



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



Rol de la Sobreexpresión de Calreticulina de *Trypanosoma cruzi* en la
Infectividad Parasitaria Mediada por la Interacción de Calreticulina de
Trypanosoma cruzi y C1q

VANESA DENISE NIETO MUÑOZ

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

PROFESOR GUÍA: GALIA RAMIREZ TOLOZA

SANTIAGO, CHILE
2015



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



Rol de la Sobreexpresión de Calreticulina de *Trypanosoma cruzi* en la
Infectividad Parasitaria Mediada por la Interacción de Calreticulina de
Trypanosoma cruzi y C1q

VANESA DENISE NIETO MUÑOZ

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

NOTA FINAL:

FIRMA

PROFESOR GUÍA : GALIA RAMIREZ

PROFESOR CORRECTOR: CLAUDIO ZÚÑIGA

PROFESOR CORRECTOR: ULISES VERGARA

SANTIAGO, CHILE
2015

MEMORIA DE TÍTULO

“Rol de la Sobreexpresión de Calreticulina de *Trypanosoma cruzi* en la Infectividad Parasitaria Mediada por la Interacción de Calreticulina de *Trypanosoma cruzi* y C1q”

"Role of *Trypanosoma cruzi* Calreticulin Overexpression on the Parasite Infectivity Mediated by the *Trypanosoma cruzi* Calreticulin and C1q Interaction "

Vanesa Denise Nieto Muñoz*

*Departamento de Medicina Preventiva Animal, Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias, Universidad de Chile, Santiago, Chile.

Resumen

Calreticulina de *Trypanosoma cruzi*, (TcCRT) es una proteína presente en el retículo endoplásmico (RE) y traslocada desde este organelo al área de emergencia flagelar, donde captura al componente C1q del sistema del complemento (SC), en una estrategia similar a la utilizada por las células apoptóticas. En consecuencia, la interacción TcCRT/C1q, además de inhibir la activación de la vía clásica del SC, promueve infectividad. Esta Memoria de Título propone estudiar el rol de la sobreexpresión de TcCRT en la infectividad parasitaria mediada por la interacción TcCRT/C1q. Para esto utilizamos una línea parasitaria que sobreexpresa calreticulina (TcCRT+) en un 13% y un clon nativo (*wild type*, wt), derivados de la cepa Tulahuén de *T. cruzi*. Nuestros resultados mostraron que tripomastigotes pretratados con C1q aumentan la infectividad en células VERO, en ambas variantes. Por otro lado, tripomastigotes pretratados con C1q y fragmentos F(ab')₂ de inmunoglobulinas anti-TcCRT que carecen de la porción Fc, capaces de inhibir esta interacción, interfieren significativamente con la infectividad dependiente de C1q, reduciendo la internalización de parásitos en células VERO para ambas variantes. Sin embargo, no se evidenció diferencias en cuanto a infección celular entre los tripomastigotes TcCRT+ y wt, por lo cual se concluye que un 13% de sobreexpresión de TcCRT no producen mayor infectividad. Es probable, que esta sobreexpresión no se exprese en la superficie parasitaria y por lo tanto, no participe en el proceso infeccioso. Por otra parte, TcCRT es un factor de virulencia sobre la superficie celular, pero probablemente asociada a una gran cantidad de proteínas participando en este complejo proceso.

Palabras claves: *Trypanosoma cruzi*, tripomastigotes, calreticulina de *T. cruzi* (TcCRT), C1q, infectividad.

Abstract

Trypanosoma cruzi Calreticulin (TcCRT) is a multifunctional protein present mainly in the endoplasmic reticulum (ER) and translocated from the RE to the flagellar emergency area where capture C1q, the first component of the complement system, in a similar manner to the strategy used by apoptotic cells. Consequently, the TcCRT/C1q interaction inhibits the activation of the classical pathway of the complement system and promotes infectivity. In this study, we proposed to investigate whether TcCRT overexpression increases the parasite infectivity mediated by the TcCRT/C1q interaction. Thus, we used a parasitic clonal line overexpressing a 13% of calreticulin (TcCRT+) and clones belonging to the native variant (wild type, wt), both derived from Tulahuén strain of *T. cruzi*. Our results show that, both tripomastigotes, TcCRT+ and wt, pretreated with C1q increased infectivity in a VERO cell line. Furthermore, trypanomastigotes pretreated with C1q and anti-TcCRT immunoglobulin fragments F(ab')₂, lacking the Fc region, capable of inhibiting this interaction significantly interfere with C1q-mediated infectivity and therefore, reduce the parasites internalization in VERO cells in both variants. However, no differences were detected between wild type and TcCRT+ trypanomastigotes overexpressing TcCRT in 13%. This TcCRT increasing does not produce higher infectivity. It is likely that this enhanced expression is not expressed on the parasite surface and hence not involved in the infective process. Moreover, TcCRT is a virulence factor on the parasite surface; however, there are many different proteins involved in this complex process.

Keywords: *Trypanosoma cruzi*, trypanomastigotes, calreticulin *T. cruzi* (TcCRT), C1q, infectivity.

INTRODUCCION

La enfermedad de Chagas es una zoonosis causada por el protozoo intracelular *Trypanosoma cruzi* (Urbina, 2010). Se transmite a los seres humanos principalmente por las heces infectadas de insectos triatomíneos conocidos en Chile como vinchucas. Se estima que en el mundo hay entre 7 y 8 millones de personas infectadas, la mayoría de ellas en América Latina, donde la enfermedad de Chagas es endémica (WHO, 2014).

