



UNIVERSIDAD DE CHILE

FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS
ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS

DETECCIÓN DE CALRETICULINA EN SALIVA DE CANINOS DOMÉSTICOS (*Canis lupus familiaris*) MEDIANTE CRITERIOS ANTIGÉNICOS Y FUNCIONALES

MARÍA FRANCISCA CODDOU SOTO

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

PROFESOR GUÍA: DR. ARTURO FERREIRA VIGOUROUX

SANTIAGO, CHILE
2011



UNIVERSIDAD DE CHILE

FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS
ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS

DETECCIÓN DE CALRETICULINA EN SALIVA DE CANINOS DOMÉSTICOS (*Canis lupus familiaris*) MEDIANTE CRITERIOS ANTIGÉNICOS Y FUNCIONALES

MARÍA FRANCISCA CODDOU SOTO

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

NOTA FINAL:

		NOTA	FIRMA
PROFESOR GUÍA:	ARTURO FERREIRA
PROFESOR CONSEJERO:	FERNANDO FREDES
PROFESOR CONSEJERO:	CLAUDIO ZUÑIGA

SANTIAGO, CHILE
2011

ÍNDICE

ÍNDICE DE FIGURAS

ÍNDICE DE TABLAS

ABREVIATURAS

RESUMEN

ABSTRACT

INTRODUCCIÓN.....	1
1. Generalidades sobre saliva	2
1.1. Proteínas salivales	3
1.2. Propiedades cicatrizantes de la saliva	5
2. Calreticulina	6
2.1. Estructura de CRT	6
2.2. Localización subcelular de CRT	9
2.3. Funciones generales de CRT de diversas especies	9
2.4. Rol de Calreticulina en el remodelamiento tisular y en la cicatrización de heridas cutáneas	11
HIPÓTESIS.....	14
OBJETIVOS.....	15
GENERAL	15
ESPECÍFICOS.....	15
MATERIALES Y MÉTODOS	16
1. MATERIALES.....	16
1.1. Reactivos Biológicos	16
1.2. Reactivos comerciales	17
1.3. Equipos	18
2. MÉTODOS	19
2.1. Estandarización de un protocolo para la obtención de saliva de caninos domésticos.....	19
2.2. Determinación de calreticulina de <i>C. familiaris</i> (CfCRT) en saliva de caninos domésticos (SC), observando reactividad cruzada, mediante utilización de anticuerpos heterólogos (Criterio antigénico).....	20
a) Electroforesis (Laemmli, 1970)	20
b) Transferencia (Towbin et al., 1979)	21
2.3. Determinación de la unión de CfCRT presente en saliva canina a C1q, primer componente del sistema del complemento humano, en ensayo de electrotransferencia (Criterio funcional).	23
2.4. Determinación del efecto inhibitor de la ruta clásica del sistema del complemento por SC (Criterio funcional).	24

RESULTADOS	27
1) Estandarización de un protocolo para la obtención de saliva de <i>C. familiaris</i>	27
2) Determinación de calreticulina de <i>C. familiaris</i> (CfCRT) en saliva de caninos domésticos (SC), utilizando criterios antigénicos.....	28
2.1) Reconocimiento de CfCRT presente en SC con AcMo y AcPo anti-MuCRT.....	28
2.2) Reconocimiento de CfCRT presente en SC con AcPo anti-TcCRT. Criterio antigénico.....	34
2.3) Reconocimiento de CfCRT presente en SC con AcMo y AcPo anti-HuCRT.....	36
3) Determinación de la unión de CfCRT presente en saliva canina a C1q, primer componente del sistema del complemento humano, en IWB (Criterio funcional).	40
4) Determinación del efecto inhibitor de la ruta clásica del sistema del complemento por saliva canina (Criterio funcional).	42
DISCUSIÓN.....	44
CONCLUSIONES	48
BIBLIOGRAFÍA.....	49
ANEXOS	58

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Modelo de la estructura de CRT.....	8
Figura 2: CRT ejerce diversos efectos biológicos, en un ambiente extracelular, no tumoral, sobre queratinocitos, fibroblastos, monocitos y macrófagos humanos <i>in vitro</i>	12
Figura 3: Esquema representativo del ensayo de activación e inhibición de la ruta clásica del sistema del complemento.....	25
Figura 4: Los filtros utilizados en la toma de muestras salivales no contienen antígenos reconocibles por anticuerpos anti CRT en SDS-PAGE o en IWB.....	27
Figura 5: Patrón proteico electroforético de saliva canina en SDS-PAGE teñido con Azul de Coomassie....	28
Figura 6: Reconocimiento de CfCRT en IWB mediante anticuerpo monoclonal anti MuCRT.....	29
Figura 7: Curva de referencia para la estimación del PM aparente de CfCRT putativa	30
Figura 8: Alineamiento de las secuencias aminoacídicas de la molécula precursora de CfCRT y MuCRT...31	
Figura 9: CfCRT putativa, HuCRT, ambas de saliva y HuCRT de extracto de células humanas HEK-293, tienen pesos moleculares relativos similares entre sí, e inferiores al de rHuCRT.	32
Figura 10. CfCRT es reconocida por un AcPo anti CRT murina (MuCRT).. ..	33
Figura 11: CRT es reconocido en SC y SH por AcPo anti-TcCRT	34
Figura 12: Alineamiento de la secuencia aminoacídica de la molécula precursora de CfCRT y de TcCRT. .35	
Figura 13: Reconocimiento de CfCRT en IWB mediante anticuerpo monoclonal anti-HuCRT.. ..	36
Figura 14: CRT es reconocida en SC y SH con AcPo de conejo anti HuCRT.....	37
Figura 15: Existe un 96% de identidad en las secuencias aminoacídicas de la molécula precursora de CfCRT y HuCRT.....	38
Figura 16: Patrón electroforético de C1q, en condiciones reductoras.	40
Figura 17: CfCRT, al igual que rHuCRT y rTcCRT, se une a las cadenas de C1q en IWB.	41
Figura 18: Titulación de la activación de C4 humano sérico por C1 unido a una fase sólida.	42
Figura 19: Inhibición de la ruta clásica del sistema del complemento mediada por SC.....	43
Figura 20: Activación de la vía clásica, vía de las lectinas y vía alterna del sistema del complemento.....	60

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla I: Componentes de la saliva y sus funciones (Llena-Puy, 2006).	3
Tabla II: Reactivos comerciales y sus respectivas empresas fabricantes.....	17
Tabla III: Equipos utilizados.....	18
Tabla IV: Determinación del peso molecular relativo de CfCRT putativa, mediante SDS-PAGE.....	29
Tabla V: Identidad comparativa entre las secuencias aminoacídicas de la molécula precursora de CfCRT con las de HuCRT, TcCRT y MuCRT	39
Tabla VI: Resultados análisis de varianza del ensayo de inhibición de la ruta clásica del sistema del complemento	61

ABREVIATURAS

aa	Aminoácidos
ABTS	2-2'-azino-bis-(3-etilbenztiazolina-6-ácido sulfónico)
Ac	Anticuerpo
BCIP	5-bromo-4-cloro-3-indolilfosfato
BSA	Albúmina sérica bovina
CfCRT	Calreticulina Canina (<i>Canis familiaris</i>)
CRT	Calreticulina
Cys	Cisteína
DO	Densidad óptica
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
EGF	Factor de crecimiento epidérmico
ELISA	Ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas
FGF	Factor de crecimiento fibroblástico
g	Fuerza de gravedad
HEK-293	Células embrionarias humanas de riñón
HuCRT	Calreticulina humana
IWB	Inmunowestern blot
kDa	Kilo Daltons
LIAM	Laboratorio de Inmunología de la Agresión Microbiana
M	Molar
MBL	Lectina de unión a Manosa
MEC	Matriz extracelular
MuCRT	Calreticulina murina
MMP-2, MMP-9, MTI-MMP	Metaloproteinasas
NBT	Azul nitrotetrazolio
NK	Célula natural killer
PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida
PBS	Buffer fosfato salino
PM	Peso molecular
PSA	Persulfato de amonio
RAW 264.7	Línea celular de macrófagos murinos
RE	Retículo endoplásmico
rpm	Revoluciones por minuto
rHuCRT / rTcCRT	Calreticulina humana recombinante/ <i>Trypanosoma cruzi</i> recombinante
SC	Saliva canina
SDS	Dodecil sulfato de sodio
SH	Saliva humana
SNH	Suero normal humano
TcCRT	Calreticulina de <i>Trypanosoma cruzi</i>
TEMED	N,N,N',N'-tetrametiletildiamina

RESUMEN

Calreticulina (CRT) es una proteína filogenéticamente conservada y extremadamente pleiotrópica que, a pesar de residir en el retículo endoplásmico (RE), también se traslada al ambiente extracelular donde media efectos notables sobre los índices de aceleración y calidad de reparación tisular. Específicamente, CRT recluta la mayoría de las células involucradas en la cicatrización, estimula marcadamente la proliferación celular e incrementa la producción de proteínas extracelulares de la matriz, tales como colágeno y fibronectina, componentes indispensables en el proceso de remodelación de la herida.

Por otra parte, CRT ha sido detectada en saliva de humanos y de algunos géneros de artrópodos, como garrapatas y pulgas. Aunque el gen de calreticulina canina ha sido secuenciado, la proteína derivada no ha sido expresada, ni definida su presencia en saliva canina. El que CRT sea altamente conservada en cuanto a su estructura y funciones, permite proponer que también se encuentra en saliva de cánidos, en particular la especie doméstica (*Canis lupus familiaris*). Así, en caninos, el hecho conductual de lamer sus heridas podría generar un efecto pro cicatrizante, atribuible al menos en parte, a CRT. Por ello, se buscó CRT en saliva canina utilizando criterios antigénicos y funcionales.

El criterio antigénico utilizó un ensayo de electrotransferencia, donde anticuerpos policlonales dirigidos contra CRT humana (HuCRT), murina (MuCRT) y de *Trypanosoma cruzi* (TcCRT), junto con anticuerpos heterólogos monoclonales contra HuCRT y MuCRT, reconocieron una proteína de peso molecular aparente de 55 kDa. Entonces, derivado de su reconocimiento por cuatro anticuerpos, generados contra CRT de dos especies mamíferas y de una protozoaria, esta banda corresponde antigénicamente a CRT canina (CfCRT), molécula chaperona presente en la saliva de esta especie.

Los criterios funcionales se basan en que se ha descrito que TcCRT se une a C1 y C1q del sistema del complemento humano, brazo efector fundamental de la inmunidad adaptativa e innata, inhibiendo la ruta clásica de activación. Así, en saliva canina existe al menos un factor que se une a C1, en un ensayo de electrotransferencia de esta molécula, seguido de incubación con saliva canina y posterior visualización con anticuerpos anti CRT. Un segundo criterio funcional consideró que, dado que CRT de diversas especies interactúa con C1 del complemento, inactivando su ruta clásica, entonces CRT, en saliva canina, además de interactuar con C1 debiera inhibir la ruta clásica del sistema del complemento humano. Por ello, en un ELISA, donde la fase sólida se sensibilizó con C1 y luego se incubó con diluciones de saliva canina, se propone que la unión de CfCRT a C1, es responsable, al menos en parte, de la menor generación de C4b, lo que es indicativo de una interferencia de la molécula canina con la función de las serino proteasas asociadas al primer componente, en una situación similar previamente demostrada para TcCRT y confirmada para HuCRT.

ABSTRACT

Calreticulin (CRT) is a phylogenetically conserved and extremely pleiotropic protein that, despite its residence in the endoplasmic reticulum (ER), also translocates to the extracellular environment where it mediates remarkable effects on the rate of acceleration and quality of tissue repair. Specifically, CRT recruits most of the cells involved in wound healing, stimulates cell proliferation and markedly increases production of extracellular matrix proteins, such as collagen and fibronectin, all essential components in the process of wound remodelling.

On the other hand, CRT has been detected in human saliva and some arthropods, like ticks and fleas. Although the canine calreticulin gene has been sequenced, the protein has not been expressed, nor defined its presence in canine saliva. Because, CRT is highly conserved in their structure and functions, it is proposed that it is also present in canine saliva, particularly the domestic species (*Canis lupus familiaris*). Thus, in dogs, the behavioural fact of licking their wounds could generate a pro-healing effect attributable, at least in part, to CRT. For this reason, it is important to search for CRT in canine saliva using antigenic and functional criteria.

The antigenic criterion used was the utilization of a Western blot, where polyclonal antibodies directed against human CRT (HuCRT), murine CRT (MuCRT) and *Trypanosoma cruzi* CRT (TcCRT), recognized specifically a protein with an apparent molecular weight of 55 kDa. Then, derived from its recognition of four antibodies generated against CRT from two mammalian species and a protozoan, this band corresponds antigenically to canine CRT (CfCRT), chaperone molecule of this species present in saliva.

The functional criteria are based on studies that demonstrate that TcCRT binds C1 and C1q of the human complement system, a central effector arm of innate and adaptive immunity, inhibiting the classical pathway of activation. Thus, in canine saliva there is at least one factor that binds to C1, in a Western blot assay of this molecule, followed by incubation with canine saliva and subsequent visualization with antibodies against CRT. A second functional criterion, considers that CRT from numerous species interacts with C1 from complement, thus inactivating the classical pathway. Then CRT in canine saliva should also interact with C1, with inhibitory consequences on the classical pathway of the human complement system. Therefore, in an ELISA, where the solid phase was sensitized with C1, and then incubated with dilutions of canine saliva, it is proposed that the binding of CfCRT to C1, mediated a lower generation of C4b, which is indicative of an interference of the canine molecule with the function of the serine proteases associated with the first component, in a similar manner already demonstrated for TcCRT and confirmed for HuCRT.

INTRODUCCIÓN

Calreticulina (CRT) es una proteína filogenéticamente conservada y pleiotrópica, que reside en el retículo endoplásmico (RE). Aparte de su función captadora de calcio en el retículo, CRT participa en múltiples funciones, tales como: chaperona de tipo lectina, señalización y almacenamiento de calcio, regulación de la expresión génica, adhesión celular, autoantígeno, inhibición de angiogénesis y crecimiento tumoral, regulación de la actividad lítica de perforinas de células T y NK y la inhibición de la activación del sistema del complemento dependiente de C1, entre muchas otras.

Humanos, insectos, nemátodos, protozoos y plantas, son algunas de las especies de donde se han podido aislar moléculas homólogas estructurales y funcionales de CRT, verificándose una notable conservación de la secuencia aminoacídica, en particular de algunos dominios funcionales, y de la organización genómica a través de la evolución, lo cual guarda concordancia con sus funciones celulares vitales.

Es importante señalar que CRT media efectos importantes sobre el índice de aceleración y de calidad de reparación tisular. Específicamente, CRT recluta la mayoría de las células involucradas en la cicatrización, estimula marcadamente la proliferación celular e incrementa la producción de proteínas extracelulares de la matriz, tales como colágeno y fibronectina, componentes indispensables en el proceso de remodelación de la herida.

En saliva existen moléculas que favorecen la cicatrización en la cavidad bucal, tales como el factor de crecimiento epidérmico, el factor beta transformante de crecimiento y el factor de crecimiento fibroblástico, entre otros, pero poco se sabe de la presencia de CRT en saliva y menos aún del rol que cumpliría en este fluido biológico. Únicamente esta proteína ha sido detectada en saliva de humanos y de algunos géneros de artrópodos, como garrapatas y pulgas.

En el contexto de esta Memoria de Título, el que CRT sea altamente conservada en cuanto a su estructura y funciones, permite proponer que también se encuentra en saliva de cánidos, en particular la especie doméstica (*Canis lupus familiaris*). Así, en esta especie y en cánidos en general, el hecho conductual de lamer sus heridas podría generar un efecto pro cicatrizante, con ventajas adaptativas, atribuible al menos en parte, a CRT.

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

1. Generalidades sobre saliva

La saliva es una secreción compleja. El 93% de su volumen proviene de las glándulas salivales mayores: parótida, submandibular o submaxilar y sublingual. El 7% restante, se origina en las glándulas salivales menores, las cuales se encuentran dispersas principalmente en la mucosa oro faríngea y según su ubicación se clasifican en labiales, linguales, palatinas, sublinguales menores, bucales y glosopalatinas. Es estéril cuando sale de las glándulas salivales, pero deja de serlo inmediatamente cuando se mezcla con el fluido crevicular, restos de alimentos, microorganismos y células descamadas de la mucosa oral (Tenovuo, 1997).

La secreción diaria oscila entre 500 y 700 ml, con un volumen medio en la boca de 1,1 ml. Su producción está controlada por el sistema nervioso autónomo, en el núcleo salival superior en el puente encefálico y es estimulada por impresiones olfatorias, gustativas y mecánicas (Humphrey y Williamson, 2001). Factores como el dolor, ciertos medicamentos, enfermedades locales y sistémicas, así como la época del año pueden alterar la secreción (Bardow *et al.*, 2001). Los cambios y/o deficiencias nutricionales también alteran el flujo y composición salival. En reposo, la secreción oscila entre 0,25 y 0,35 ml/min y procede sobre todo de las glándulas submandibulares y sublinguales. Ante estímulos sensitivos, eléctricos o mecánicos, el volumen puede llegar hasta 1,5 ml/min. El mayor volumen salival se produce antes, durante y después de las comidas, alcanzando su punto máximo alrededor de las 12 del mediodía y disminuye de forma muy considerable por la noche, durante el sueño (Nauntofte, *et al.*, 2003).

Con respecto a la composición de la saliva, es importante mencionar que el 99% es agua mientras que el 1% restante está constituido por moléculas orgánicas e inorgánicas. Si bien la cantidad de saliva es importante, también lo es la calidad de la misma, ya que cada uno de sus componentes desempeña una serie de funciones específicas resumidas en la Tabla I.

Tabla I: Componentes de la saliva y sus funciones (Llena-Puy, 2006).

Componentes	Funciones
Mucina, glicoproteínas ricas en prolina, agua	Lubricación
Lisozima, lactoferrina, lactoperoxidas, mucinas, cistinas, histatinas, inmunoglobulinas, proteínas ricas en prolinas	Antimicrobiana
Mucinas, electrolitos, agua	Mantenimiento de la integridad de la mucosa
Agua	Limpieza
Bicarbonato, fosfato, calcio, proteínas aniónicas ricas en prolina, flúor	Capacidad tampón y remineralización
Agua, mucinas	Preparación de los alimentos para la deglución
Amilasa, lipasa, ribonucleasas, proteasas, agua, mucinas	Digestión
Agua, gustina	Sabor
Agua, mucinas	Fonación

El pH normal de la saliva varía entre 6 y 7 y está directamente relacionado con los niveles de dióxido de carbono en sangre y saliva (Humphrey *et al.*, 2001). La concentración de proteínas totales y el flujo salival están sujetos a cambios influenciados por los ritmos circadianos, factores hormonales y psicológicos (Grigoriev *et al.*, 2003) y el ejercicio habitual, ya que el flujo salival disminuye durante la ejercitación aeróbica (Chicharro *et.al.*, 1998). Los ritmos circadianos afectan no sólo la cantidad del flujo sino también la concentración de componentes como proteínas y electrolitos (Boonstra *et al.*, 1995).

En caninos, dada la función termorreguladora de la saliva, el volumen producido en situaciones de estrés por calor debiera ser relativamente mucho mayor al de humanos, aunque esto no ha sido estudiado con mayor detalle (Sharp *et al.*, 1969).

1.1. Proteínas salivales

La concentración proteica de la saliva es bastante estable, la saliva entera tiene un contenido de proteínas de alrededor de 0,5 a 3 mg/ml, siendo más significativa en la secreción parotídea. Sin embargo, en presencia de infecciones bucales, la concentración total de proteínas puede ser mayor (Banderas y González, 1994). Además de mantener la osmolaridad y capacidad tampón, las proteínas salivales también participan en diversas funciones específicas. El número aproximado de las distintas proteínas salivales es de 100 a 140 (Yao *et al.*, 2003), donde aproximadamente el 30-40% son producidas por las glándulas salivales, mientras que otras proteínas se originan a partir del suero, de la mucosa y/o las células inmunes, o de microorganismos (Wilmarth *et al.*, 2004).

