L.; RAMIREZ, G.; SCHWAEBLE, W.; FERREIRA, A. 2004(b). Role of calreticulin from parasites in its interaction with vertebrate host. Mol. Immunol. 40: 1279-1291.

FERREIRA, V.; MOLINA, M.C.; SCHWAEBLE, W.; LEMUS, D., FERREIRA, A. 2004(c). *Trypanosoma cruzi* Calreticulin in the Parasite / Host Relationship: Modulation of the Complement System and Angiogenic. Trends Parasitol. En prensa.

FLIEGEL, L., BURNS, K., MACLENNAN, D. H., REITHMEIER, R. A. AND MICHALAK, M. 1989. Molecular cloning of the high affinity calcium-binding protein (calreticulin) of skeletal muscle sarcoplasmic reticulum. J. Biol. Chem. 264(36): 21522-21528.

HARLOW, E. LANE, D. 1988. Antibodies: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory. New York. 726pp.

IMBERT, J.L.; FIGUEROA, A.; GÓMEZ, J.V. 2003. Tripanosomiasis americana o mal de Chagas. Otra enfermedad de la pobreza. Elementos 10(49): 13-21.

JURI, M.A.; FERREIRA, A.; RAMOS, A.; HOECKER, G. 1990. Non-lytic antibodies in *H-2*-controlled resistance to acute infection with *T. cruzi*. Brazilian J. Med. Biol. Res. 23: 685-695.

KASPER, G.; BROWN, A.; EBERL, M.; VALLAR, L.; KIEFFER, N.; BERRY, C.; GIRDWOOD, K.; EGGLETON, P.; QUINNELL, R.; PRITCHARD, D. 2001 A calreticulin-like molecule from the human hookworm *Necator americanus* interacts with C1q and the cytoplasmic signalling domains of some integrins. Parasite. Immunol. 23: 141-152

KIRCHHOFF, L.V. 2003. Current public health concerns. **In:** American Trypanosomiasis. Kluwer Academic publishers. Massachusetts, USA. pp. 157-162.

KOVACS, H.; CAMPBELL, I.; STRONG, P.; JOHNSON, S.; WARD, F.; REID, K.; EGGLETON, P. 1998. Evidence That C1q Binds Specifically to CH2-like Immunoglobulin γ Motifs Present in the Autoantigen Calreticulin and Interferes with Complement Activation. Biochemistry. 37: 17865-17874.

KRAUTZ, G.; KISSINGER, J.; KRETTLI, A. 2000. The target of the lytic antibodies response against *Trypanosoma cruzi*. Parasitol. Today. 16: 31-34.

LABRIOLA, C.; CAZZULO, J.J.; PARODI, A.J. 1999. *Trypanosoma cruzi* Calreticulin is a lectin that binds monoglucosylated oligosaccharides but not protein moieties of glycoproteins. Mol. Biol. Cell. 10: 1381-1394.

LAEMMLI, E.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of head bacteriophage T4. Nature 227: 680-685.

MALHOTRA, R. ; THIEL, S. ; REID, K. B. M. ; SIM, R. B. 1990. Human Leukocyte C1q Receptor Binds Other Soluble Proteins with Collagen Domains. *J. Exp. Med.* 172 : 955-959.

MARCELAIN, K. ; COLOMBO, A. ; MOLINA, M.C. ; FERREIRA, L. ; LORCA, M. ; AGUILLÓN, J.C. ; FERREIRA, A. 2000. Development of an immunoenzymatic assay for the detection of human antibodies against *Trypanosoma cruzi* calreticulin, an immunodominant antigen. *Acta Trop.* 75 : 291-300.

MICHALAK, M.; CORBETT, E.F.; MESAELI, N.; NAKAMURA, K.; OPAS, M. 1999. Calreticulin: one protein, one gene, many functions. *Biochem.J.* 344: 281-292.

MOLINA, M.C.; FERREIRA, V.; VALCK, C.; RAMIREZ, G.; AGUILAR, L.; ROJAS, A.; BILLETTA, R.; LEMUS, D.; FERREIRA, A. 2004. Is *Trypanosoma cruzi* an Antiangiogenic Molecule?. *Mol. Biochem. Parasitol.* En prensa.

MORGAN, B. L.; HARRIS, C. L. 1999. The complement system: a brief overview. **In:** Complement regulatory protein. Harcourt Brace & Company, Publishers. San Diego, USA. pp. 1-31.