Las proteínas más conocidas de origen glandular son la α -amilasa, glicoproteínas, cistatina, factor de crecimiento epidérmico (EGF), gustina, histatinas (HRPs), lactoferrina, lisozima, mucinas (MUC5B, MUC7), peroxidasa salival, proteínas ricas en prolina (PRP) y estaterina. Las proteínas más importantes provenientes del suero sanguíneo son: albúmina, α 1-antitripsina, factores de coagulación (VIII, IXa, XI) y miembros del sistema fibrinolítico (trazas del activador tisular del plasminógeno). Las proteínas más importantes que se originan desde células inmunes son: mieloperoxidasa, calprotectina, catepsina G, defensinas, elastasa, inmunoglobulinas (90-98% de IgA, 1-10% de IgG y en menor cantidad IgM, IgD e IgE). Por último, las principales proteínas de origen microbiano son: alfa-2 macroglobulina, cisteína peptidasas, DNasas, RNasas, calicreína, inhibidor secretorio de proteasa leucocitaria (SLPI), fibronectina, proteína chaperona molecular Hsp70 y un inhibidor estreptocócico (Tibor *et al.*, 2003).

En otras especies mamíferas es notorio el bajo número de publicaciones en cuanto a la composición bioquímica de la saliva. Las especies caninas no son una excepción a esto. Sin embargo, en saliva de otras especies, como por ejemplo desde garrapatas del género *Amblyomma americanum* y *Dermacentor*, se ha aislado una proteína chaperona llamada calreticulina (CRT) a la cual se le sugiere un rol en el proceso de alimentación del parásito a través de su capacidad inmunosupresora y antihemostática en el hospedero (Jaworski *et al.*, 1995).

Por otra parte, Bigler y Streckfus (2004), demostraron que la saliva humana contiene una variedad de proteínas, que mantienen entre sus funciones el ayudar en el proceso de digestión y de mantención de la salud de la cavidad bucal. Entre estas, se detectó calreticulina humana (HuCRT) en las muestras de saliva.

En caninos domésticos, aunque el gen de CRT ha sido secuenciado (Michalak *et al.*, 1991), la proteína derivada no ha sido expresada, ni definida su presencia en saliva.

1.2. Propiedades cicatrizantes de la saliva

Además de la prevención de infecciones de las heridas a través del efecto antimicrobiano mencionado anteriormente, la saliva desempeña otras funciones con respecto a la cicatrización de heridas de la cavidad oral. El factor de crecimiento epidermal salival (EGF), es uno de los componentes de la saliva que estimula el proceso de cicatrización (Zelles *et al.*, 1995), y consiste en una cadena polipeptídica de 53 residuos aminoacídicos que contienen 3 puentes disulfuro intermoleculares (Ino *et al.*, 1993). Su función es inducir una serie de respuestas biológicas que son mediadas por su unión específica a un receptor tirosina-kinasa de EGF, en la superficie celular (Boonstra *et al.*, 1995).

El EGF promueve la proliferación celular, regula la diferenciación, modula la organogénesis, promueve la angiogénesis y acelera la cicatrización de las heridas; actúa como un inhibidor de la secreción de ácido gástrico, estimula la proliferación de células embrionarias e incrementa la liberación de calcio del hueso. También promueve la reabsorción ósea y es un potente agente quimiotáctico para fibroblastos y células epiteliales (Carpenter y Cohen, 1990). El EGF se sintetiza inicialmente como una proteína precursora de 160-170 kDa. La forma madura y soluble de EGF es una proteína de 6,4 kDa que es detectable en muchos tejidos y prácticamente todos los fluidos humanos, por ejemplo: orina, jugos gástricos, fluido seminal, líquido amniótico y leche materna (Boonstra *et al.*, 1995).

La síntesis del EGF en saliva se realiza en las células de los conductos excretores de las glándulas salivales mayores, principalmente en la parótida (Zelles *et al.*, 1995). En la saliva se encuentran EGF α y β que forman un dímero potencial, pero predomina la forma biológicamente activa β de bajo peso molecular (6,4 kDa). En la saliva, el EGF estimula el incremento en el grosor de la mucosa bucal y funciona como un péptido de vigilancia ubicando y promoviendo la reparación de las zonas de mucosa dañada. El EGF activa una cascada de señalización intracelular a través de su unión al receptor ErbB1 de EGF (Carpenter y Cohen, 1990).

Otros factores de crecimiento presentes en la saliva, tales como el transformante beta (TGF- β), fibroblástico (FGF), tipo insulina (IGF), y nervioso (NFG), también promueven la cicatrización (Kaufman *et al.*, 2002). Por otra parte, la saliva contiene varios factores de la coagulación sanguínea (IXa, VIII, XI) en un nivel comparable al del plasma, y la saliva puede sustituir a las plaquetas en la generación de trombina. Esta propiedad es muy importante en la cicatrización de heridas de la cavidad oral, porque a pesar de que en saliva se diluyan los factores sanguíneos de coagulación, ésta puede ser iniciada (Tibor *et al.*, 2003).

2. Calreticulina

Calreticulina, es la proteína ligadora de calcio más importante del retículo endoplásmico (RE) de células eucariotas. Ha sido implicada en la regulación de una gran variedad de funciones celulares; sin embargo, no son muy claros sus mecanismos de acción específicos así como tampoco el motivo de su extremada conservación durante la evolución, razón por la cual ha sido objeto de estudios en muchos laboratorios en el mundo (Gold *et al.*, 2010).

CRT vertebrada fue aislada por primera vez por Ostwald y MacLennan en 1974 (Ostwald y MacLennan, 1974), desde vesículas del retículo sarcoplásmico de células musculares. Años más tarde su gen fue clonado y expresado, gracias al trabajo de Smith y Koch (Smith y Koch, 1989) y Fliegel y colaboradores (Fliegel *et al.*, 1989). Originalmente, esta proteína de 46 kDa, fue identificada como una molécula ligante de calcio localizada principalmente en el RE (Nakhasi *et al.*, 1998).

Hasta la fecha, los genes que codifican CRT han sido aislados desde humanos, insectos, nemátodos, protozoos y plantas superiores, no así desde levaduras y procariontes. En mamíferos, la molécula está presente en todas las estirpes celulares, excepto glóbulos rojos (Michalak *et al.*, 1999).

Existe una conservación notable de la organización genómica y de la secuencia aminoacídica de CRT a través de la evolución, lo cual se presume estar en acuerdo con sus roles en funciones celulares fundamentales (Ferreira *et al.*, 2004a). HuCRT tiene un 50% de homología de secuencia aminoacídica con CRT de *Onchocerca volvulus*, *Shistosoma mansoni*, *Leishmania donovani* y *Trypanosoma cruzi*. Incluso, en algunas regiones de CRT (dominio S, que se une a las colas colagenosas de C1q) existe hasta un 80 % de identidad entre CRT de *T. cruzi* (TcCRT) y HuCRT (Ferreira *et al.*, 2002).

2.1. Estructura de CRT

Las características estructurales de consenso de CRT de diferentes especies, son los dominios N globular terminal; el P y el C terminal (**Fig. 1**) (Fliegel *et al.*, 1989, Michalak *et al.*, 1992 y Smith y Koch, 1989). Las secuencias aminoacídicas de los dominios P y N-terminal de CRT se conservan bien entre especies, sugiriendo papeles importantes en las funciones básicas de esta proteína. Las secuencias primarias de CRT, comienzan con un péptido de señal y terminan con la secuencia aminoacídica Lys, Asp,

Glu y Leu¹ (KDEL), que determina retención en el RE (Michalak *et al.*, 1999).

En HuCRT, el dominio N-terminal, de conformación globular altamente plegada, une Zn⁺² y tiene tres residuos de Cys², de los cuales dos están involucrados en la formación de un puente disulfuro que mantendría la estabilidad de la región (Matsuoka *et al.*, 1994). El dominio N-terminal, mantiene la función de inhibir la proliferación de células endoteliales y suprime la angiogénesis (Pike *et al.*, 1998). El dominio P de CRT comprende a una secuencia rica en prolina con tres repeticiones de la secuencia aminoacídica PXXIXDPDAXKPEDWDE (repetición A) seguida por tres repeticiones de la secuencia GXWXPPXIXNPXYX (repetición B). Esta región de CRT une Ca²⁺ con alta afinidad y baja capacidad, pudiendo ser las secuencias repetidas A y B importantes en esta función (Michalak *et al.*, 1999).

Por otra parte, las regiones repetidas A y B han mostrado ser importantes en la función chaperona de esta proteína (Vassilakos *et al.*, 1998). El dominio P de CRT tiene actividad tipo lectina similar a otras proteínas chaperonas (Bergeron *et al.*, 1994). El dominio C-terminal de CRT es altamente ácido y también mantiene la función de unir Ca²⁺, pero con baja afinidad y alta capacidad (Baksh y Michalak, 1991), propiedad que se mantiene entre las especies (Michalak *et al.*, 1992).

¹ Lisina, ácido aspártico, ácido glutámico y leucina.

² Cisteína

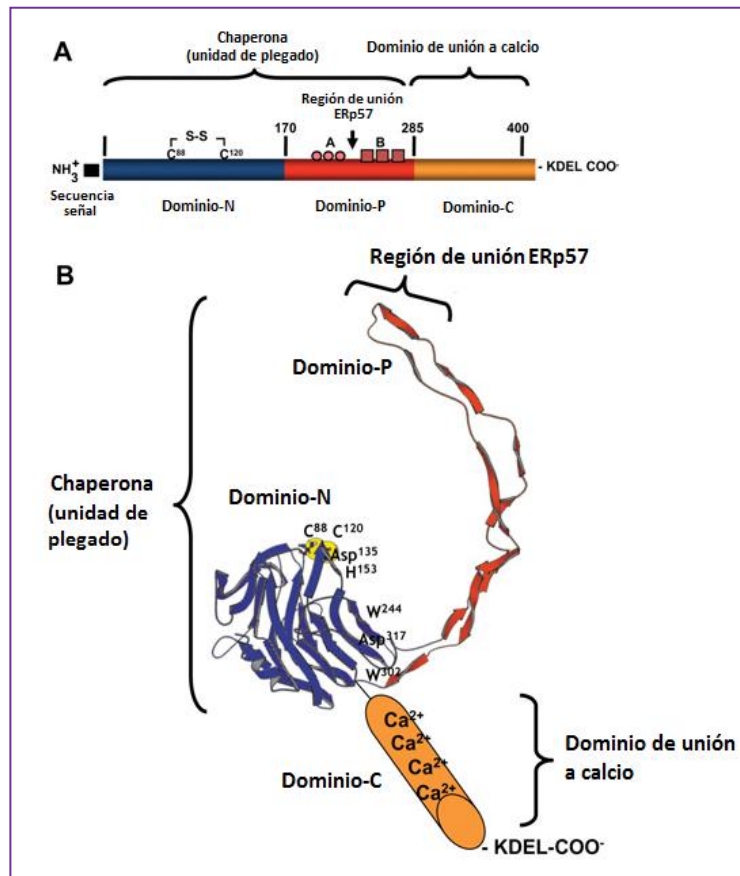


Figura 1: Modelo de la estructura de CRT. (A) Representación lineal de los dominios de CRT, con una secuencia señal aminoacídica N terminal (en negro), dominio N (en azul), dominio P (en rojo), dominio C (en naranja) y una señal de retención en el RE, KDEL C-terminal. Repeticiones A (PXXIXDPDAXKPEDWDE) y B (GXWXPPXIXNPXYX) son indicadas en círculos y cuadrados rosados, respectivamente. Los aminoácidos involucrados en el enlace disulfuro son indicados como S-S, y los números indican los residuos involucrados en la transición entre los diferentes dominios. (B) Modelo tridimensional de los dominios N y P. N globular (en azul) y P central, rico en prolina (en rojo), que forma un "loop" característico. N y P son responsables de la función chaperona. El dominio C terminal contiene aminoácidos cargados negativamente y participa en la unión de Ca²⁺ con alta capacidad. Las esferas amarillas representan los residuos de cisteína (Cys88 y Cys120), que forman un puente disulfuro. Adaptado desde Michalak *et al.*, 2009.

2.2. Localización subcelular de CRT

Aunque CRT presenta una señal de destinación al RE, también se encuentra en muchas localizaciones no relacionadas a RE, las que incluyen: gránulos citotóxicos de las células T (Andrin *et al.*, 1998), superficie celular (Arosa *et al.*, 1999), saliva de garrapatas (Jaworski *et al.*, 1996), saliva humana (Bigler *et al.*, 2004), núcleo (Burns *et al.*, 1994), citoplasma (Holaska *et al.*, 2001), acrosoma de espermios (Nakamura *et al.*, 1993), espacio extracelular de varios tipos celulares (Eggleton *et al.*, 1994) y podría ser incluso secretada a circulación sanguínea (Sueyoshi *et al.*, 1991). En *T. cruzi*, se la ubica prominentemente en la zona de emergencia flagelar, donde inactiva el sistema del complemento y promueve la infectividad parasitaria (Ferreira *et al.*, 2004b).

CRT también es secretada o liberada por muerte celular, mediando varias funciones. CRT se encuentra en la vía secretoria de células vegetales (Borisjuk *et al.*, 1998), células de melanoma B16 (Zhu *et al.*, 1997), hepatocitos de rata (Zuber *et al.*, 2000), células Vero (Day *et al.*, 2001) y *Necator americanus* (Kasper *et al.*, 2001). En *T. cruzi*, TcCRT exteriorizada por el parásito, no solo inactiva al complemento (Ferreira *et al.*, 2004b) y promueve infectividad parasitaria (Ramírez *et al.*, 2010), sino que también promueve autoinmunidad (Ribeiro *et al.*, 2009). Más aún, TcCRT posee una potente capacidad antiangiogénica, y por ende un efecto anti tumoral (López *et al.*, 2010).

Las localizaciones subcelulares son posibles gracias a una retrotranslocación de CRT desde el RE al citosol. CRT es primero insertada completamente en el RE, su señal de destinación es procesada por una peptidasa y posteriormente se retrotransloca al citosol en un proceso independiente de ubiquitinación o actividad del proteosoma (Afshar *et al.*, 2005).

2.3. Funciones generales de CRT de diversas especies

Dentro del lumen del RE, CRT junto con otras chaperonas residentes en él, participa en el plegamiento de proteínas y glicoproteínas. Principalmente a través de sus sitios de unión a lectinas, previene la agregación de proteínas, y participa en el control de calidad, a través de la identificación de proteínas mal plegadas para su destrucción mediante ubiquitinación. Además, regula el metabolismo del Ca^{2+} , el cual influye sobre una variedad de funciones celulares, incluyendo la señalización celular, particularmente a través de integrinas.

La ausencia de CRT es letal *in utero* (Mesaeli *et al.*, 1999). CRT adquiere esta importancia vital al desempeñar un papel crucial en la homeostasis celular. Así, ratones deficientes en CRT mueren durante el desarrollo embrionario, a los 14,5 – 16,5 días post fecundación, observándose en ellos, entre otras múltiples alteraciones, debilidad cardiaca, probablemente debida a las alteraciones del transporte de calcio en el RE (Guo *et al.*, 2002).

CRT se localiza principalmente en compartimentos intracelulares, pero también en la superficie celular, y en el ambiente extracelular, donde regula una variedad de diversos e importantes procesos biológicos (Gold *et al.*, 2010). Por ejemplo, CRT es necesaria en el procesamiento antigénico y en la respuesta inmune adaptativa (Obeid *et al.*, 2007; Tesniere *et al.*, 2008), en la captura por células dendríticas de células cancerígenas que la expresan (Tesniere *et al.*, 2008), en la fagocitosis de células apoptóticas (Gardai *et al.*, 2005), adhesión celular (Coppolino y Dedhar, 1999), migración (Orr *et al.*, 2003), proliferación celular, desensamblaje de la adhesión focalizada, mediada por trombospondina-1 (para la migración celular) (Goicoechea *et al.*, 2000), y en la resistencia a la anoikis o muerte celular inducida por pérdida de la adherencia celular (Pallero *et al.*, 2008).

Debido al rol de CRT en estas actividades biológicas, se ha convertido en un mediador crítico de los procesos fisiológicos y patológicos, tales como cicatrización de heridas, respuesta inmune, fibrosis y cáncer (Gold *et al.*, 2010).

Además, CRT de vertebrados se une a las regiones colagenosas de C1q y otros miembros de la familia de las colectinas, tales como “mannan binding lectin” (MBL), proteína A del surfactante pulmonar, conglutinina bovina y colectina 43 (Malhotra *et al.*, 1990). Así, CRT participa en la inhibición de C1 (q, r, s), con la consiguiente inhibición de la ruta clásica del complemento *in vitro*. Algunas de esas funciones podrían modular mecanismos inmunes efectores.

Por otro lado, un péptido de HuCRT (aminoácido 120-180), una molécula más larga llamada vasostatina (aminoácidos 1-180), así como CRT completa, son potentes inhibidores de la angiogénesis, tanto *in vitro* como *in vivo* (Pike *et al.*, 1998).

2.4. Rol de Calreticulina en el remodelamiento tisular y en la cicatrización de heridas cutáneas

El uso tópico experimental *in vitro* e *in vivo* de CRT, tiene efectos notables sobre el proceso de reparación de las heridas, pues actúa sobre el índice de aceleración y en la calidad de reparación tisular (Gold *et al.*, 2006). La mayoría de los agentes involucrados en la cicatrización afectan generalmente a no más de un componente de reparación, en cambio, CRT interviene en una variedad de aspectos relevantes (Gold *et al.*, 2006). Así, específicamente, CRT recluta la mayoría de las células implicadas en la reparación de heridas, estimula marcadamente la proliferación celular de queratinocitos, fibroblastos y células endoteliales vasculares, causando un aumento dosis-dependiente en la formación del tejido epitelial con una fuerte inducción de tejido de granulación (neodermis) producido por el mayor número de fibroblastos.

In vitro, la adición exógena de CRT a queratinocitos y fibroblastos es más eficiente para estimular sus proliferaciones, en comparación a los factores de crecimiento epidérmico (EGF) o fibroblástico (FGF), respectivamente (Nanney *et al.*, 2008). También aumenta profundamente la producción de proteínas extracelulares de la matriz, tales como colágeno y fibronectina, componentes críticos en el proceso de remodelación de la herida (Gold *et al.*, 2006). Por otra parte, CRT actúa como agente quimiotáctico de diapédesis de monocitos en el lecho de la herida, donde los monocitos se transforman en macrófagos tisulares y así participan en la fagocitosis de células apoptóticas, proceso obligatorio en la reparación de tejidos (Gardai *et al.*, 2005). Además CRT media la expresión de integrinas específicas, tales como $\alpha 5$ y $\beta 1$ integrinas, permitiendo así la migración celular en la herida. Ambas son cadenas de integrinas expresadas tempranamente en la cicatrización de heridas (Gailit y Clark, 1994; Singer y Clark, 1999), en queratinocitos y fibroblastos tratados *in vitro* (Gold *et al.*, 2010) (**Fig. 2**).

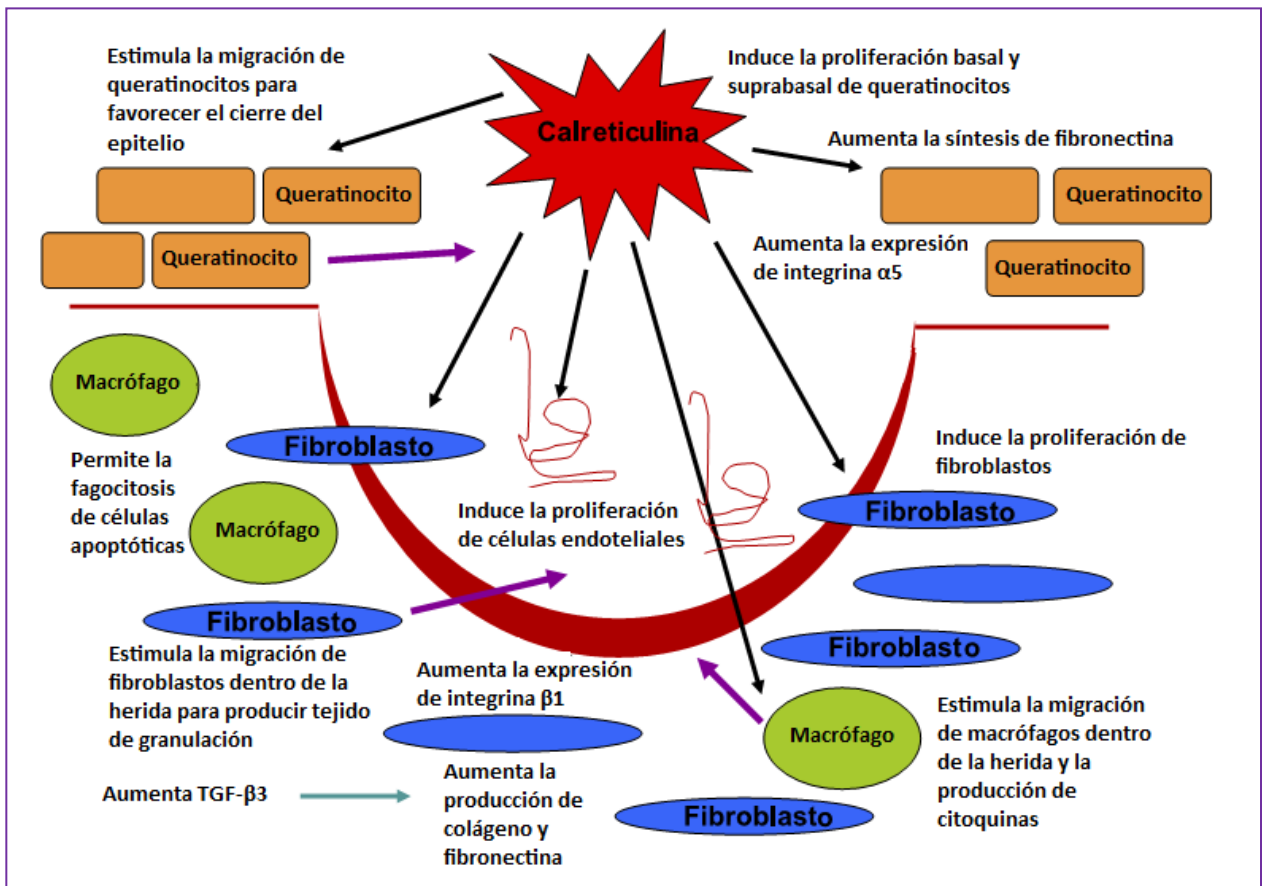


Figura 2: CRT ejerce diversos efectos biológicos, en un ambiente extracelular, no tumoral, sobre queratinocitos, fibroblastos, monocitos y macrófagos humanos *in vitro*, acorde con su rol *in vivo* en cicatrización de heridas. Modificado desde Gold *et al.*, 2010.

In vitro, en fibroblastos humanos de la dermis, CRT exógena induce un aumento dosis-dependiente de fibronectina, colágeno de tipo I, y TGF- $\beta 3$, proteínas relacionadas directamente con la abundante granulación en los tejidos (Gold *et al.*, 2010). CRT induce la isoforma $\beta 3$ de TGF, pero no la $\beta 1$ o $\beta 2$. Solo TGF- $\beta 3$ está implicada en la contracción de colágeno de la matriz, para estimular la contracción de la herida (Li *et al.*, 2006), aceleración de la reparación de heridas con disminución de cicatriz (Wu *et al.*, 1997; Ferguson *et al.*, 2009), motilidad celular (Schor *et al.*, 2006), y la inducción del ácido hialurónico, un importante componente de la formación neodermal (Ellis *et al.*, 1999). Además, TGF- $\beta 3$ es el componente controlador de la motilidad de las células epidérmicas y dérmicas durante la reparación (Bandyopadhyay *et al.*, 2006). Como TGF- β estimula síntesis de colágeno y fibronectina (Leonard *et al.*, 1991), CRT podría inducir a estas proteínas de la matriz de forma indirecta y directa. Por otra parte, CRT incrementa los niveles de MMP-2, MMP-9, y MTI-MMP (Wu *et al.*, 2007), metaloproteinasas importantes en la remodelación de la matriz extracelular durante las etapas finales de la cicatrización de heridas. Además, estudios preliminares *in vitro* indican que CRT podría estar

involucrada en la conversión de fibroblastos a miofibroblastos, células importantes en la contracción de la herida (Gold *et al.*, 2010).

El crecimiento de microcapilares dentro del tejido de granulación de la herida es esencial en la cicatrización. CRT estimula el crecimiento de nuevos vasos sanguíneos (Sezestakowska *et al.*, 2006) e induce la proliferación de células endoteliales microvasculares humanas, un aspecto importante de la angiogénesis (Nanney *et al.*, 2008). Sin embargo, en proteínas extracelulares, multifuncionales y con multidominios, la función de los dominios aislados puede diferir en comparación con la proteína intacta. De modo similar, HuCRT y sus fragmentos parecen tener funciones diferentes con respecto a la regulación de la angiogénesis. En este contexto, el dominio N-terminal de CRT (aa 1-80), o vasostatina, es antiangiogénico, en particular en modelos tumorales (Yao *et al.*, 2002a; Jazowiecka-Rakus *et al.*, 2007), porque se une a la laminina evitando la adhesión de células endoteliales a ella, en la membrana basal del capilar (Yao *et al.*, 2002b; Pike *et al.*, 1998).

Esto podría reflejar la regulación diferencial de la angiogénesis inducida por los tumores en comparación con la angiogénesis fisiológica en la cicatrización de heridas, o bien, la diferencia dosis dependiente, ya que las concentraciones empleadas en estudios de angiogénesis tumoral no alteran la cicatrización de heridas (Lange-Asschenfeldt *et al.*, 2001). También podría tomarse en consideración que las proteasas relacionadas con la herida puedan adherirse a CRT y así liberar el dominio N-terminal. Aún se deben dilucidar estas interrogantes en lo que respecta a efectos angiogénicos de CRT en el proceso de cicatrización de heridas (Gold *et al.*, 2010).

HIPÓTESIS

Basado en que CRT es una molécula altamente conservada en cuanto a estructura y funciones, que ha sido detectada en saliva de garrapatas del género *Amblyoma* y *Dermacentor*, así como en saliva humana, que en saliva existen componentes que favorecen la cicatrización de la cavidad bucal y, por último, que CRT favorece el proceso de cicatrización *in vivo* e *in vitro*, se propone que CRT en saliva podría representar una adaptación evolutiva para acelerar procesos de cicatrización. Esto podría tener una relevancia especial en cánidos, en los cuales existe el hábito de lamer las heridas, que se presentan con frecuencia en esta especie. Por lo tanto, la hipótesis de trabajo propuesta es la siguiente:

Calreticulina se encuentra en saliva de caninos domésticos (*Canis lupus familiaris*).

OBJETIVOS

GENERAL

Conocer nuevas localizaciones de calreticulina, no relacionadas al retículo endoplásmico, en vertebrados, caninos en particular, donde podría representar una importante adaptación evolutiva.

ESPECÍFICOS

- 1) Estandarizar un protocolo para la obtención de saliva de *C. lupus familiaris*.
- 2) Determinar la presencia de calreticulina de *C. lupus familiaris* (CfCRT) en saliva de caninos domésticos, mediante reactividad cruzada con anticuerpos heterólogos (Criterio Antigénico).
- 3) Determinar la unión de CfCRT presente en saliva de caninos domésticos a C1q, primer componente del sistema del complemento humano, y su posible efecto inhibitor de la ruta clásica (Criterio Funcional).

MATERIALES Y MÉTODOS

1. MATERIALES

1.1. Reactivos Biológicos

1.1.1. Células HEK 293 (Línea celular humana embrionaria de riñón): Donadas por el Laboratorio de Patología Autoinmune e Inflamatoria del Programa Disciplinario de Inmunología, Instituto de Ciencias Biomédicas, Facultad de Medicina de la Universidad de Chile.

1.1.2. Extracto de Células Raw 264.7 (Línea celular de macrófagos murinos): Generado en el Laboratorio de Inmunología de la Agresión Microbiana (LIAM), Programa Disciplinario de Inmunología, Instituto de Ciencias Biomédicas, Facultad de Medicina de la Universidad de Chile³.

1.1.3. HuCRT recombinante: Clonado por Dr. Alexandre Gingras, Departamento de Infecciones, Inmunidad e Inflamación, Universidad de Leicester, Inglaterra. Expresada y purificada en el LIAM (Ribeiro *et al.*, 2009).

1.1.4. Saliva canina (SC): Obtenida en el contexto de esta Memoria de Título, mediante protocolo que se describirá posteriormente (Objetivo Específico 1).

1.1.5. Saliva humana (SH): Recolectada a partir de voluntarios informados, sanos y de ambos sexos, todos ellos pertenecientes al LIAM.

1.1.6. Suero policlonal de conejo anti-HuCRT y suero pre-inmune: Obtenidos en el LIAM (Ribeiro *et al.*, 2009).

1.1.7. Sueros policlonales de conejo anti-TcCRT y suero pre-inmune: Obtenidos en el LIAM (Aguilar *et al.*, 2005).

1.1.8. TcCRT recombinante: El gen de TcCRT fue clonado, amplificado y expresado, en LIAM, usando metodología convencional (Aguillón *et al.*, 2000).

³ Tesis Doctoral, Andrea González.

1.2. Reactivos comerciales

Tabla II: Reactivos comerciales y sus respectivas empresas fabricantes.

Reactivo	Fabricante Proveedor
ABTS (2,2'-azino-bis-(3-etilbenziazolina-6- ácido sulfónico))	Sigma-Aldrich (USA)
Ácido acético	MERCK (Alemania)
Acrilamida	GE Healthcare (USA)
Albúmina sérica bovina (BSA)	US Biological (USA)
Anticuerpo de cabra anti-C4 humano purificado por afinidad	Calbiochem (USA)
Anticuerpo de cabra anti-Ig de conejo conjugado a fosfatasa alcalina	Sigma-Aldrich (USA)
Anticuerpo de cabra anti-Ig de ratón conjugado a fosfatasa alcalina	DAKO (USA)
Anticuerpo de conejo anti-C1q humano	DAKO (USA)
Anticuerpo de conejo anti-Ig de cabra conjugado a peroxidasa	Calbiochem (USA)
Anticuerpo monoclonal de ratón anti-HuCRT	Calbiochem (USA)
Anticuerpo monoclonal de ratón anti-MuCRT	BD Biosciences (USA)
Anticuerpo policlonal de conejo anti-MuCRT	Novus Biologicals (USA)
Azul de bromofenol	MERCK (Alemania)
Azul de Coomassie R250	Sigma-Aldrich (USA)
Barbital sódico ((5,5-dietilbarbiturato de sodio)	MERCK (Alemania)
NBT-BCIP (Nitro blue tetrazolium /5-bromo-4-cloro-indolilfosfato)	Sigma-Aldrich (USA)
Bis-acrilamida	GE Healthcare (USA)
C1q humano	Complement Technology (USA)
CaCl ₂	MERCK (Alemania)
Dodecil sulfato de sodio (SDS)	Sigma-Aldrich (USA)
EDTA	MERCK (Alemania)
Estándar de peso molecular pre-teñido color (amplio rango)	New England Biolabs (UK)
Estándar de peso molecular pre-teñido (amplio rango)	Winkler (Chile)
Glicerol	Winkler (Chile)
Glicina	Sigma-Aldrich (USA)
HCl	MERCK (Alemania)
Membrana de nitrocelulosa	GE Healthcare (USA)
Metanol	Sigma-Aldrich (USA)
MgCl ₂	MERCK (Alemania)
N,N,N',N'-tetrametiletilendiamina (TEMED)	BioRad (USA)
NaCl	MERCK (Alemania)
Persulfato de amonio (PSA)	BioRad (USA)
Placas de ELISA de 96 pocillos	Nunc (UK)
Tris base	Sigma-Aldrich (USA)
Tween 20	Winkler (Chile)
β2-mercaptoetanol	Sigma-Aldrich (USA)

1.3. Equipos

Tabla III: Equipos utilizados.

Equipo	Marca	Modelo
Agitador magnético	Thermolyne	Nuovo II SP 18420-26
Balanza Analítica	AG Gottingen	Sartorius CP224S
Baño termostático	Bioblock	Scientific
Cámara de electroforesis	Biorad	Mini- PROTEAN® Tetra System
Espectrofotómetro	Jenway	Genova N° 1795
Fuente de poder	Biorad	200/2.0 power supply
Incubadora de placas dinámica	Abbott	Modelo Commander N° IN554812
Lavador Microplacas 8 canales	Nunc	Immuno Wash 8
Lector de ELISA	Thermo scientific	Multiskan FC
Medidor de pH	Hanna instrument	211 Microprocessor pH Meter
Microcentrífuga	Sanyo	MSE Microcentaur
Refrigerador -20°C	Mademsa	Premium 382B
Refrigerador -80°C	Kendro Laboratory	Revco
Secador de geles speed gel	Savant	SG 210D
Shaker orbital	N-Biotek	NB 101-MT
Sonicador	Misonix	Microson TM XL2000
Vortex	Thermolyne	M37610-26

2. MÉTODOS

2.1. Estandarización de un protocolo para la obtención de saliva de caninos domésticos.

Se elaboró un protocolo de consentimiento informado dirigido a los dueños de los animales, el cual fue aprobado por el Comité de Bioética Animal de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile (Anexo 1). Se describió resumidamente el procedimiento de extracción salival, que se detalla a continuación. Se seleccionaron 10 perros sanos adultos, machos o hembras. Se prefirieron animales sin sintomatología clínica de enfermedad periodontal, aunque no se descartaron animales que presentaron prognatismo.

Para obtener la saliva canina (SC), se elaboró un sistema que permitiera la recolección de la muestra en forma rápida y eficaz, sin mayor molestia aparente para el animal, el cual consistió en tomar varias tiras de papel filtro Sartorius tipo Whatman 3 hw, de 1 cm de ancho y 3 cm de largo. Con estas dimensiones, se definió que el papel es capaz de absorber un máximo de 50 μ l de líquido de base acuosa. Las tiras de papel fueron sometidas a 3 ciclos de lavado con PBS 1X, durante 5 minutos, en agitación constante ("shaker" orbital, N-Biotek), para así eliminar posibles elementos contaminantes. Posteriormente, las tiras de papel fueron embebidas en una solución de PBS – BSA al 1%, durante 2 horas a 37° C, para permitir la unión (adsorción) del BSA a la celulosa. Se continuó con otro ciclo de 3 lavados de 5 minutos con PBS 1X, para luego finalizar con un secado de los papeles aplicando aire caliente. Los papeles quedaron almacenados a 4°C, listos para su utilización.

Para obtener la muestra de SC, se procedió a abrir la boca del animal, consciente, sin uso de tranquilizantes, en un procedimiento simple que involucró mínimo estrés para el animal. El papel se colocó en la superficie superior del tercio lingual anterior, a modo de absorber la mayor cantidad de SC. Una vez embebido el papel en SC, este fue trozado en pequeños pedazos que fueron depositados en un tubo Eppendorf con 100 μ l de buffer de carga de proteínas (β 2-mercaptoetanol 5% v/v, en una solución de glicerol al 50% v/v, azul de bromofenol al 0,12% p/v, Tris base 120 mM y SDS al 4%). Luego, la muestra fue calentada a 100° C, durante 5 minutos, centrifugada por 3 minutos a 15.690 g, para luego rescatar el sobrenadante, ya en condiciones de ser ocupado para cargar la muestra en el gel SDS- PAGE.

En paralelo, se recolectó saliva humana (SH) de voluntarios sanos de ambos sexos, mediante el mismo protocolo, para ser ocupada como control.

2.2. Determinación de calreticulina de *C. familiaris* (CfCRT) en saliva de caninos domésticos (SC), observando reactividad cruzada, mediante utilización de anticuerpos heterólogos (Criterio antigénico).

Este objetivo se llevó a cabo utilizando ensayos de inmunoelectrotransferencia (IWB).

a) 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), en condiciones reductoras. Para el gel separador se utilizó una solución de acrilamida al 30% p/v, agua desionizada, solución tampón (pH 8,8), persulfato de amonio al 10% p/v y N,N,N',N'-Tetrametiletilendiamina (TEMED) (Bio-Rad) 0,065% v/v. Una vez polimerizado el gel separador, a temperatura ambiente, se preparó sobre él, el gel concentrador ("gel stacking"), utilizando los mismos reactivos mencionados anteriormente, pero con la excepción de que la solución tampón, en este caso, presentaba un pH 6,8.

La polimerización de este gel se realizó con una peineta discontinua. Previo a cargar las muestras en el gel, las proteínas fueron denaturadas con β 2-mercaptoetanol 5% v/v, en una solución de glicerol al 50% v/v, azul bromofenol al 0,12% p/v, Tris base 120 mM y SDS al 4%. Luego, las muestras fueron calentadas a 100 °C, durante 5 minutos. La electroforesis se realizó en una cámara Bio-Rad a 100 voltios, a temperatura ambiente.

Las muestras cargadas fueron 20 μ g de proteínas totales de SC y SH. También se corrió en los geles, Calreticulina de *Trypanosoma cruzi* (TcCRT) y Calreticulina humana (HuCRT), solas y previamente incubadas en saliva humana y canina. Estos controles fueron útiles para determinar posición electroforética y para descartar o aceptar la presencia de factores que degraden CRT en la saliva de ambas especies. A modo de comparación entre proteínas nativas, se corrió también 20 μ g de proteína total proveniente de extracto de células HEK 293 ("Human Embryonic Kidney"), como fuente de CRT nativa, para visualizar posibles diferencias de peso molecular (PM) aparente con la proteína recombinante. Los geles fueron teñidos con azul de Coomasie y se procedió a definir el PM aparente relativo de las muestras. La réplica del gel fue sometida a procedimientos de IWB.

b) Transferencia (Towbin et al., 1979)

Consistió básicamente en la transferencia de las proteínas corridas en el gel SDS-PAGE a una membrana de nitrocelulosa (GE Healthcare), en un sistema húmedo estándar durante 60 minutos a 100 voltios, a 4 °C (Bio-Rad). Luego, la membrana se bloqueó con PBS-leche al 5%, durante toda la noche a 4 °C. Al día siguiente, se incubó con el primer anticuerpo policlonal de conejo (AcPo) y monoclonal de ratón (AcMo) anti-HuCRT y anti-MuCRT, además de AcPo de conejo anti TcCRT, según el caso, durante 90 minutos a temperatura ambiente. A continuación, se lavó e incubó con un segundo anticuerpo, una IgG de cabra conjugada a fosfatasa alcalina, 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-cloro-indol, Sigma, y buffer para fosfatasa alcalina).

Extracción proteica de células HEK-293

Se utilizaron 5×10^6 células, a las cuales se les removió el medio de cultivo y se lavaron con tampón fosfato salino PBS frío (137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 4,3 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$, 1,4 mM KH_2PO_4) centrifugando a 290 g por 5 minutos, a 4 °C. Se resuspendieron las células en 1 ml de PBS frío en tubos eppendorf y se centrifugaron a 3.340 g por 10 minutos a 4°C. Se eliminó el sobrenadante y se agregó 100 ml de tampón de lisis RIPA (50mM Tris-HCl, pH 7.5, 150mM NaCl, 1% Tritón X-100, 0.5% Deoxicolato sódico, 0.1% SDS) en presencia de un cocktail de inhibidores de proteasas (Calbiochem®), se resuspendió vigorosamente y se incubó en hielo por 10 minutos. Para obtener una solución lo más homogénea posible, las células se sonicaron (Microson™ XL2000, Misonix) a nivel 5 por 1 minuto, 5 veces. Luego se incubó por 10 minutos en hielo, posteriormente se centrifugó a 15.690 g por 25 minutos a 4 °C y se rescató el sobrenadante sin tocar el pellet transfiriéndose a otro tubo.

Se determinó la cantidad total de proteínas con el reactivo de Bradford (BioRad), utilizando el reactivo de acuerdo a las especificaciones del fabricante. Luego, se agregó tampón de carga 3x (Tris pH 6,8, glicerol 97%, β 2-mercaptoetanol y SDS 20%, para denaturar las proteínas, agua y azul de bromofenol). Luego se incubó durante 5 minutos a 100 °C y se cargaron 10 μ g de proteína en gel de poliacrilamida al 10%.

Cuantificación de proteínas totales

Se utilizó el reactivo de Bradford (Bradford, 1976), con un espectrofotómetro Genova (Jenway) usando una curva estándar de BSA. Cada ensayo se hizo por triplicado y se promediaron las tres lecturas obtenidas en cada caso para obtener el valor final.

2.3. Determinación de la unión de CfCRT presente en saliva canina a C1q, primer componente del sistema del complemento humano, en ensayo de electrotransferencia⁴ (Criterio funcional).

Se realizó un SDS-PAGE, bajo condiciones de reducción, según se describe en el objetivo anterior. Se cargaron 15 µg de C1q (Complement Technology, Tyler, Texas, USA) y el SDS-PAGE resultante transfirió a membranas de nitrocelulosa, a 100 Voltios, durante 1 hora en buffer de transferencia. Las membranas fueron incubadas en solución de bloqueo (5% de leche descremada en PBS 1X), durante toda la noche a 4° C. Al día siguiente, las membranas fueron sometidas a 4 ciclos de lavados de 5 minutos cada uno, con PBS-Tween 20 al 0,05%, para continuar con la incubación durante 3 horas a temperatura ambiente, con 500 µg de proteína total contenida en la muestra de SC y SH. Como controles positivos de unión, se cargó 200 µg de rHuCRT y 200 µg de rTcCRT, diluidos en 1 ml de PBS- Leche al 3% (p/v) y como control negativo de unión se usó 1 ml de PBS- Leche al 3% (p/v).