NAKHASI, H.L.; POGUE, G.P.; DUNCAN, R.C.; JOSHI, M.; ATREYA, C.D.; LEE, N.S.; DWYER, D.M. 1998. Implications of Calreticulin function in parasite biology. *Parasitol. Today.* 14 (4): 157-160.

NORRIS, K.; GALVAO, L.; SCHRIMPF J.; CANCEADO, J.; KRETTLI, A. 1994. Humoral immune response to the *Trypanosoma cruzi* complement regulatory protein as an indicator of parasitologic clearance in human Chagas' disease. *Infect. Immun.* 62(9): 4072-4074.

NORRIS, K.; SCHRIMPF, J.; SZABO, M. 1997. Identification of the gene family encoding the 160-kilodalton *Trypanosoma cruzi* complement regulatory protein. *Infect. Immun.* 65(2): 349-357.

OGDEN, C.; DE CATHELINEAU, A.; HOFFMANN, P.; BRATTON, D.; GHEBREHIWET, B.; FADOK, V.; HENSON, P. 2001. C1q and Mannose Binding Lectin Engagement of Cell Surface Calreticulin and CD91 Initiates Macropinocytosis and Uptake of Apoptotic Cells. *J. Exp. Med.* 194 (6): 781-795.

OLEA, A. 1998. Enfermedad de Chagas en Chile: Situación Epidemiológica de la Enfermedad de Chagas en Chile. [en línea] [citado 06 de agosto 2003]. World Wide Web: <http://epi.minsal.cl/epi/html/frames/frame4.htm>.28-28

OSTWALD, T. J.; MACLENNAN, D. H. 1974. Isolation of a high affinity calcium-binding protein from sarcoplasmic reticulum. *J. Biol. Chem.* 249(3): 974-979.

RAMOS, R.; JURI, M. A.; RAMOS, A.; HOECKER, G.; FERREIRA, A. 1998. An immunodominant and immunogenetically defined polypeptide present in *T. cruzi*. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz. 83 (1): 418.

RAMOS, R.; JURI, M.A.; RAMOS, A.; HOECKER, G.; LAVANDERO, S.; PENA, P.; MORELLO, A.; REPETTO, Y.; AGUILLÓN, J.C.; FERREIRA, A. 1991. An immunogenetically defined and immunodominant *Trypanosoma cruzi* antigen. Am. J. Trop. Med. Hyg. 44: 314-322.

ROITT, I.; BROSTOFF, J.; MALE, D. 2000. El complemento. In: Inmunología. 5ª ed. Harcourt. Madrid, España. pp. 43-59.

ROMANHA, A.J.; ALES, R.O.; MURTUA, S.M.F.; SILVA, J.S.; ROPERT, C.; GAZZINELLI, R.T. 2002. Experimental chemotherapy against *Trypanosoma cruzi* infection: essential role of endogenous interferon- γ in mediating parasitologic cure. J. Infect. Dis. 186: 823-828.

SCHENKMAN, S.; GUTHER, M. L.; YOSHIDA, N. 1986. Mechanism of resistance to lysis by the alternative complement pathway in *Trypanosoma cruzi* trypomastigotes: effect of specific monoclonal antibody. J. Immunol. 137(5): 1623-1628.

SCHULZ, G. E.; SCHIRMER, R. H. 1979. Protein-Ligand Interaction. In: Principles of Protein Structure. Springer-Verlag New York Inc. New York, USA. 228-230.

SMITH, M. J.; KOCH, G. L. 1989. Multiple zones in the sequence of calreticulin (CRP55, calregulin, HACBP), a major calcium binding ER/SR protein. EMBO J. 8(12): 3581-3586.

STUART, G.; LYNCH, N.; DAY, A.; SCHWAEBLE, W.; SIM, R. 1997. The C1q and collectin binding site within C1q receptor (cell surface calreticulin). Immunopharmacology. 38: 73-80.

SZARFMAN, A.; YANOVSKY, J. F.; TRAVERSO, M. 1968. First case of congenital Chagas' disease diagnosed in the Municipal Children's Hospital of Buenos Aires city. Arch. Argent. Pediatr. 66: 164.

TOWBIN, H.; STAEBELIN, T.; GORDON, J. 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheet: Procedure and some applications. Proc. Natl. Acad. Sci. 76: 4350-4354.

URBINA, J.; DOCAMPO, R. 2003. Specific chemotherapy of Chagas disease: controversies and advances. Trends Parasitol. 19(11): 495-501.

ZWIRNER, N. W. 1996. ELISA. In: Inmunología e Inmunoquímica Fundamentos. E. Médica Panamericana. Buenos Aires, Argentina. pp. 798-820.