Nuevamente, las membranas fueron lavadas, incubadas con el primer anticuerpo policlonal de conejo anti HuCRT o anti TcCRT, según el caso, en una dilución de 1:1.500. Luego de transcurridas las 3 horas de incubación, las membranas fueron nuevamente lavadas, incubadas con un segundo anticuerpo de cabra conjugada a fosfatasa alcalina, anti IgG de conejo en dilución de 1:3.000, durante una hora a temperatura ambiente. Finalmente se reveló la membrana con sustrato para fosfatasa alcalina (NBT: Nitro Blue Tetrazolium, BCIP: Fosfato 5-bromo-4-cloro-indol, Sigma, y buffer para fosfatasa alcalina).

⁴ En el Anexo 2 se describen brevemente las rutas de activación del sistema del complemento, dado que la interacción de CRT con proteínas de este sistema y su consiguiente inactivación se utilizan en este trabajo como criterios funcionales para definir la presencia de CRT en saliva canina.

2.4. Determinación del efecto inhibitor de la ruta clásica del sistema del complemento por SC (Criterio funcional).

Se realizó un ELISA⁵(Engval y Perlman, 1971) modificado (Ferreira *et al.*, 2004b), en el cuál se sensibilizaron placas de microtitulación de cloruro de polivinilo (PVC) con 100 µl/pocillo de IgG de conejo (4 µg/ml) y se incubaron durante toda la noche a 4°C.

Luego, los sitios activos remanentes en la fase sólida se bloquearon con 250 µl/pocillo de solución PBS/BSA (albúmina de suero bovino en tampón fosfato salino) al 3% (p/v), durante 2 horas a 37°C en incubadora (Dynamic Incubator, ABBOT). Entre cada paso, las placas fueron sometidas a cuatro lavados con 250 µl/pocillo de PBS/Tween-20 (Winkler) al 0,05% p/v. Posteriormente, las placas sensibilizadas con IgG se incubaron con diluciones seriadas (1:40-1:1.280) de suero normal humano (SNH), como fuente de C1, en buffer Veronal (VB2+) (5,5-diethylbarbituric acid sodium salt 5 mM, NaCl 140 mM, MgCl₂ 0,5 mM, CaCl₂ 0,15 mM), durante 1 hora a 37°C.

Posteriormente, se eligió la dilución de SNH que resultó en el depósito de una cantidad subsaturante de C1, juzgado esto por su capacidad de activar C4 puro humano, el que se unió covalentemente, vía enlaces hidroxilo o amidoéster, establecidos con grupos amino ó hidroxilos libres de las proteínas unidas a la fase sólida. Esa concentración de SNH fue la que se usó en los experimentos siguientes para tratar los pocillos sensibilizados con IgG, en presencia de concentraciones crecientes de SC. El depósito de C4b humano se detectó mediante anticuerpo de cabra anti-C4 humano (Calbiochem), en dilución 1:4.000 en PBS-BSA 1% (p/v) y anticuerpo de conejo anti-Ig de cabra-peroxidasa (Calbiochem), en dilución 1:10.000 en PBS-BSA 1% (Ver Figura 3).

Finalmente, la reacción se reveló con 100 µl/pocillo de solución sustrato para peroxidasa (ABTS: 2,2'-azino-bis-(3-etilbenziazolina-6- ácido sulfónico)) (Sigma) y se detectó el producto coloreado a 405 nm en un espectrofotómetro (Microplate reader, Bio-Rad). Como controles, se incluyeron pocillos sin el anticuerpo primario y sin el anticuerpo secundario. En ensayos posteriores, ocupando la dilución de suero establecida, se preincubó con SC, durante 30 minutos a 37°C, en presencia de buffer Veronal. Como controles positivos de inhibición, se incubaron concentraciones variables de HuCRT, TcCRT y 10 µM de EDTA y como control negativo de inhibición, se incubó BSA en concentraciones variables.

⁵ Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay: ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas

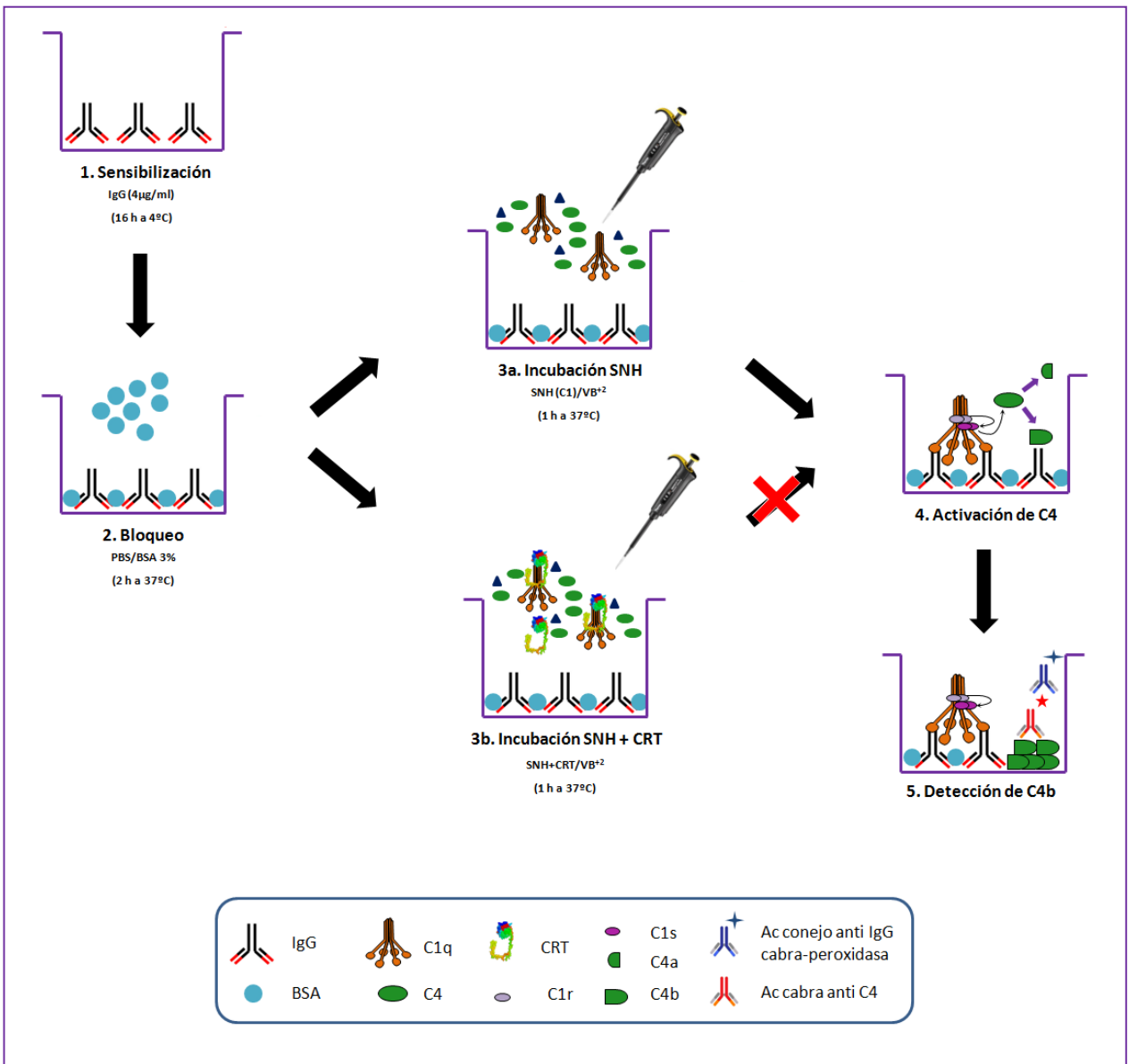


Figura 3: Esquema representativo del ensayo de activación (3.a) e inhibición (3.b) de la ruta clásica del sistema del complemento.

Análisis Estadístico

Los ensayos inmunométricos, tipo ELISA, generaron densidades ópticas que variaron entre el grupo experimental en estudio y el grupo control negativo de inhibición. Se determinaron las medias de estas observaciones en triplicado, con sus respectivas desviaciones estándar y se compararon ambos grupos mediante una prueba de ANDEVA de dos colas y se calculó el valor de p utilizando el programa GraphPad Prism® versión 5.01.

La presencia o ausencia de bandas en las transferencias electroforéticas se estimó en forma cualitativa.

RESULTADOS

1) Estandarización de un protocolo para la obtención de saliva de *C. lupus familiaris*.

El método ocupado para extraer saliva canina resultó ser eficaz, en cuanto a su facilidad en tomar la muestra. Permitió obtener una cantidad de 50 μl de saliva por cada tira de papel. Cuantificando la cantidad de proteína total en SC, mediante método Bradford, se concluyó que 1 μl de SC contiene 1,18 μg de proteína total, por lo tanto cada tira de papel saturada en SC permitió recolectar 59 μg de proteína total. En SH la concentración proteica fue de 1,1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, por lo tanto, por cada tira de papel se obtiene 55 μg de proteína total.

Para verificar que no existiera algún componente en el papel que pudiera ser reconocido con los anticuerpos anti CRT, se depositaron los trozos de papel filtro en ausencia de saliva, en un tubo Eppendorf con 100 μl de buffer de carga de proteínas, luego la muestra fue sometida a 100° C durante 5 minutos y posteriormente fue centrifugada por 3 minutos a 13.000 rpm, para finalmente rescatar el sobrenadante y así ocuparlo para realizar un SDS- PAGE, en el cual no se aprecian bandas proteicas al teñir con Azul de Coomasie (Fig. 4A). Luego se realizó una detección con anticuerpo policlonal anti-HuCRT, seguido de una inmunosonda enzimática. No hubo reconocimiento de antígenos (Fig. 4B). Por lo tanto, cualquier producto detectado en saliva adsorbida en estos papeles, debiera provenir de ese fluido.

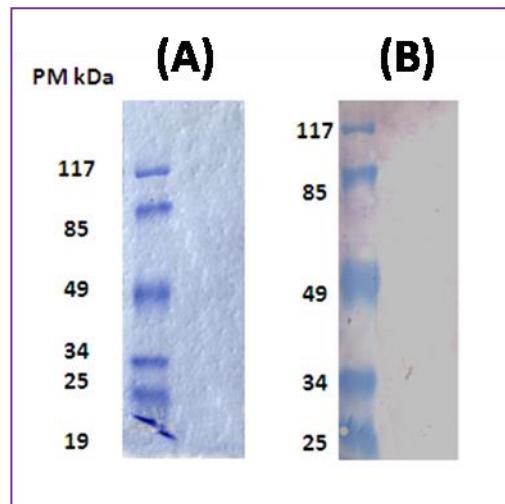


Figura 4: Los filtros utilizados en la toma de muestras salivales no contienen antígenos reconocibles por anticuerpos anti CRT en SDS-PAGE (A) o en IWB (B).

2) Determinación de calreticulina de *C. lupus familiaris* (CfCRT) en saliva de caninos domésticos (SC), utilizando criterios antigénicos.

2.1) Reconocimiento de CfCRT presente en SC con AcMo y AcPo anti-MuCRT.

Se realizó un ensayo SDS-PAGE, en el cual se cargó SC (20 µg de proteína total). En la figura 5 se observa el patrón electroforético de saliva de 10 caninos, en el cual se observan con mayor nitidez, 3 bandas proteicas de PM cercano a los 80, 55 (la más prominente) y 48 kDa.

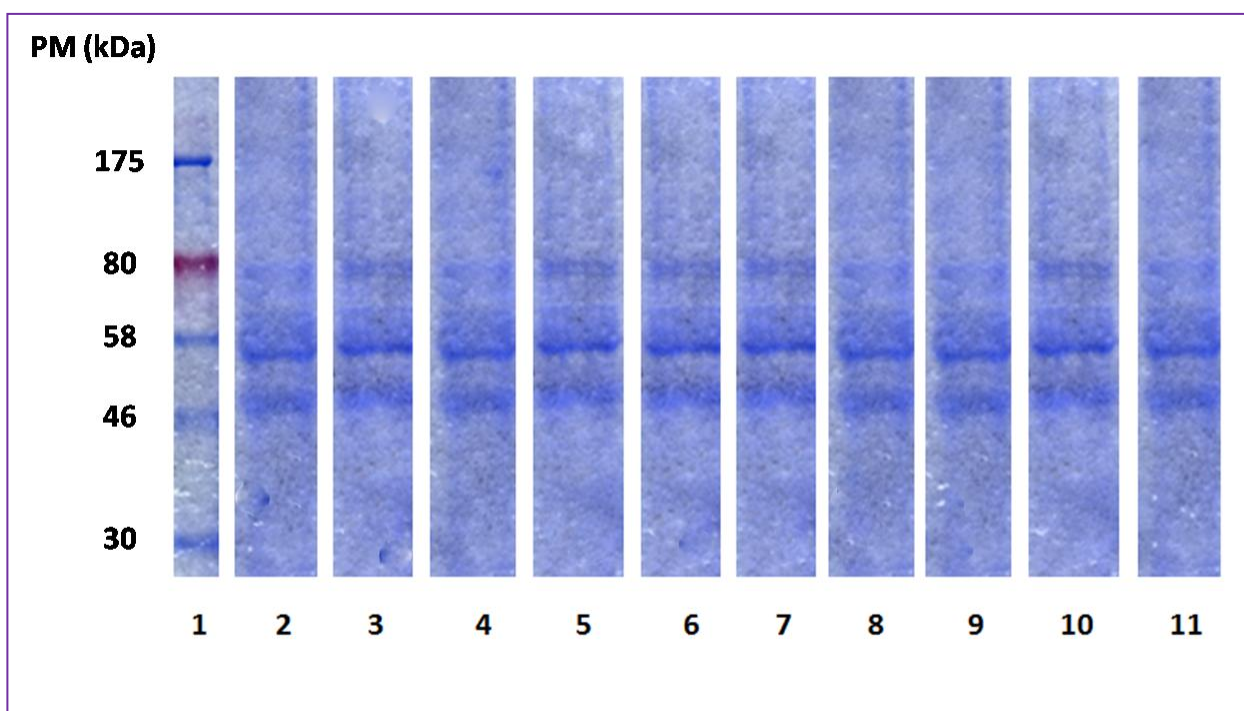


Figura 5: Patrón proteico electroforético de saliva canina en SDS-PAGE teñido con Azul de Coomassie. Carril 1: estándar de PM preteñido, carriles 2-11: saliva de 10 caninos distintos (20 µg de proteína total por carril).

Una réplica del gel anterior fue sometida a transferencia, donde posteriormente las muestras cargadas fueron reconocidas por un anticuerpo monoclonal contra MuCRT. Se pudo observar un claro reconocimiento de una banda proteica de peso molecular aparente de 55 kDa (**Fig. 6**).

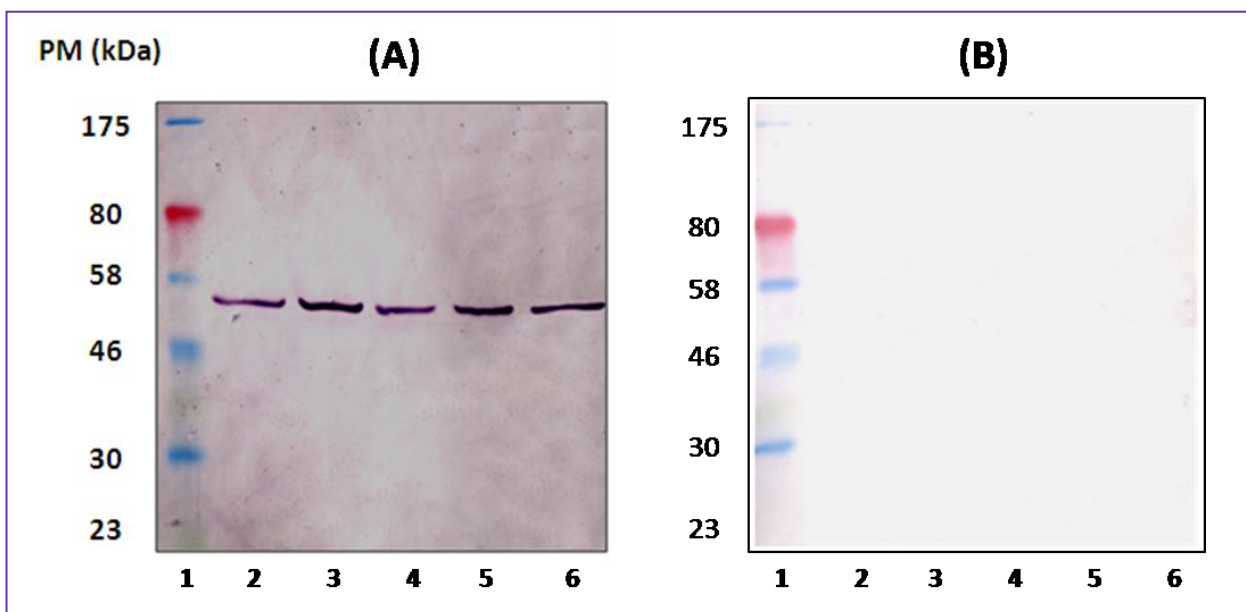


Figura 6: Reconocimiento de CfCRT en IWB mediante anticuerpo monoclonal anti MuCRT. En (A) y (B), carril 1: estándar de PM preteñido, carriles 2-6: saliva de 5 caninos (20 μ g de proteína total por carril). (A): Detección con AcMo de ratón anti MuCRT. (B): Detección con suero pre inmune.

Para calcular el PM aparente relativo de CfCRT putativa, primero se calculó la movilidad electroforética relativa (Rf), que es inversamente proporcional al logaritmo del PM (Tabla IV).

Tabla IV: Determinación del peso molecular relativo de CfCRT putativa, mediante SDS-PAGE. Las muestras fueron reducidas con β 2-mercaptoetanol, y corridas en un SDS-PAGE al 10%.

Marcador	PM (Da)	Migración (mm)	Rf
MBP- β -galactosidasa ¹	175,000	13.5	0.30
MBP-truncated- β -galactosidasa ¹	80,000	19.5	0.43
MBP-CBD ¹	58,000	24	0.53
CBD- <i>Mxe</i> Intein-2CBD ¹	46,000	29.5	0.66
CBD- <i>Mxe</i> intein ¹	30,000	36.5	0.81
CBD- <i>E.coli</i> par ¹	23,000	41	0.91
CfCRT putativa	X	25.5	0.57

¹MBP= proteína de unión a maltosa. MBP- β -galactosidasa= fusión de MBP y β -galactosidasa. MBP-truncada- β -galactosidasa= fusión de MBP y β -galactosidasa truncada. MBP-CBD= fusión de MBP y dominio de unión a quitina. CBD-*Mxe* Intein-2CBD= fusión del dominio de unión a quitina, *Mxe* Intein seguido de 2 dominios de unión a quitina. CBD-*E.coli* par= fusión del dominio de unión a quitina seguido de la proteína tipo parvulina de *E. coli*.

Trazando un gráfico con estándares de PM conocido, se obtuvo una línea de referencia en la cual se puede interpolar muestras de PM desconocido. El Rf se calculó dividiendo la distancia (mm) recorrida por la banda en cuestión, entre la distancia recorrida por el colorante azul de bromofenol (u otro punto de referencia arbitrario). Al graficar estos datos (x=Rf, y=Log PM) se observa la relación mencionada (**Fig. 7**). El PM estimado para CfCRT putativa es de 55.000 daltons, obtenido al interpolar su movilidad a la regresión lineal generada por las movilidades de los marcadores de pesos moleculares.

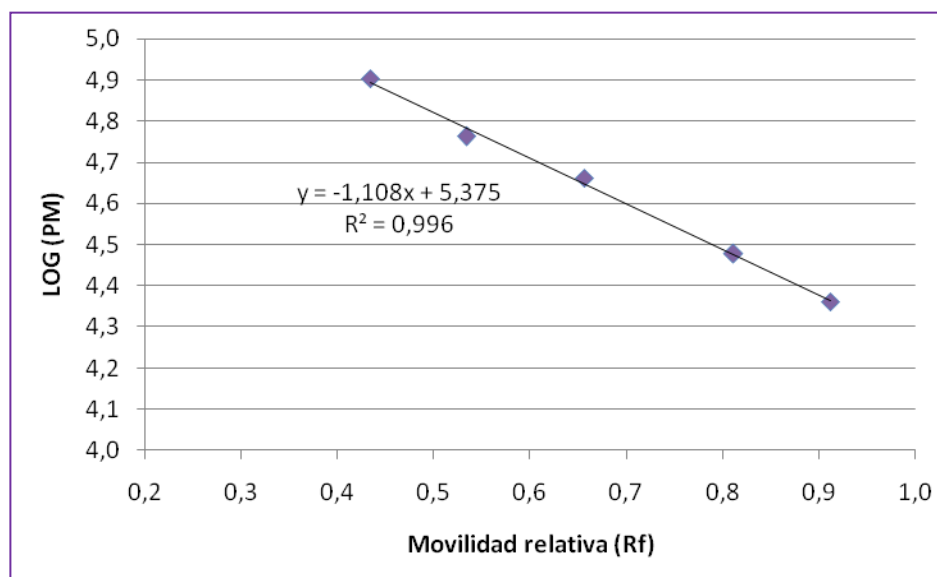


Figura 7: Curva de referencia para la estimación del PM aparente de CfCRT putativa mediante SDS-PAGE. Los datos corresponden a los resumidos en la Tabla IV.

El reconocimiento de CfCRT putativa fue mediado por reactividad cruzada, bajo la utilización de un anticuerpo que reconoce a MuCRT, lo cual confirma la alta homología y conservación de esta molécula en distintas especies, hecho que se puede confirmar al realizar un alineamiento de las secuencias aminoacídicas deducidas (**Fig. 8**) entre ambas proteínas, observándose un 95% de identidad (**Tabla V**).

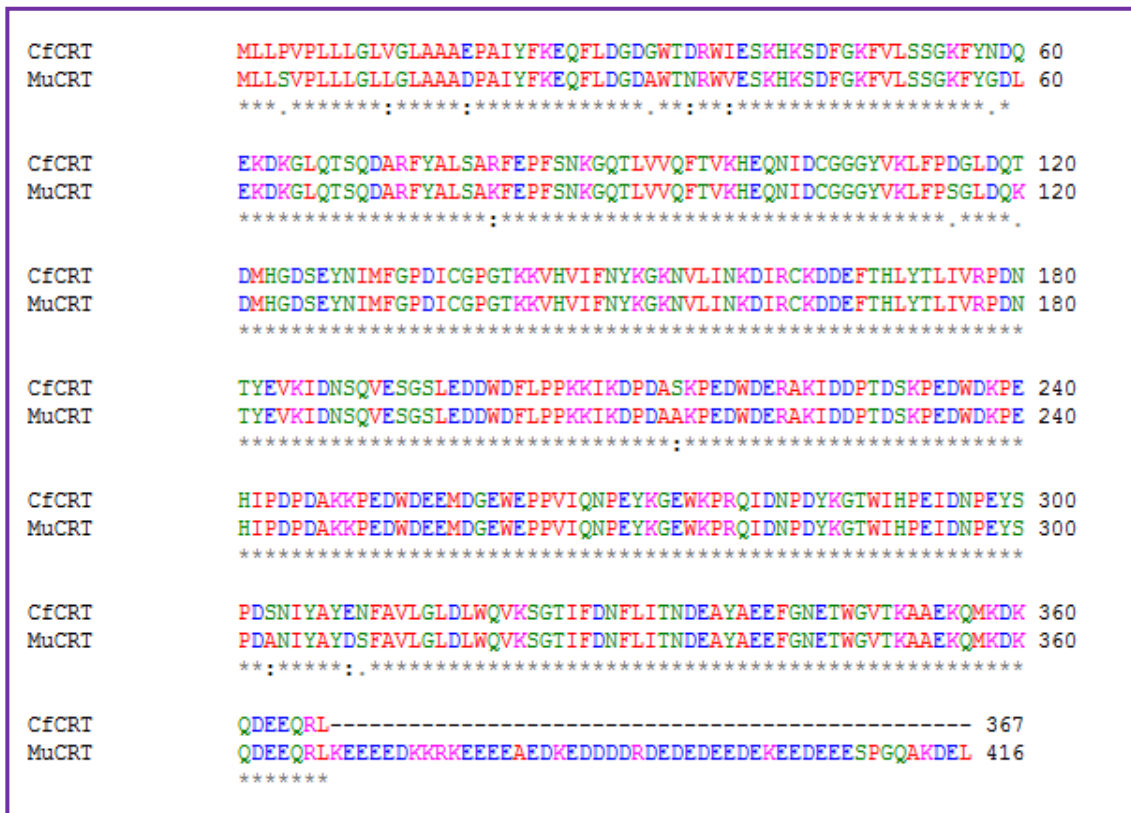


Figura 8: Las moléculas precursoras de CfCRT y MuCRT presentan un alto grado de identidad. Alineamiento de las secuencias aminoacídicas de la molécula precursora de CfCRT y MuCRT. (-): espacios generados para un óptimo alineamiento de las secuencias, (*): 100% identidad aminoacídica, (): aminoácidos absolutamente divergentes, (.) : aminoácidos divergentes, (:): aminoácidos menos divergentes.

En otro IWB, desarrollado con el anticuerpo monoclonal anti MuCRT, la molécula humana y CfCRT putativa de SC, mostraron pesos moleculares aparentes de 60 y 55 kDa, respectivamente. Como HuCRT es recombinante, carece de secuencia de retención en el retículo endoplásmico, tiene aminoácidos amino y carboxi terminales provenientes del vector de clonamiento, no es glicosilada y presumiblemente, su estructura terciaria puede diferir de la proteína nativa.

En general, dadas las modificaciones anteriores, las proteínas recombinantes muestran tamaños moleculares aparentes mayores que sus contrapartes nativas. Esto se observa en el experimento resumido en la Figura 9, donde se comparan los pesos moleculares aparentes de HuCRT nativa, proveniente de un extracto de células HEK-293, con rHuCRT.

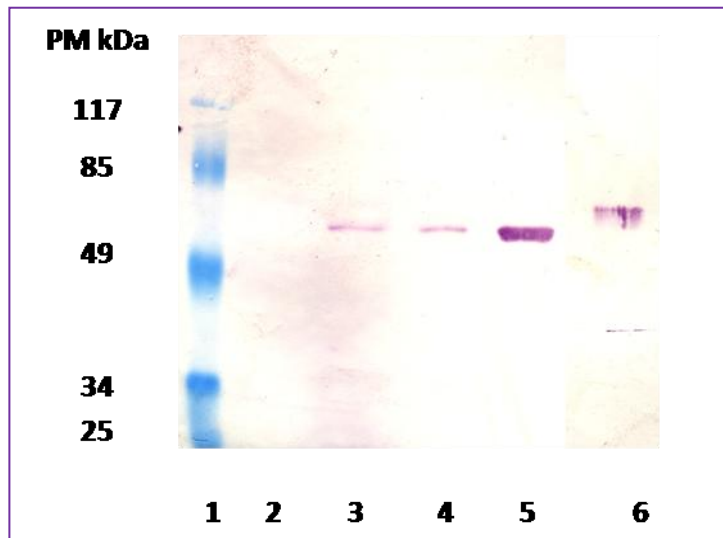


Figura 9: CfCRT putativa, HuCRT, ambas de saliva y HuCRT de extracto de células humanas HEK-293, tienen pesos moleculares relativos similares entre sí, e inferiores al de rHuCRT. IWB desarrollado con AcMo anti-MuCRT. Carriles: (1) estándar de PM preteñido, (3) SC, (4) SH, (5) extracto de células HEK 293, (6) rHuCRT. Carriles 3-5: 20 μ g de proteína total. Carril 6: 10 ng

Utilizando el AcPo de conejo anti-MuCRT, podemos observar que en SC y SH se reconoce una banda de 55 kDa, con mayor intensidad en SC. El PM de esta banda concuerda con los controles positivos con extracto de células RAW 264.7, como fuente de proteína nativa y en los controles con la proteína recombinante HuCRT y TcCRT (Fig 10).

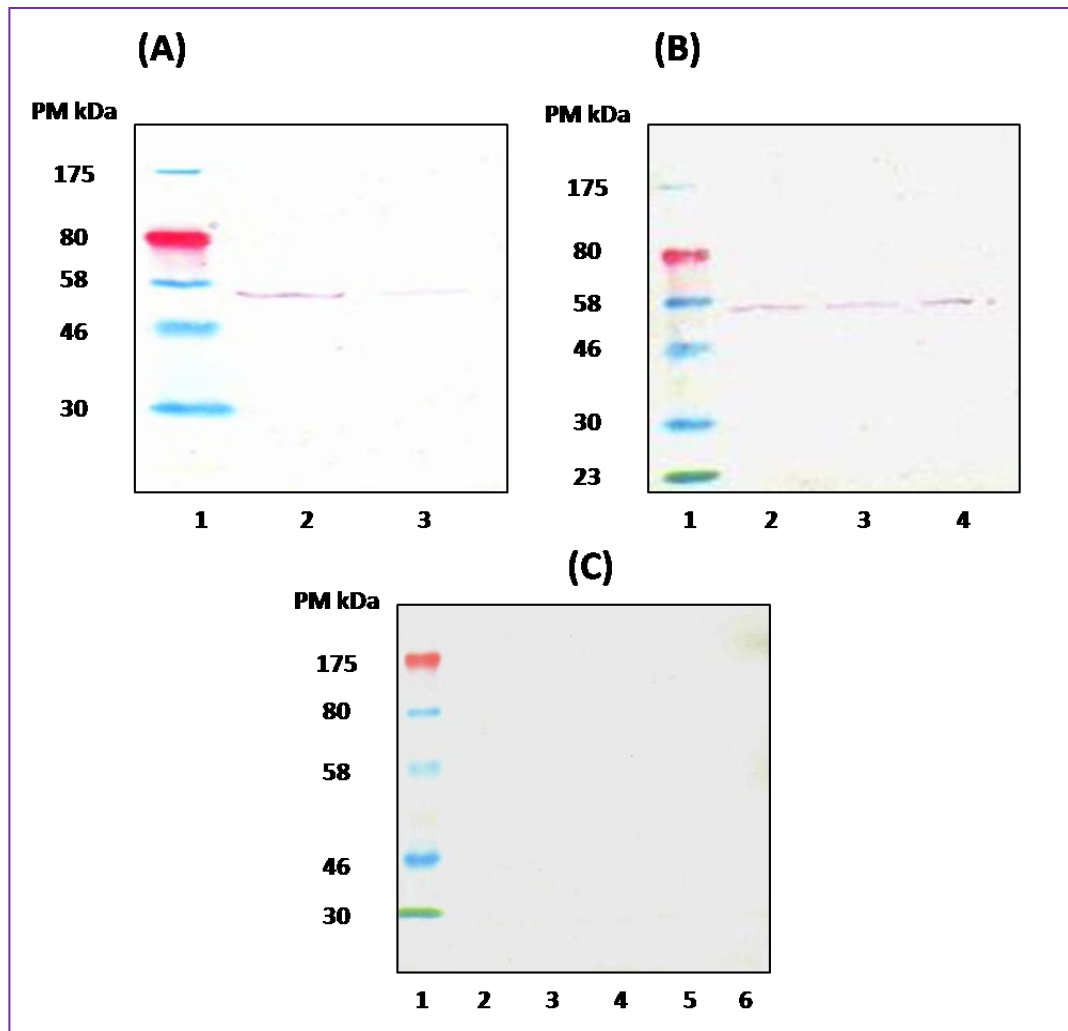


Figura 10. CfCRT es reconocida por un AcPo anti CRT murina (MuCRT). (A): Carriles, 1: estándar de PM preteñido; 2: SC; 3: SH. (B): Carriles, 1: estándar de PM preteñido; 2: extracto de células RAW 264.7; 3: rHuCRT; 4: rTcCRT. En A y B se utilizó AcPo de conejo anti MuCRT y como Ac secundario, Ig conjugada a fosfatasa alcalina anti IgG de conejo. (C): Carriles, 1: estándar de PM preteñido; 2: SC; 3: SH; 4: extracto de células RAW 264.7; 5: rHuCRT; 6: rTcCRT. En C se utilizó suero pre inmune de conejo. De SC, SH y extracto de células RAW 264.7 se cargó 20 μ g de proteína. De rTcCRT y rHuCRT se cargó 10 ng.

2.2) Reconocimiento de CfcRT presente en SC con AcPo anti-TcCRT. Criterio antigénico.

Utilizando AcPo anti-TcCRT, se observan bandas en SC y SH, siguiendo un patrón similar al del control con 10 ng de rTcCRT, donde la banda de 58 kDa presenta mayor nitidez. En la muestra de SC además se observan 2 bandas de 80 kDa, lo cual no se observa en SH ni en rTcCRT (**Fig. 11**).

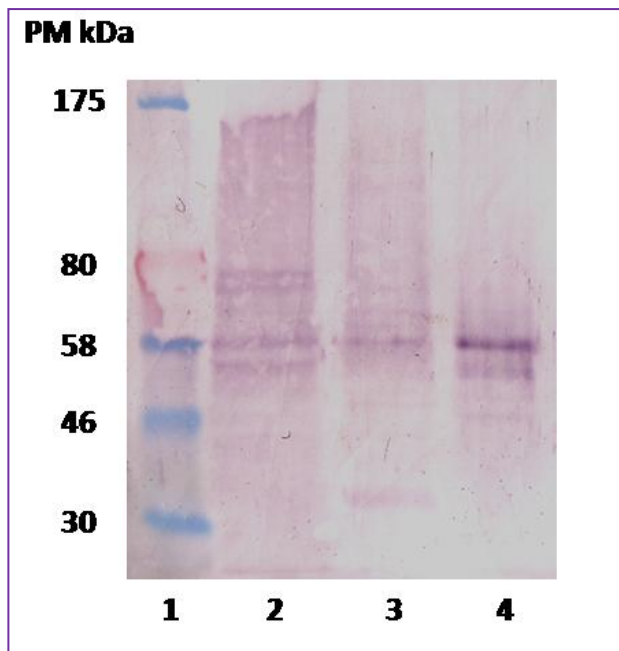


Figura 11: CRT es reconocido en SC y SH por AcPo anti-TcCRT. Carriles: (1) marcador de PM preteñido, (2) SC, (3) SH y (4) rTcCRT. Carriles 2-3: 20 μ g de proteína total; 4: 10 ng. Revelado con AcPo anti TcCRT y como anticuerpo secundario una Ig de cabra anti Ig de conejo.

Las secuencias aminoacídicas de CfCRT (Michalak *et al.*, 1991) y de TcCRT (Aguillón *et al.*, 2000) (Fig. 12), muestran un 41% de identidad aminoacídica (Tabla V), lo que podría explicar la reactividad cruzada que se obtuvo al detectar CfCRT en SC con el AcPo contra la proteína parasitaria.



Figura 12: Las secuencias aminoacídicas de CfCRT y TcCRT muestran 41% de identidad aminoacídica. Alineamiento de la secuencia aminoacídica de la molécula precursora de CfCRT y de TcCRT. (-): espacios generados para un óptimo alineamiento de las secuencias de las secuencias, (*): 100% identidad aminoacídica, (.) : aminoácidos absolutamente divergentes, (.) : aminoácidos divergentes, (:): aminoácidos menos divergentes.

2.3) Reconocimiento de CfcRT presente en SC con AcMo y AcPo anti-HuCRT.

Utilizando el AcMo de ratón anti-HuCRT, se puede apreciar que en las muestras de saliva de 5 caninos distintos, se reconoce una banda bien definida de PM aparente de 55 kDa. (**Fig. 13**).

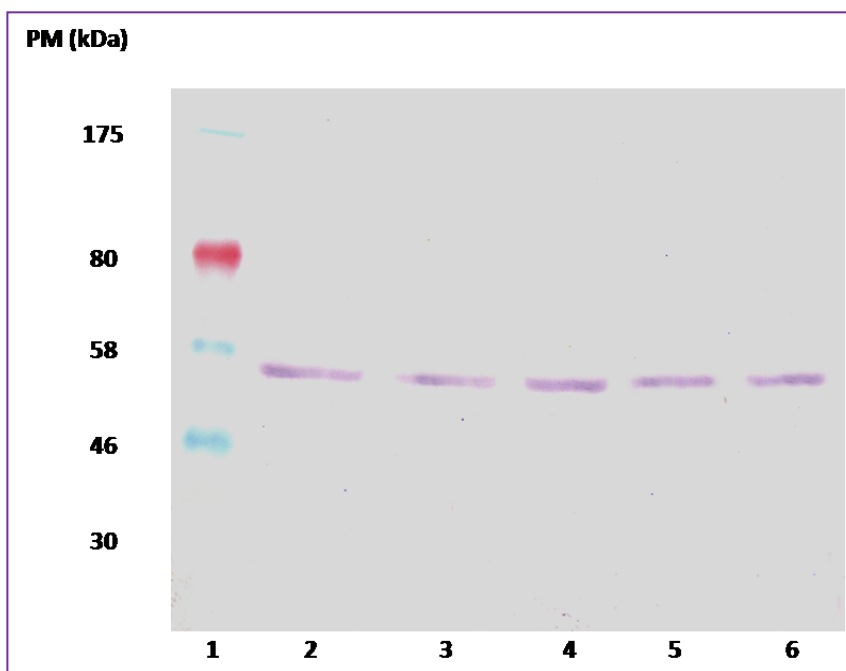


Figura 13: Reconocimiento de CfcRT en IWB mediante anticuerpo monoclonal anti-HuCRT. Carril 1: estándar de PM preteñido, carriles 2-6: saliva de 5 caninos (20 μ g de proteína total por carril).

El AcPo anti- HuCRT, detecta en SC y SH 3 bandas de PM aparente de 80, 58 y 46 kDa. También se cargaron 10 ng rHuCRT como control (Fig. 14).

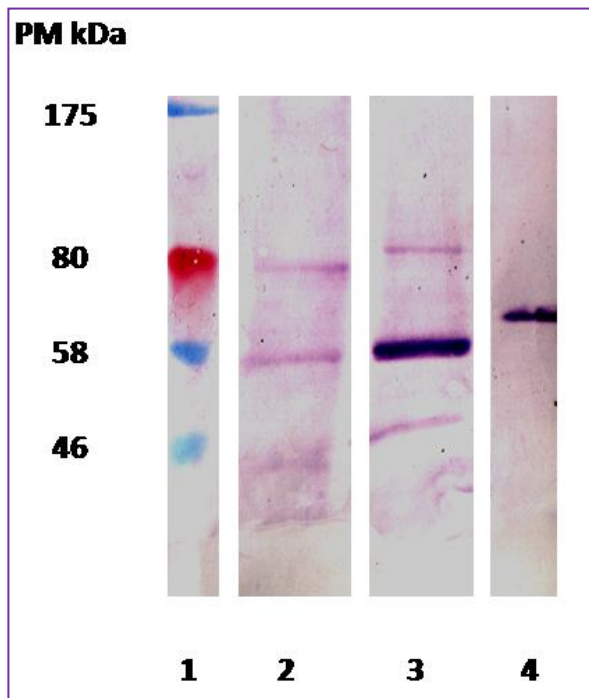


Figura 14: CRT es reconocida en SC y SH con AcPo de conejo anti HuCRT. Carriles (1): marcador de PM preteñido, (2): SC, (3): SH, (4): rHuCRT.

La reactividad cruzada que se obtuvo al detectar CfCRT en SC con un anticuerpo contra la proteína humana, puede ser explicada por la alta identidad aminoacídica (96%) que existe entre CRT de ambas especies (**Tabla V**), al realizar un alineamiento de sus secuencias aminoacídicas (**Fig. 15**).



Figura 15: Existe un 96% de identidad en las **secuencias aminoacídicas de la molécula precursora de CfCRT y HuCRT**. (-): espacios generados para un óptimo alineamiento de las secuencias, (*): 100% identidad aminoacídica, () : aminoácidos absolutamente divergentes, (.) : aminoácidos divergentes, (:): aminoácidos menos divergentes.

La Tabla V muestra un resumen de las identidades obtenidas al realizar el alineamiento de la secuencias aminoacídica precursora de CfCRT con HuCRT, TcCRT y MuCRT.

Tabla V: Identidad comparativa entre las secuencias aminoacídicas de la molécula precursora de CfCRT con las de HuCRT, TcCRT y MuCRT. Los datos fueron obtenidos al alinear las secuencias en la NCBI (National Center for Biotechnology Investigation) y fueron analizados en ClustalW2.

Secuencia	Largo (aa)	Secuencia	Largo (aa)	% Identidad
CfCRT	367	HuCRT	417	96
CfCRT	367	TcCRT	403	41
CfCRT	367	MuCRT	416	95

3) Determinación de la unión de CfCRT presente en saliva canina a C1q, primer componente del sistema del complemento humano, en IWB (Criterio funcional).

C1q, el módulo macromolecular detector de señales de peligro (principalmente Igs agregadas por antígenos), está compuesto por tres cadenas polipeptídicas (A, B y C, de 27,5, 25,2 y 23,8 kDa, respectivamente). Estas cadenas, codificadas por tres genes distintos, forman seis trímeros, en los cuales cada cadena está representada una vez. Entonces, el complejo macromolecular C1 consta de 18 cadenas, seis A, seis B y seis C, con un peso total aproximado de 460 kDa. Las cadenas C, de dos trímeros contiguos, y las A y B, de un mismo trímero, están unidas por puentes disulfuro. Por lo tanto, en SDS-PAGE reductor, se observará un conjunto de tres bandas de pesos cercanos a los 30 kDa, frecuentemente no bien discernibles.

Para validar este ensayo, se realizaron inicialmente los controles pertinentes. Al cargar C1q humano, se observó mediante SDS-PAGE reductor al 10% e IWB, una banda de 30 kDa. Esta banda corresponde al PM aproximado de las cadenas A, B y C de C1q (Fig. 16).

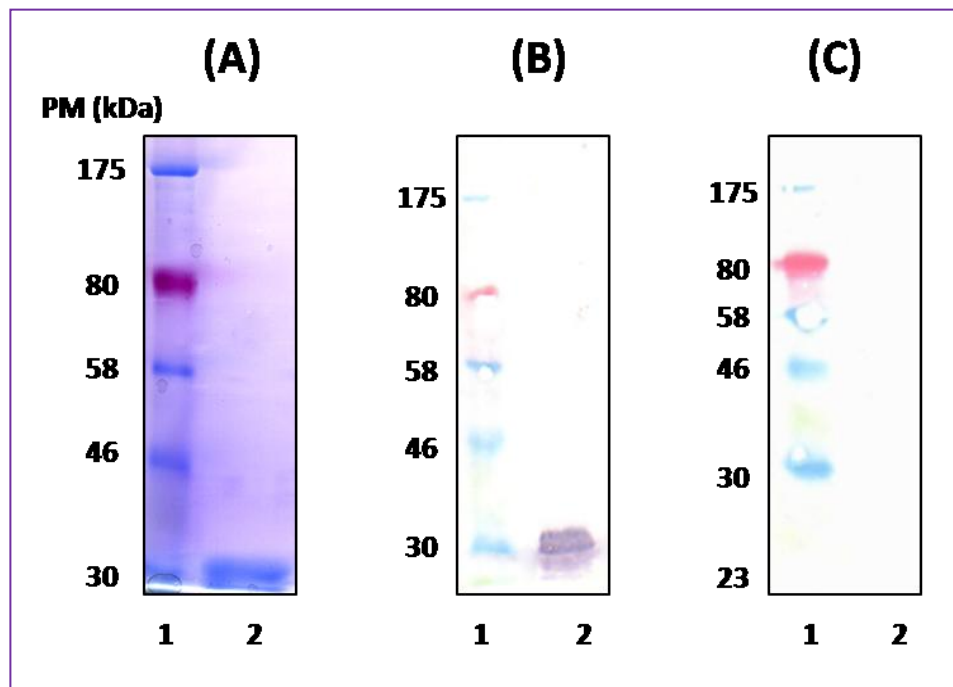


Figura 16: Patrón electroforético de C1q, en condiciones reductoras. (A): SDS-PAGE al 10%, teñido con azul de Coomassie. Carril 2: 10 µg de C1q Humano. **(B)** y **(C):** IWB. Carril, 2: 300 ng de C1q humano. **(A)** detectado con AcPo de conejo anti C1q humano y como Ac secundario, Ig de cabra anti- Ig de conejo. **(C)** desarrollado con suero pre inmune de conejo. En **A**, **B** y **C**, carril 1: estándar preteñido de PM.

Una propiedad bastante conservada en CRT de diferentes especies es la de unirse a las colas colagenosas de C1q, primer componente de sistema del complemento, mediante el subdominio S, que se encuentra desde el aa 151 al 281. En la Figura 17, se resume los resultados de cuatro experimentos de IWB, donde se cargaron 15 μ g de C1q humano, los que posteriormente fueron transferidos a una membrana de nitrocelulosa, para luego incubarlos con SC (A), SH (C), rHuCRT (E) y rTcCRT (G) y revelados con los AcPo contra CRT. En todos los casos se detectaron bandas correspondientes al rango esperado para las cadenas de C1q (23-30 kDa).

Las CRTs que se han definido como putativas en SC y SH se unen a C1q. De este modo, se agrega a los criterios antigénicos un criterio funcional que sustenta esta propuesta.

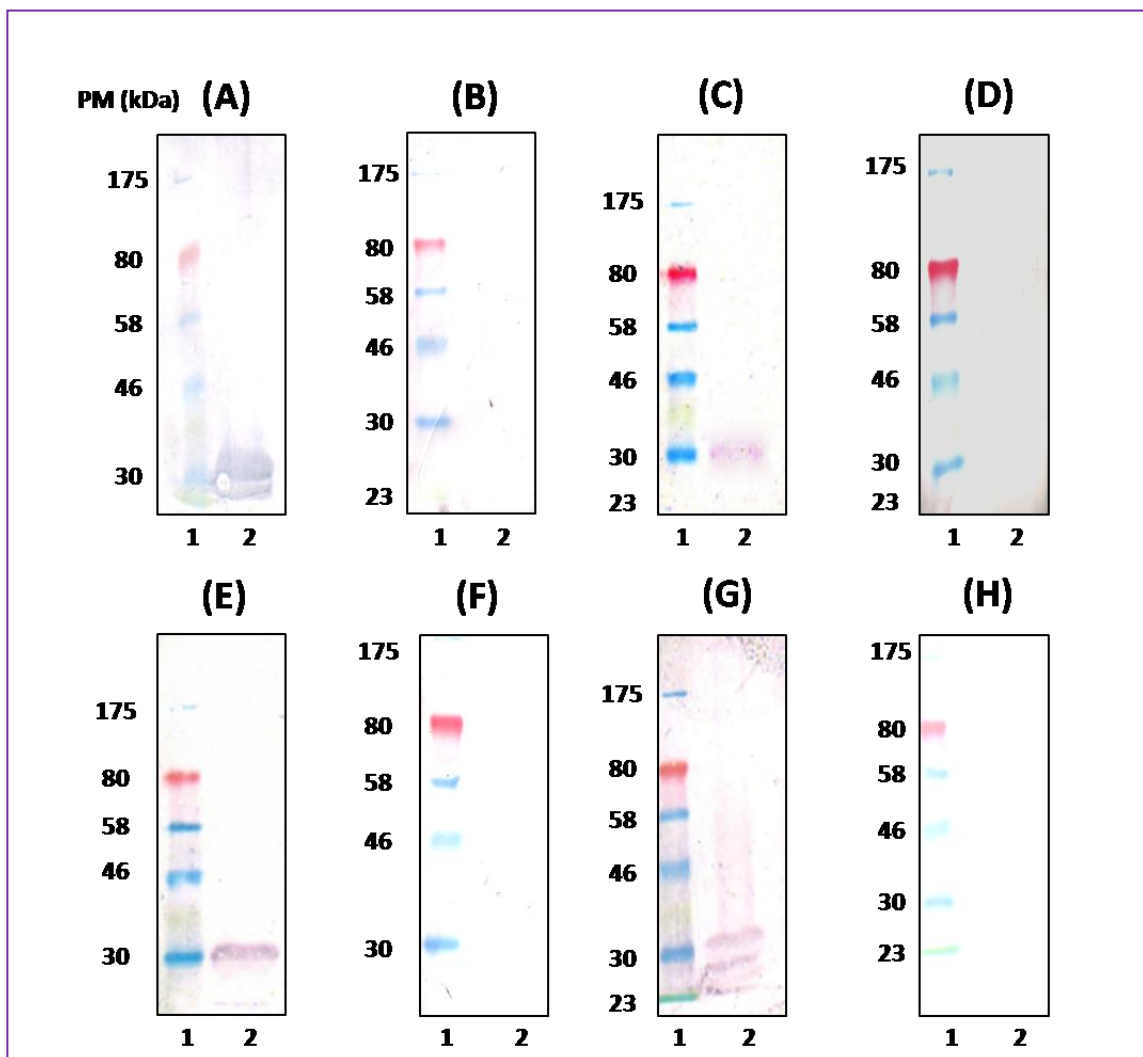


Figura 17: CfcRT, al igual que rHuCRT y rTcCRT, se une a las cadenas de C1q en IWB. Carril 1: estándar de PM preteñido, en todas las figuras. Carril 2 en A, C, E, y G: C1q humano, reaccionando respectivamente con SC, SH, HuCRT, TcCRT. Carril 2 en B,D,F y H: C1q reaccionando con PBS/leche 3% en ausencia de CRT (controles negativos).

4) Determinación del efecto inhibitor de la ruta clásica del sistema del complemento por saliva canina (Criterio funcional).

La activación de la ruta clásica se desencadena en este ensayo, por la unión de C1 proveniente del SNH, a inmunoglobulinas adsorbidas a la fase sólida. Esta unión genera un cambio conformacional en la región colagenosa de C1q que conduce a la activación de la serino proteasas C1r, la que se autoactiva, para luego activar a C1s. C1s activado digiere a C4, generando un fragmento C4a soluble, el cual se elimina en los lavados y un fragmento C4b que se une covalentemente a la fase sólida y es detectable con un anticuerpo de cabra anti C4 humano. Esta reacción es amplificada con un anticuerpo de conejo anti Inmunoglobulina de cabra conjugado a peroxidasa. Se eligió la dilución 1:320 del SNH, que generó un 70% de la activación de C4 en C4b (Figura 18), para ser utilizada en los ensayos siguientes de inhibición de la ruta clásica del complemento.

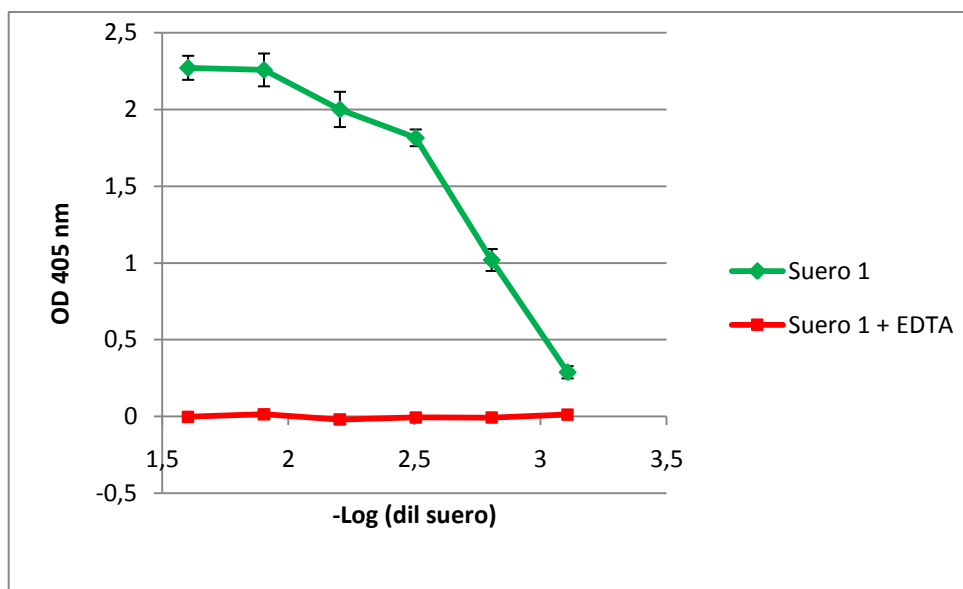


Figura 18: Titulación de la activación de C4 humano sérico por C1 unido a una fase sólida. La dilución 1:320 del SNH medió un 70% de depósito de C4b.

Para verificar la inhibición de la vía clásica del complemento humano se preincubó el SNH en buffer Veronal durante 30 min, con SC y SH, por separado. CRT de ambas muestras debiera unirse a C1q interfiriendo en la activación de C4. Esto se evidenció en un menor depósito de C4b (**Figura 19**). Como controles positivos de inhibición se utilizó EDTA (quelante de Ca^{+2} necesario para la activación de la ruta clásica), rTcCRT y rHuCRT. Como control negativo se usó BSA en las mismas concentraciones.

Las diferencias en las densidades ópticas generadas en las muestras de SC en comparación al

control negativo de inhibición (BSA) fueron estadísticamente significativas ($p < 0,001$) en ambas concentraciones utilizadas (ver anexo, tabla VI).

Al comparar las densidades ópticas generadas por SC versus las obtenidas con HuCRT, observamos diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,001$) en ambas concentraciones, evidenciando una mayor inhibición de la ruta clásica del sistema del complemento en las muestras de SC. Al compararla con TcCRT, la inhibición es mayor en el caso de SC en la concentración de $4,8 \mu\text{M}$, con diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,001$), pero en la concentración de $9,6 \mu\text{M}$ no existen diferencias estadísticamente significativas ($p > 0,05$) (ver anexo, tabla VI).

Al comparar SC con SH, con respecto a las densidades ópticas generadas, no se observan diferencias estadísticamente significativas ($p > 0,05$) (ver anexo, tabla VI).

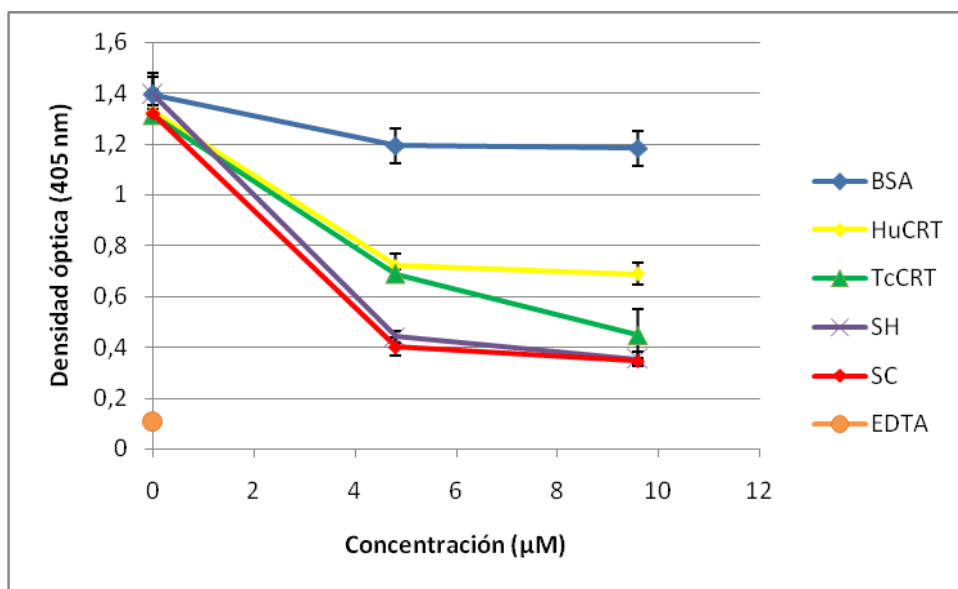


Figura 19: Inhibición de la ruta clásica del sistema del complemento mediada por SC. Se utilizó EDTA ($10 \mu\text{M}$), rTcCRT y rHuCRT en concentración de 0, $4,8$ y $9,6 \mu\text{M}$ como controles positivos de inhibición y BSA en las mismas concentraciones como control negativo de inhibición. Los resultados son representativos de 3 ensayos independientes y los datos mostrados corresponden al promedio de las observaciones en triplicado. Las barras representan desviaciones estándares. La concentración de CRT en SC y SH es solo estimativa y se calculó en base a la intensidad de banda obtenida en el IWB, en comparación con la banda obtenida para rHuCRT, infiriendo que existe aproximadamente un 1% de CRT en saliva.

DISCUSIÓN

En saliva se encuentra una serie de componentes que estimulan el proceso de cicatrización de la mucosa oral, entre ellos el factor de crecimiento epidérmico salival (Zelles *et al.*, 1995), el factor de crecimiento transformante β , el factor de crecimiento fibroblástico, factores de crecimiento tipo insulina, el factor de crecimiento nervioso y factores de la coagulación (Tibor *et al.*, 2007).

Dentro de las moléculas que favorecen la cicatrización de tejidos, se encuentra CRT, una proteína multifuncional, que actúa sobre el índice de aceleración y en la calidad de reparación tisular (Gold *et al.*, 2006); recluta la mayoría de las células implicadas en la reparación de la herida, estimula marcadamente la proliferación celular de queratinocitos, fibroblastos y células endoteliales vasculares, causando un aumento en la formación del tejido epitelial. También realiza profundamente la producción de proteínas extracelulares de la matriz, tales como colágeno y fibronectina, componentes críticos en el proceso de remodelación de la herida (Gold *et al.*, 2006).

En esta Memoria de Título se ha detectado CRT en saliva de caninos domésticos, utilizando criterios antigénicos y funcionales, contribuyendo, así, al conocimiento de nuevas localizaciones de esta proteína, no relacionadas al RE, en vertebrados, caninos en particular, donde podría representar una importante adaptación evolutiva. Para ello se propuso que CfCRT, en saliva canina, es reconocida por una variedad de anticuerpos heterólogos, comprobando su alta homología entre especies (criterio antigénico) y que debiera unirse a C1q y, en consecuencia, inhibir la ruta clásica de activación del complemento (criterios funcionales).

Para realizar este estudio, se debió estandarizar un método para obtener saliva canina, pues en la literatura no se ha descrito una técnica de fácil aplicación. El procedimiento elaborado, permitió recolectar la muestra en forma rápida y eficaz, sin generar, aparentemente, una mayor molestia en el animal, además de ser un método económico y fácilmente reproducible.

El criterio antigénico utilizó un ensayo de inmunoelectrotransferencia, donde anticuerpos policlonales, dirigidos contra MuCRT (**Fig. 10**), TcCRT (**Fig. 11**) y HuCRT (**Fig. 14**), además de anticuerpos heterólogos monoclonales contra MuCRT (**Fig. 6**) y HuCRT (**Fig.13**) reconocieron una proteína de peso molecular aparente de 55 kDa, en muestras de saliva de 10 caninos. Entonces, derivado de su

reconocimiento por cinco anticuerpos, generados contra CRT de dos especies mamíferas y de una protozoaria, esta banda corresponde antigénicamente a CRT canina (CfCRT), molécula chaperona de esta especie, presente en saliva. Este reconocimiento mediante reactividad cruzada, se podría explicar por la alta homología existente entre CfCRT con MuCRT (95%), así como también con HuCRT (96%) (**Figs. 8 y 15** respectivamente) y de un 41% con TcCRT (**Fig. 12**).

El anticuerpo monoclonal anti-MuCRT debe reconocer a la proteína en el PM de 60 kDa (especificación del fabricante), hecho que concuerda al reconocer a la proteína recombinante, no así en el caso de la proteína nativa de SC, SH y de extracto de células HEK-293 que mostraron un PM inferior, cercano a los 55 kDa (**Fig. 9**). Esta discrepancia entre pesos moleculares se explica, dado que, la proteína recombinante presenta una serie de modificaciones que la diferencia de la proteína nativa: ausencia de secuencia de retención en el retículo endoplásmico, presencia de amino ácidos adicionados por el vector de clonamiento (tanto en el extremo amino como carboxilo), ausencia de glicosilaciones y, presumiblemente, un plegamiento o estructura terciaria distinta a la proteína nativa.

El anticuerpo monoclonal de ratón anti TcCRT no reconoció a CRT presente en SC ni en SH, debido a que la concentración de CRT en 20 µg de proteína total es muy baja para generar respuesta por parte de este anticuerpo en dilución 1:500, o simplemente porque los epítomos que reconoce este anticuerpo no están presentes en CfCRT ni en HuCRT, provenientes de SC y SH, respectivamente.

HuCRT se une a la porción colagenosa de C1q, y a otros miembros de la familia de las colectinas, tales como MBL, proteína A del surfactante pulmonar, conglutinina bovina y la colectina 43 (Malhotra *et al.*, 1990). Así, CRT participa en la inhibición, C1q dependiente, de la actividad del complemento *in vitro*.

Por otra parte, se ha descrito que TcCRT, es translocada desde el RE a la zona de emergencia flagelar de tripomastigotes de *T. cruzi*, donde se une tanto a C1q como a MBL, de la ruta clásica y de las lectinas del sistema del complemento, respectivamente. Esta unión genera una inactivación de la ruta clásica en su etapa inicial, por inhibición de las serino proteasas respectivas, lo que se refleja finalmente en una depresión de todo el sistema, incluida la formación del complejo de ataque a membrana (Ferreira *et al.*, 2004b). Esta misma función se ha descrito recientemente para CRT de otro tripanosomátido, *Trypanosoma carassii*, parásito extracelular de gran importancia económica en peces. Esta CRT también se une a C1q inhibiendo la ruta clásica del sistema del complemento (Oladiran y Belosevic, 2009), de manera sorprendentemente similar a la descrita previamente para *T. cruzi* (Ferreira *et al.*, 2004b).

En ensayo de IWB, adaptado desde el trabajo de Oladiran y Belosevic (2009) se visualizó la unión CRT de SC y SH a C1q Humano, previamente sometido a electroforesis en geles de poliacrilamida al 10% (**Fig. 17**). Se propone que esta molécula es CfCRT de SC, por su capacidad de unir C1q y de ser reconocida, en ese contexto, por anticuerpos anti CRT.

Dado que HuCRT y TcCRT inactivan el complemento, al unirse a C1q, entonces, si CfCRT está presente en SC, este fluido debiera inactivar también el complemento, fenómeno atribuible, al menos en parte, a la presencia de CfCRT. En otras palabras, dado el efecto inhibitorio que CRT tiene sobre la ruta clásica del sistema del complemento, y dada la conservación funcional filogenética de la molécula chaperona, la presencia de CfCRT en SC debiera transmitir esa propiedad al espécimen. Este hecho fue comprobado al realizar un ensayo tipo ELISA donde SC inhibió la activación de C4, el primer paso esencial en la activación de la ruta clásica y de las lectinas del sistema del complemento. La inhibición de la activación de C4, dada por SC fue mayor a la generada por la proteína humana y parasitaria, ambas recombinantes (**Fig. 19**). Esto se podría explicar dado que en SC la forma nativa de la proteína, tiene mayor capacidad inhibitoria, en comparación a la proteína recombinante que porta los cambios estructurales mencionados anteriormente. Otra explicación a este hecho podría ser que en saliva canina existan otros componentes, aún no descritos, que inhiban la generación de C4b y que podrían actuar en forma sinérgica o aditiva con CfCRT, hecho que debe ser investigado en mayor detalle.

Las perspectivas de este trabajo serán clonar y expresar el gen de CfCRT, para luego definir su efecto pro cicatrizante en modelos experimentales *in vivo* e *in vitro*, siempre comparando con concentraciones equimolares de rHuCRT y de rTcCRT.

Aparte de su potencial efecto procicatrical, CfCRT debiera ser estudiado en otras funciones conocidas para CRT de otras especies, en particular comparar CfCRT, en términos equimolares, con HuCRT y TcCRT, en cuanto a sus propiedades antiangiogénicas, pues se sabe que el crecimiento de microcapilares dentro del tejido de granulación de la herida es esencial en la cicatrización de heridas. El dominio N-terminal de CRT (aa 1-80) posee actividad antiangiogénica, en particular en modelos tumorales (Yao *et al.*, 2002a; Jazowiecka-Rakus *et al.*, 2007). Esta capacidad antiangiogénica también se repite en TcCRT, con importantes efectos antitumorales, hechos reportados en el LIAM (López *et al.*, 2010). Concentraciones empleadas en estudios de angiogénesis tumoral no alteran la cicatrización de heridas (Lange-Asschenfeldt *et al.*, 2001). Por otra parte, algunos autores sugieren que las proteasas

relacionadas con la herida podrían adherirse a CRT y así liberar el dominio N-terminal, pero esas interrogantes, en lo que respecta a efectos angiogénicos de CRT en el proceso cicatrización de heridas, aún deben esclarecerse (Gold *et al*, 2009).

En síntesis, los resultados de esta Memoria de Título permiten proponer que en saliva canina existe una molécula que comparte propiedades antigénicas y funcionales con CRT de especies como la humana, murina y tripanosoma. Se trata, muy probablemente de calreticulina canina, CfCRT. La definición final de esta molécula emanará de futuros estudios de espectrometría de masa.

CONCLUSIONES

- CfCRT putativa presente en saliva canina es reconocida antigénicamente con anticuerpos monoclonales contra HuCRT y MuCRT y anticuerpos policlonales contra HuCRT, TcCRT y MuCRT. Su patrón de reconocimiento con anticuerpos muy similar al de CRT en saliva humana.
- Dado que la secuencia aminoacídica deducida del gen de CfCRT tiene un 96% de identidad aminoacídica con HuCRT, un 95% con MuCRT y un 41% con TcCRT, se confirma la alta conservación de esta molécula chaperona en distintas especies y explica el reconocimiento de CfCRT mediante reactividad cruzada con anticuerpos heterólogos.
- CfCRT putativa, presente en saliva canina se une a C1q humano en IWB, mostrando un patrón similar al de saliva humana, HuCRT y TcCRT.
- Saliva canina, al igual que saliva humana, inhibe fuertemente la ruta clásica del sistema del complemento, lo que es compatible con la presencia en ella de CfCRT.
- Finalmente, basado en los criterios antigénicos y funcionales anteriores, se propone que en saliva canina se expresa CRT.

BIBLIOGRAFÍA

- **AFSHAR, N.; BLACK, B. E.; PASCHAL, B. M.** 2005. Retrotranslocation of the chaperone calreticulin from the endoplasmic reticulum lumen to the cytosol. *Mol Cell Biol.* 25: 8844-8853.
- **AGUILAR, L.; RAMIREZ, G.; VALCK, C.; MOLINA, M. C.; ROJAS, A.; SCHWAEBLE, W.; FERREIRA, V.; FERREIRA, A.** 2005. F(ab')₂ antibody fragments against *Trypanosoma cruzi* calreticulin inhibits its interaction with the first component of human complement. *Biol Res.* 38:187-195.
- **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 calreticulin. *Am J Trop Med Hyg.* 63: 306-12.
- **ANDRIN, C.; PINKOSKI, M. J.; BURNS, K.; ATKINSON, E. A.; KRAHENBUHL, O.; HUDIG, D.; FRASER, S. A.; WINKLER, U.; TSCHOPP, J.; OPAS, M.** 1998. Interaction between a Ca²⁺-binding protein calreticulin and perforin, a component of the cytotoxic T-cell granules. *Biochemistry.* 37: 10386-10394.
- **AROSA, F. A.; DE JESUS, O.; PORTO, G.; CARMO, A. M.; DE SOUSA, M.** 1999. Calreticulin is expressed on the cell surface of activated human peripheral blood T lymphocytes in association with major histocompatibility complex class I molecules. *J Biol Chem.* 274: 16917-16922.
- **BAKSH, S.; MICHALAK, M.** 1991. Expression of calreticulin in *Escherichia coli* and identification of its Ca²⁺ binding domains. *J Biol Chem.* 266: 21458-21465.
- **BANDERAS, J. A.; GONZALEZ, M.** 1994. Saliva y Cavidad Bucal: Parte II, Proteínas Salivales: Funciones Biológicas en el Mantenimiento de la Homeostasis Bucal. *Práctica Odontológica.* (15) 7: 13-20.
- **BANDYOPADHYAY, B.; FAN, J.; GUAN, S.; LI, Y.; CHEN, M.; WOODLEY, D. T.; LI, W.** 2006. A "traffic control" role for TGFβ₃: orchestrating dermal and epidermal cell motility during wound healing. *J Cell Biol.* 172: 1093-1105.
- **BARDOW, A.; NYVAD, B.; NAUNTOFTE, B.** 2001. Relationships between medication intake, complaints of dry mouth, salivary flow rate and composition, and the rate of tooth demineralization in situ. *Arch Oral Biol.* 46: 413-23.

- **BERGERON, J. J.; BRENNER, M. B.; THOMAS, D. Y.; WILLIAMS, D. B.** 1994. Calnexin: a membrane-bound chaperone of the endoplasmic reticulum. *Trends Biochem Sci.* 19: 124-128.
- **BIGLER, L.; STRECKFUS, C.** 2004. Unique protein screening analysis of stimulated whole saliva from healthy individuals and breast cancer patients. *Preclínica.* 2: 52-56.
- **BOONSTRA, J.; RIJKEN, P.; HUMBEL, B.; CREMERS, F.; VERKLEIJ, A.; VAN BERGEN EN HENEGOUWEN, P.** 1995. The epidermal growth factor. *Cell Biol Int.* 19: 413-430.
- **BORISJUK, N.; SITAILO, L.; ADLER, K.; MALYSHEVA, L.; TEWES, A.; BORISJUK, L.; MANTEUFFEL, R.** 1998. Calreticulin expression in plant cells: developmental regulation, tissue specificity and intracellular distribution. *Planta.* 206: 504-514.
- **BRADFORD, M.M.** 1976. Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248-254.
- **BURNS, K.; DUGGAN, B.; ATKINSON, E. A.; FAMULSKI, K. S.; NEMER, M.; BLEACKLEY, R. C.; MICHALAK, M.** 1994. Modulation of gene expression by calreticulin binding to the glucocorticoid receptor. *Nature.* 367: 476-480.
- **CARPENTER, G.; COHEN, S.** 1990. Epidermal Growth Factor. *J Biol Chem.* 265(14):7709-12.
- **CHICHARRO, J. L.; LUCIA, A.; PEREZ, M.; VAQUERO, A. F.; URENA, R.** 1998. Saliva composition and exercise. *Sports Med.* 26: 17-27.
- **COPPOLINO, M. G.; DEDHAR, S.** 1999. Ligand-specific, transient interaction between integrins and calreticulin during cell adhesion to extracellular matrix proteins is dependent upon phosphorylation/dephosphorylation events. *Biochem J.* 340: 41-50.
- **DAY, P. J.; OWENS, S. R.; WESCHE, J.; OLSNES, S.; ROBERTS, L. M.; LORD, J. M.** 2001. An interaction between ricin and calreticulin that may have implications for toxin trafficking. *J Biol Chem.* 276: 7202-7208.
- **EGGLETON, P.; LIEU, T. S.; ZAPPI, E. G.; SASTRY, K.; COBURN, J.; ZANER, K. S.; SONTHEIMER, R. D.; CAPRA, J. D.; GHEBREHIWET, B.; TAUBER, A. I.** 1994. Calreticulin is released from activated neutrophils and binds to C1q and mannan-binding protein. *Clin Immunol Immunopathol.* 72: 405-409.

- **ELLIS, I. R.; BANYARD, J.; SCHOR, S. L.** 1999. Motogenic and biosynthetic response of adult skin fibroblasts to TGF-beta isoforms (-1, -2 and -3) determined by 'tissue response unit': role of cell density and substratum. *Cell Biol Int.* 23: 593-602.

- **ENGVALL E, PERLMANN P.** 1971. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Quantitative assay of immunoglobulin. *Immunochemistry.* 8: 871-874.

- **FERGUSON, M. W.; DUNCAN, J.; BOND, J.; BUSH, J.; DURANI, P.; SO, K.; TAYLOR, L.; CHANTREY, J.; MASON, T.; JAMES, G.** 2009. Prophylactic administration of avotermin for improvement of skin scarring: three double-blind, placebo-controlled, phase I/II studies. *Lancet.* 373: 1264-1274.

- **FERREIRA, V.; MOLINA, M. C.; VALCK, C.; ROJAS, A.; FERREIRA, A.** 2002. Parasite Calreticulin: Possible Roles in the Parasite /host Interface. *Inmunología.* 21: 156-168.

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

- **FERREIRA, V.; VALCK, C.; SANCHEZ, G.; GINGRAS, A.; TZIMA, S.; MOLINA, M. C.; SIM, R.; SCHWAEBLE, W.; FERREIRA, A.** 2004b. The classical activation pathway of the human complement system is specifically inhibited by calreticulin from *Trypanosoma cruzi*. *J Immunol.* 172: 3042-3050.

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

- **FUJITA, T.** 2002. Evolution of the lectin-complement pathway and its role in innate immunity. *Nat Rev Immunol.* 2(5): 346-353.

- **GAILIT, J.; CLARK, R. A.** 1994. Wound repair in the context of extracellular matrix. *Curr Opin Cell Biol.* 6: 717-725.

- **GARDAI, S. J.; MCPHILLIPS, K. A.; FRASCH, S. C.; JANSSEN, W. J.; STAREFELDT, A.; MURPHY-ULLRICH, J. E.; BRATTON, D. L.; OLDENBORG, P. A.; MICHALAK, M.; HENSON, P. M.** 2005. Cell-surface calreticulin initiates clearance of viable or apoptotic cells through trans-activation of LRP on the phagocyte. *Cell.* 123: 321-334.

- **GOICOECHEA, S.; ORR, A. W.; PALLERO, M. A.; EGGLETON, P.; MURPHY-ULLRICH, J. E.** 2000. Thrombospondin mediates focal adhesion disassembly through interactions with cell surface calreticulin. *J Biol Chem.* 275: 36358-36368.

- **GOLD, L.; RAHMAN, M.; BLECHMAN, K.; GREIVES, M.; CHURGIN, S.; MICHAELS, J.; CALLAGHAN, M.; CARDWELL, N.; POLLINS, A.; MICHALAK, M.; SIEBERT, J.; LEVINE, J.; GURTNER, G.; NANNEY, L.; GALIANO, R.; CADACIO, L.** 2006. Overview of the role for calreticulin in the enhancement of wound healing through multiple biological effects. *J. Investig. Dermatol. Symp. Proc.* 11(1): 57-65.

- **GOLD, L. I.; EGGLETON, P.; SWEETWYNE, M. T.; VAN DUYN, L. B.; GREIVES, M. R.; NAYLOR, S. M.; MICHALAK, M.; MURPHY-ULLRICH, J. E.** 2010. Calreticulin: non-endoplasmic reticulum functions in physiology and disease. *FASEB J.* 24: 665-683.

- **GRIGORIEV, I. V.; NIKOLAEVA, L. V.; ARTAMONOV, I. D.** 2003. Protein content of human saliva in various psycho-emotional states. *Biochemistry (Mosc).* 68: 405-406.

- **GUO, L.; NAKAMURA, K.; LYNCH, J.; OPAS, M.; OLSON, E. N.; AGELLON, L. B.; MICHALAK, M.** 2002. Cardiac-specific expression of calcineurin reverses embryonic lethality in calreticulin-deficient mouse. *J Biol Chem.* 277: 50776-50779.

- **HOLASKA, J. M.; BLACK, B. E.; LOVE, D. C.; HANOVER, J. A.; LESZYK, J.; PASCHAL, B. M.** 2001. Calreticulin is a receptor for nuclear export. *J Cell Biol.* 152: 127-140.

- **HUGHES-JONES, N.C.** 1986. The classical pathway. In *Immunobiology of the Complement System* (ed. by G. D. Ross). Academic Press, London. 21.

- **HUMPHREY, S. P.; WILLIAMSON, R. T.** 2001. A review of saliva: normal composition, flow, and function. *J Prosthet Dent.* 85: 162-169.

- **INO, M.; USHIRO, K.; INO, C.; YAMASHITA, T.; KUMAZAWA, T.** 1993. Kinetics of epidermal growth factor in saliva. *Acta Otolaryngol Suppl.* 500: 126-130.

- **JAWORSKI, D. C.; SIMMEN, F. A.; LAMOREAUX, W.; COONS, L. B.; MULLER, M. T.; NEEDHAM, G. R.** 1995. A secreted calreticulin protein in Ixodid tick (*Amblyomma americanum*) saliva. *J Insect Physiol.* 41:369-375.

- **JAWORSKI, D. C.; HIGGINS, J. A.; RADULOVIC, S.; VAUGHAN, J. A.; AZAD, A. F.** 1996. Presence of calreticulin in vector fleas (Siphonaptera). *J Med Entomol.* 33: 482-489.

- **JAZOWIECKA-RAKUS, J.; JAROSZ, M.; KOZLOWSKA, D.; SOCHANIK, A.; SZALA, S.** 2007. Combination of vasostatin and cyclophosphamide in the therapy of murine melanoma tumors. *Acta Biochim Pol.* 54: 125-133.

- **KASPER, G.; BROWN, A.; EBERL, M.; VALLAR, L.; KIEFFER, N.; BERRY, C.; GIRDWOOD, K.; EGGLETON, P.; QUINNELL, R.; PRITCHARD, D. I.** 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.

- **KAUFMAN, E.; LAMSTER, I. B.** 2002. The diagnostic applications of saliva--a review. *Crit Rev Oral Biol Med.* 13: 197-212.

- **LAEMMLI UK.** 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature / London.* 227: 680-685.

- **LANGE-ASSCHENFELDT, B.; VELASCO, P.; STREIT, M.; HAWIGHORST, T.; PIKE, S. E.; TOSATO, G.; DETMAR, M.** 2001. The angiogenesis inhibitor vasostatin does not impair wound healing at tumor-inhibiting doses. *J Invest Dermatol.* 117: 1036-1041.

- **LEONARD, C. M.; FULD, H. M.; FRENZ, D. A.; DOWNIE, S. A.; MASSAGUE, J.; NEWMAN, S. A.** 1991. Role of transforming growth factor-beta in chondrogenic pattern formation in the embryonic limb: stimulation of mesenchymal condensation and fibronectin gene expression by exogenous TGF-beta and evidence for endogenous TGF-beta-like activity. *Dev Biol.* 145: 99-109.

- **LI, W. Y.; HUANG, E. Y.; DUDAS, M.; KAARTINEN, V.; WARBURTON, D.; TUAN, T. L.** 2006. Transforming growth factor-beta3 affects plasminogen activator inhibitor-1 expression in fetal mice and modulates fibroblast-mediated collagen gel contraction. *Wound Repair Regen.* 14: 516-525.

- **LLENA-PUY, C.** 2006. The role of saliva in maintaining oral health and as an aid to diagnosis. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal.* 11: E449-455.

- **LÓPEZ, N.C.; VALCK, C.; RAMÍREZ, G.; RODRÍGUEZ, M.; RIBEIRO, C.; ORELLANA, J.; MALDONADO, I.; ALBINI, A.; ANACONA, D.; LEMUS, D.; AGUILAR, L.; SCHWAEBLE, W.; FERREIRA, A.** 2010. Antiangiogenic and antitumor effects of *Trypanosoma cruzi* Calreticulin. *PLoS Negl Trop Dis.* 4:e730.

- **MALHOTRA, R.; THIEL, S.; REID, K. B.; SIM, R. B.** 1990. Human leukocyte C1q receptor binds other soluble proteins with collagen domains. *J Exp Med.* 172: 955-959.

- **MATSUOKA, K.; SETA, K.; YAMAKAWA, Y.; OKUYAMA, T.; SHINODA, T.; ISOBE, T.** 1994. Covalent structure of bovine brain calreticulin. *Biochem J.* 298 (Pt 2): 435-442.
- **MESAELI, N.; NAKAMURA, K.; ZVARITCH, E.; DICKIE, P.; DZIAK, E.; KRAUSE, K. H.; OPAS, M.; MACLENNAN, D. H.; MICHALAK, M.** 1999. Calreticulin is essential for cardiac development. *J Cell Biol.* 144: 857-868.
- **MICHALAK, M.; BAKSH, S.; OPAS, M.** 1991. Identification and immunolocalization of calreticulin in pancreatic cells: no evidence for 'calciosomes'. *Exp. Cell Res.* 197: 91–99.
- **MICHALAK, M.; MILNER, R. E.; BURNS, K.; OPAS, M.** 1992. Calreticulin. *Biochem J.* 285 (Pt 3): 681-692.
- **MICHALAK, M.; CORBETT, E. F.; MESAELI, N.; NAKAMURA, K.; OPAS, M.** 1999. Calreticulin: one protein, one gene, many functions. *Biochem J.* 344 (Pt 2): 281-292.
- **MICHALAK, M.; GROENENDYK, J.; SZABO, E.; GOLD, L. I.; OPAS, M.** 2009. Calreticulin, a multi-process calcium-buffering chaperone of the endoplasmic reticulum. *Biochem J.* 417: 651-666.
- **NAKAMURA, M.; MORIYA, M.; BABA, T.; MICHIKAWA, Y.; YAMANOBÉ, T.; ARAI, K.; OKINAGA, S.; KOBAYASHI, T.** 1993. An endoplasmic reticulum protein, calreticulin, is transported into the acrosome of rat sperm. *Exp Cell Res.* 205: 101-110.
- **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: 157-160.
- **NANNEY, L. B.; WOODRELL, C. D.; GREIVES, M. R.; CARDWELL, N. L.; POLLINS, A. C.; BANCROFT, T. A.; CHESSER, A.; MICHALAK, M.; RAHMAN, M.; SIEBERT, J. W.; GOLD, L. I.** 2008. Calreticulin enhances porcine wound repair by diverse biological effects. *Am J Pathol.* 173: 610-630.
- **NAUNTOFTE, B.; TENEVUO, J.O.; LAGERLÖF, F.** 2003. Secretion and composition of saliva. In: Fejerskov O and Kidd E, eds. *Dental Caries. The disease and its clinical management.* Oxford. Blackwell Munksgard. 7-29.

- **OBEID, M.; TESNIERE, A.; GHIRINGHELLI, F.; FIMIA, G. M.; APETOH, L.; PERFETTINI, J. L.; CASTEDO, M.; MIGNOT, G.; PANARETAKIS, T.; CASARES, N.** 2007. Calreticulin exposure dictates the immunogenicity of cancer cell death. *Nat Med.* 13: 54-61.

- **OLADIRAN, A.; BELOSEVIC, M.** 2009. Trypanosoma carassii calreticulin binds host complement component C1q and inhibits classical complement pathway-mediated lysis. *Dev Comp Immunol.* 34(4):396-405.

- **ORR, A. W.; ELZIE, C. A.; KUCIK, D. F.; MURPHY-ULLRICH, J. E.** 2003. Thrombospondin signaling through the calreticulin/LDL receptor-related protein co-complex stimulates random and directed cell migration. *J Cell Sci.* 116: 2917-2927.

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

- **PALLERO, M. A.; ELZIE, C. A.; CHEN, J.; MOSHER, D. F.; MURPHY-ULLRICH, J. E.** 2008. Thrombospondin 1 binding to calreticulin-LRP1 signals resistance to anoikis. *FASEB J.* 22: 3968-3979.

- **PIKE, S. E.; YAO, L.; JONES, K. D.; CHERNEY, B.; APPELLA, E.; SAKAGUCHI, K.; NAKHASI, H.; TERUYA-FELDSTEIN, J.; WIRTH, P.; GUPTA, G.; TOSATO, G.** 1998. Vasostatin, a calreticulin fragment, inhibits angiogenesis and suppresses tumor growth. *J Exp Med.* 188: 2349-2356.

- **RAMÍREZ, G.; VALCK, C; MOLINA, M.C.; RIBEIRO, C.H.; LÓPEZ, N.; SÁNCHEZ, G.; FERREIRA, V.P.; BILLETTA, R.; AGUILAR, L.; MALDONADO, I.; CATTÁN, P.; SCHWAEBLE, W.; FERREIRA, A.** 2010. Trypanosoma cruzi Calreticulin: a novel virulence factor that binds complement C1 on the parasite surface and promotes infectivity. *Immunobiology.* (In Press).

- **RIBEIRO, C. H.; LOPEZ, N. C.; RAMIREZ, G. A.; VALCK, C. E.; MOLINA, M. C.; AGUILAR, L.; RODRIGUEZ, M.; MALDONADO, I.; MARTINEZ, R.; GONZALEZ, C.; TRONCOSO, R.; LAVANDERO, S.; GINGRAS, A. R.; SCHWAEBLE, W.; FERREIRA, A.** 2009. Trypanosoma cruzi calreticulin: A possible role in Chagas disease autoimmunity. *Mol Immunol.* 46: 1092-1099.

- **SEZESTAKOWSKA, D.; SZABO, E.; EGGLETON, P.; OPAS, M.; YOUNG, P.** 2006. 7th International Workshop on Calreticulin, Niagara Falls, Canada: the complexities of calreticulin from folding to disease prevention and therapeutic application. *Calcium Binding Proteins.* 1: 135–139.

- **SHARP, F.; SMITH, S.; THOMPSON, M.; HAMMEL, H. T.** 1969. Thermoregulatory salivation proportional to hypothalamic temperature above threshold in the dog. *Life Sci. Oxford.* 8: 1069-1076.

- **SCHOR, S. L.; ELLIS, I. R.; HARADA, K.; MOTEGI, K.; ANDERSON, A. R.; CHAPLAIN, M. A.; KEATCH, R. P.; SCHOR, A. M.** 2006. A novel 'sandwich' assay for quantifying chemo-regulated cell migration within 3-dimensional matrices: wound healing cytokines exhibit distinct motogenic activities compared to the transmembrane assay. *Cell Motil Cytoskeleton*. 63: 287-300.

- **SINGER, A. J.; CLARK, R. A.** 1999. Cutaneous wound healing. *N Engl J Med*. 341: 738-746.

- **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: 3581-3586.

- **SUEYOSHI, T.; MCMULLEN, B. A.; MARNELL, L. L.; DU CLOS, T. W.; KISIEL, W.** 1991. A new procedure for the separation of protein Z, prothrombin fragment 1.2 and calreticulin from human plasma. *Thromb Res*. 63: 569-575.

- **TENOVUO, J.** 1997. Salivary parameters of relevance for assessing caries activity in individuals and populations. *Community Dent Oral Epidemiol*. 25: 82-86.

- **TESNIERE, A.; APETOH, L.; GHIRINGHELLI, F.; JOZA, N.; PANARETAKIS, T.; KEPP, O.; SCHLEMMER, F.; ZITVOGEL, L.; KROEMER, G.** 2008. Immunogenic cancer cell death: a key-lock paradigm. *Curr Opin Immunol*. 20: 504-511.

- **TIBOR, F.; FEJERDY, P.; CSERMELY, P.** 2003. Hsp70 is present in human saliva. *Med. Sci. Monitor*. 9: 62-65.

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

- **VASSILAKOS, A.; MICHALAK, M.; LEHRMAN, M. A.; WILLIAMS, D. B.** 1998. Oligosaccharide binding characteristics of the molecular chaperones calnexin and calreticulin. *Biochemistry*. 37: 3480-3490.

- **WILMARTH, P. A.; RIVIERE, M. A.; RUSTVOLD, D. L.; LAUTEN, J. D.; MADDEN, T. E.; DAVID, L. L.** 2004. Two-dimensional liquid chromatography study of the human whole saliva proteome. *J Proteome Res*. 3: 1017-1023.

- **WU, L.; SIDDIQUI, A.; MORRIS, D. E.; COX, D. A.; ROTH, S. I.; MUSTOE, T. A.** 1997. Transforming growth factor beta 3 (TGF beta 3) accelerates wound healing without alteration of scar prominence. Histologic and competitive reverse-transcription-polymerase chain reaction studies. *Arch Surg.* 132: 753-760.

- **WU, M.; MASSAELI, H.; DURSTON, M.; MESAELI, N.** 2007. Differential expression and activity of matrix metalloproteinase-2 and -9 in the calreticulin deficient cells. *Matrix Biol.* 26: 463-472.

- **YAO, L.; PIKE, S. E.; PITTALUGA, S.; CHERNEY, B.; GUPTA, G.; JAFFE, E. S.; TOSATO, G.** 2002a. Anti-tumor activities of the angiogenesis inhibitors interferon-inducible protein-10 and the calreticulin fragment vasostatin. *Cancer Immunol Immunother.* 51: 358-366.

- **YAO, L.; PIKE, S. E.; TOSATO, G.** 2002b. Laminin binding to the calreticulin fragment vasostatin regulates endothelial cell function. *J Leukoc Biol.* 71: 47-53.

- **YAO, Y.; BERG, E. A.; COSTELLO, C. E.; TROXLER, R. F.; OPPENHEIM, F. G.** 2003. Identification of protein components in human acquired enamel pellicle and whole saliva using novel proteomics approaches. *J Biol Chem.* 278: 5300-5308.

- **ZELLES, T.; PURUSHOTHAM, K. R.; MACAULEY, S. P.; OXFORD, G. E.; HUMPHREYS-BEHER, M. G.** 1995. Saliva and growth factors: the fountain of youth resides in us all. *J Dent Res.* 74: 1826-1832.

- **ZHU, Q.; ZELINKA, P.; WHITE, T.; TANZER, M. L.** 1997. Calreticulin-integrin bidirectional signaling complex. *Biochem Biophys Res Commun.* 232: 354-358.

- **ZUBER, C.; SPIRO, M. J.; GUHL, B.; SPIRO, R. G.; ROTH, J.** 2000. Golgi apparatus immunolocalization of endomannosidase suggests post-endoplasmic reticulum glucose trimming: implications for quality control. *Mol Biol Cell.* 11: 4227-4240.

ANEXOS

ANEXO 1



Universidad de Chile.
Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias.
Comité de Bioética.

Santiago, 12 de mayo de 2009

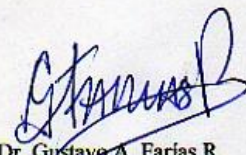
FUNDAMENTACIÓN DE LA CERTIFICACIÓN ÉTICA INSTITUCIONAL.

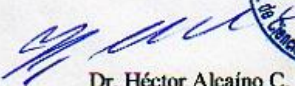
El comité de Bioética de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile, se reunió con fecha 5 de mayo 2009 para revisar el Proyecto de Memoria de Título, de la alumna Responsable: **Srta. Maria F. Coddou S.**, denominada "**Búsqueda de Calreticulina en saliva de caninos domésticos (*Canis familiaris*)**".


Este proyecto contempla la utilización de 10 perros sanos adultos sanos, puesto que no existe otro método de sustitución para este modelo experimental. Los animales seleccionados son los adecuados en su número mínimo (10), para lograr obtener resultados científicamente válidos y cumplir con los objetivos planteados satisfactoriamente. Por otra parte, en los ensayos experimentales se plantean y describen procedimientos en la obtención de saliva que no revisten sufrimiento animal y que no afectan el bienestar de los individuos.

De acuerdo a lo expuesto por los investigadores, esta comisión da fe que se realizarán todos los procedimientos de manejo, de acuerdo a los protocolos necesarios para evitar el estrés, dolor o sufrimiento animal, lo cual cumple con los parámetros aceptados por el comité de bioética Médico Veterinario.

Este Comité estima que el proyecto que se propone, se ajusta convenientemente a los Marcos Normativos en Ética de la Investigación Científica con Seres Vivos, refrendados en el 2º Taller de Bioética de CONICYT, y que no contiene elementos que pudieran transgredir las normas bioéticas vigentes en nuestra institución.


Dr. Gustavo A. Farias R.
Presidente
Comisión de Bioética Animal


Dr. Héctor Alcaíno C.
Decano



ANEXO 2

El Sistema del Complemento: Visión Panorámica y Resumida

El sistema del complemento de los mamíferos es un brazo principal efector de inmunidad innata y adaptativa, presente desde agnatos hasta mamíferos superiores. Está provisto de al menos tres módulos macromoleculares (C1, MBL y Ficolinas) que reconocen una amplia variedad de patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs ó "señales de peligro"). Dependiendo del módulo de reconocimiento involucrado, se activará la ruta clásica (C1) o la de las lectinas (MBL ó Ficolinas). El sistema también puede activarse mediante una ruta alterna, independientemente de los módulos principales, si se detecta membranas biológicas carentes de ácido siálico, como es frecuente en algunos patógenos. Derivado de esta activación se desencadena una cascada de reacciones proteolíticas y de interacciones moleculares covalentes y no covalentes, con generación de una variedad de péptidos y complejos macromoleculares heteropoliméricos, que median funciones proinflamatorias (C3a, C4a, C5a), opsonizantes (C3b, C4b), destructoras de membranas biológicas (C5a-C9) y coestimuladores de respuestas inmunes (C3d, C4d), entre otras. Dada su activación en cascada proteolítica amplificadora irreversible, el sistema es meticulosamente regulado en diversas etapas del proceso de activación, en todas sus rutas. Más recientemente, el complemento ha sido descrito como un importante modulador de crecimiento de tejido neuronal y como mediador de potentes respuestas antitumorales. Más aún, el sistema es un eficiente solubilizador de complejos inmunes. La falla del sistema, en cualquiera de sus componentes, procesos de activación y de regulación, conduce a una variedad de patologías, de pronóstico complejo.

La vía clásica es una cascada de reacciones compuesta por cinco moléculas presentes en el plasma en forma inactiva: C1, C2, C3, C4 y C5. C1 está constituida por C1q, al cual se unen las serino-proteasas C1r y C1s, las que al activarse median la proteólisis de C2 y C4, generando fragmentos mayores con actividad catalítica (b) y menores (a). C4b se une covalentemente a proteínas próximas a la señal de peligro, actuando como opsonina o constituyendo el fundamento sobre el cual se ubicará C2b, generando así el complejo C2bC4b (C3 convertasa de la vía clásica). Ésta activará a C3 en dos fragmentos, C3a que es liberado a fase fluida y C3b que se une al complejo C2bC4b formando la C5 convertasa de la vía clásica (C4b,2b,3b), la que activa a C5, generando C5a y C5b. Este último se une a la membrana del antígeno acompañado de C6, C7, C8 y C9, generando así un complejo anfifílico que constituye poros en la membrana celular, lo que conduce a lisis (Hughes-Jones, 1986). El conjunto de proteínas que forman el poro se conoce como complejo de ataque a membranas, y en su generación convergen las tres vías de activación del sistema del complemento (ver **Figura 20**). Además de su rol en la inmunidad innata, actuando directamente sobre microorganismos, el sistema es importante en el normal funcionamiento del sistema inmune adaptativo, contribuyendo a la presentación de antígenos que hace mucho más eficiente a la respuesta humoral.

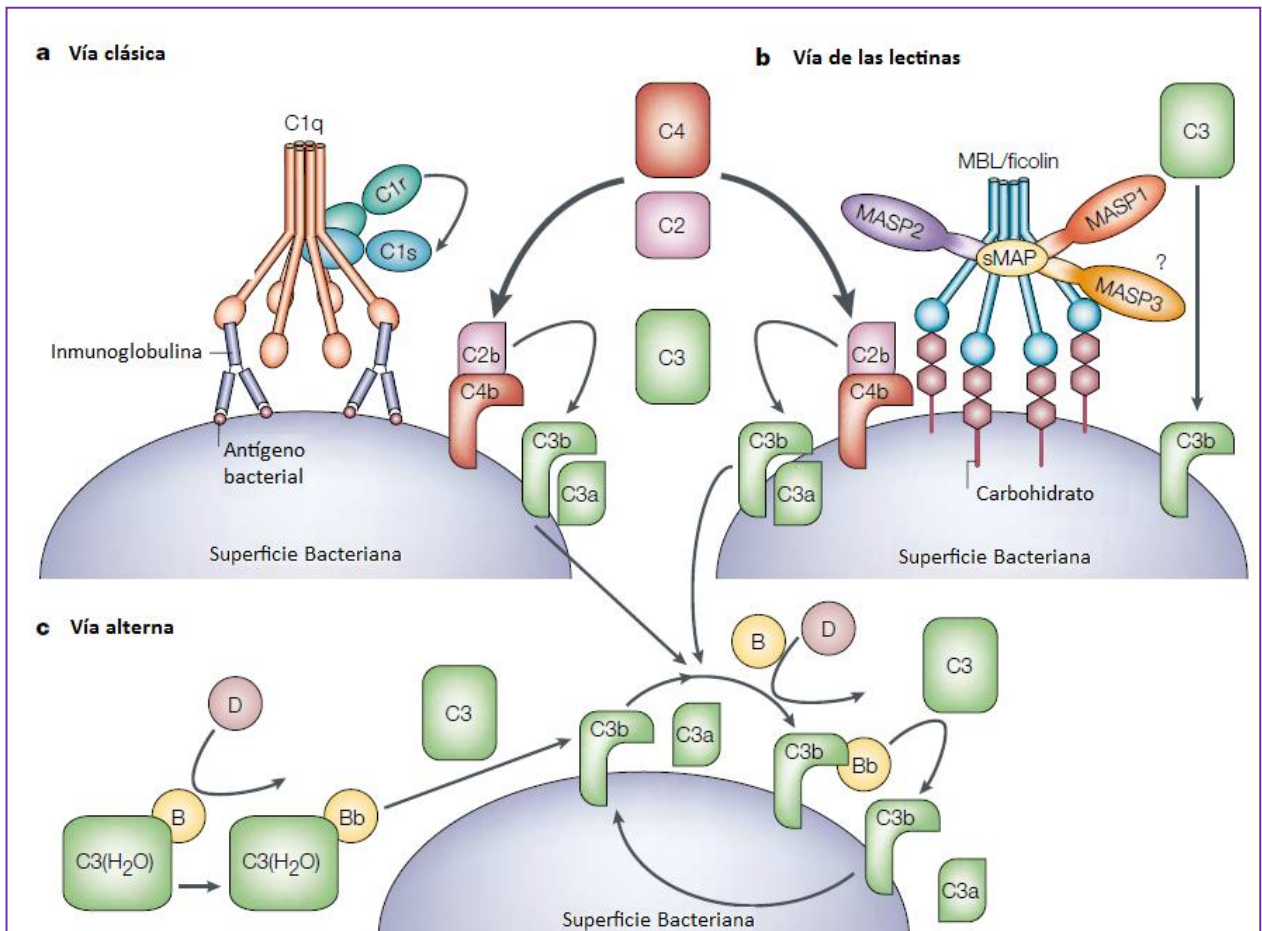


Figura 20: Activación de la vía clásica, vía de las lectinas y vía alterna del sistema del complemento. (a) La vía clásica se inicia por la unión del complejo C1 a anticuerpos que se unen a los antígenos en la superficie de las bacterias. El complejo C1 consta de C1q y dos moléculas de C1r y C1s. La unión del subcomponente C1q reconocida por la porción Fc de las inmunoglobulinas resulta en la auto activación de la serino proteasa C1r. Luego C1r digiere y activa C1s, que se traduce en la activación del complejo C1 de la activación del complemento a través de la digestión de C4 y C2 para formar un complejo enzima C4bC2a. C4bC2a actúa como una convertasa C3 y digiere a C3, que se traduce en productos que se unen y causan la destrucción de las bacterias invasoras. (b) La vía de las lectinas es iniciada por la unión de MBL o ficolina (asociados con las serino proteasas MASP1, MASP2 y MASP3) a una serie de grupos de hidratos de carbono en la superficie de la célula bacteriana. Al igual que C1s, MASP2 es responsable de la activación de C4 y C2, que conduce a la generación de la misma convertasa C3 (C4bC2a) como en la vía clásica. MASP1 es capaz de digerir C3 directamente. (c) La vía alternativa es iniciada por la activación de grado bajo de C3 por C3 hidrolizadas (C3 (H₂O)) y factor activado B (Bb). El C3b activado se une al factor B (B), que es digerido por Bb por el factor D (D) para formar la vía alternativa C3 convertasa, C3bBb. Una vez que C3b se une a la superficie de la célula, el loop de amplificación compuesto por los componentes de la vía alternativa se activa, y las enzimas C3 convertasas digieren muchas moléculas de C3 a C3b, que se unen covalentemente alrededor del sitio de activación del complemento. Adaptado desde Fujita, 2002.

ANEXO 3

Tabla VI: Resultados análisis de varianza del ensayo de inhibición de la ruta clásica del sistema del complemento.

Concentración (μM)	BSA (DO)	HuCRT (DO)	P
0	1.393	1.326	> 0.05
4,8	1.192	0.72	< 0.001
9,6	1.182	0.6883	< 0.001

Concentración (μM)	BSA (DO)	SH (DO)	P
0	1.393	1.393	> 0.05
4,8	1.192	0.4413	< 0.001
9,6	1.182	0.3533	< 0.001

Concentración (μM)	BSA (DO)	TcCRT (DO)	P
0	1.393	1.311	> 0.05
4,8	1.192	0.6867	< 0.001
9,6	1.182	0.4467	< 0.001

Concentración (μM)	BSA (DO)	SC (DO)	P
0	1.393	1.319	> 0.05
4,8	1.192	0.402	< 0.001
9,6	1.182	0.346	< 0.001

Concentración (μM)	HuCRT (DO)	TcCRT (DO)	P
0	1.326	1.311	> 0.05
4,8	0.72	0.6867	> 0.05
9,6	0.6883	0.4467	< 0.001

Concentración (μM)	HuCRT (DO)	SH (DO)	P
0	1.326	1.393	> 0.05
4,8	0.72	0.4413	< 0.001
9,6	0.6883	0.3533	< 0.001

Concentración (μM)	HuCRT (DO)	SC (DO)	P
0	1.326	1.319	> 0.05
4,8	0.72	0.402	< 0.001
9,6	0.6883	0.346	< 0.001

Concentración (μM)	TcCRT (DO)	SH (DO)	P
0	1.311	1.393	> 0.05
4,8	0.6867	0.4413	< 0.001
9,6	0.4467	0.3533	> 0.05

Concentración (μM)	TcCRT (DO)	SC (DO)	P
0	1.311	1.319	> 0.05
4,8	0.6867	0.402	< 0.001
9,6	0.4467	0.346	> 0.05

Concentración (μM)	SH (DO)	SC (DO)	P
0	1.393	1.319	> 0.05
4,8	0.4413	0.402	> 0.05
9,6	0.3533	0.346	> 0.05