Actualmente el tratamiento disponible se basa principalmente en el uso de dos drogas, Benznidazol y Nifurtimox, los que son efectivos en el 80% de los casos agudos (Clayton, 2010). Sin embargo, su eficacia disminuye a medida que transcurre más tiempo desde el inicio de la infección, por lo que su uso debe sopesarse contra las posibles reacciones adversas que se presentan hasta en un 40% de los pacientes tratados (WHO, 2014).

Todo el ciclo de *T. cruzi* se desarrolla en dos tipos de hospederos; los mamíferos de siete órdenes diferentes incluido el humano (hospederos vertebrados) y varias especies de vectores triatóminos (hospederos invertebrados) del orden *Hemiptera*, familia *Reduviidae* (De Lana y Marques, 2010).

T. cruzi presenta cuatro estados morfológicamente distintos, dos de los cuales (tripomastigotes sanguíneo y amastigote) se encuentran en los hospederos vertebrados, mientras que los otros dos (epimastigotes y tripomastigote metacíclico) se ubican en hospederos invertebrados. Todos los estados con excepción de la forma de epimastigote son capaces de causar infección (De Lana y Marques, 2010) y todos son capaces de interactuar con células vertebradas. Sin embargo, sólo algunos parásitos permanecen adheridos a las células y el nivel de adhesión es cepa dependiente. Varios estudios muestran que cada forma infectiva, además de la cepa y la filogenia del parásito, determinarían el resultado de esta interacción (Ley *et al.*, 1990; Fernandes *et al.*, 2007). Así, el establecimiento de la infección depende de una serie de eventos que involucran interacciones de diversas moléculas parasitarias con componentes de la célula hospedera. En este proceso, varias glicoproteínas y proteínas con actividad lectina, presentes tanto en el parásito como en la células hospedera, están involucradas (De Lana y Marques, 2010).

Entre las moléculas de superficie de *T. cruzi* que promueven infectividad se mencionan: Gp82, gp30, gp35/50, trans-sialidasa, gp85 y la calcineurina B. Todas ellas, moléculas de superficie derivadas de tripomastigotes sanguíneo o de cultivo y tripomastigotes metacíclicos, con actividades de señalización e inducción de Ca^{2+} . Ellas desempeñan variables e importantes roles en la adhesión e invasión parasitaria hacia las células hospederas (Araya *et al.*, 2008; Yoshida y Cortez, 2008).

Sin embargo, es de particular interés el papel que desempeña calreticulina de *Trypanosoma cruzi* (TcCRT) en el proceso de infectividad. Esta proteína chaperona de 45 kDa es transportada desde el retículo endoplásmico (RE) a la zona de emergencia flagelar sobre la superficie del parásito. Allí interactúa con C1q, primer componente de la vía clásica del sistema del complemento (SC) e interfiere con la capacidad de asociación de las serino-proteasas C1r y C1s que activan C4 y C2, inhibiendo así la generación de C3 y C5 convertasa. De esta manera, la vía clásica del SC es inhibida en una etapa temprana de su activación (Ferreira *et al.*, 2004). Por otra parte, existe evidencia que indica que C1q juega un importante rol en la infección *in vitro* de *T. cruzi* en macrófagos y fibroblastos, ya que promueve la invasión celular (Rimoldi *et al.*, 1989).

Por otro lado, mediante microscopía confocal, se ha detectado la interacción de C1q y TcCRT en la superficie parasitaria, en la zona de emergencia flagelar (Ferreira *et al.*, 2004). Luego, se demostró que fragmentos $F(ab')_2$ de inmunoglobulinas anti-TcCRT que carecen de la región Fc (sitio de unión para C1q), y por lo cual son capaces de inhibir la interacción C1q/TcCRT, disminuyen la infectividad parasitaria mediada por esta interacción tanto *in vitro* como *in vivo* (Ramírez *et al.*, 2011a). De esta forma se determinó que TcCRT es crucial para el proceso de infectividad a través de su interacción con C1q (Ramírez *et al.*, 2011a).

Recientemente, Sanchez *et al.*, 2012, caracterizó dos líneas clonales de *T. cruzi* pertenecientes a las cepas Tulahuén y TCC, en ambas cepas generaron mutantes que sobreexpresan TcCRT, a los cuales llamaron TcCRT+ y en el caso particular de la cepa TCC generó un semi-knockout denominado TcCRT+/-, todo esto en el estado de epimastigote, forma no infectante del parásito. Sus resultados señalan que las cepas mutantes que sobreexpresan TcCRT son más resistentes a la lisis mediada por la ruta clásica del SC, a diferencia del mutante semi-knockout que es altamente susceptible. Esto indica que el aumento en la expresión de TcCRT

potenciaría algunas funciones relacionadas con la evasión del SC, específicamente su capacidad de unir C1q e inhibir la ruta clásica. Otra de las funciones que podría ser potenciada, es la capacidad infectiva derivada de la mayor interacción entre TcCRT y C1q en la superficie parasitaria. Sin embargo, los ensayos que permiten comprobar esta hipótesis no han sido realizados.

Considerando los antecedentes previos, y en colaboración con este grupo de científicos en la presente Memoria de Título se estudió el efecto que, la sobreexpresión de TcCRT, en las formas infectantes tripomastigotes, tiene en la infectividad parasitaria mediada por la interacción entre TcCRT y C1q. Para esto, se obtuvieron tripomastigotes TcCRT+ provenientes de epimastigotes a los cuales fue insertado un gen para generar mutantes con esta condición y su respectivo control no sobreexpresante (*wild type*, wt). Luego, se realizaron ensayos de infectividad en células VERO comparando ambas condiciones en presencia de C1q, y C1q más fragmentos F(ab')₂ anti-TcCRT capaces de inhibir esta interacción.

MATERIALES Y MÉTODOS

Materiales

Reactivos

Dodecil sulfato de sodio (SDS: *Sodium dodecyl sulfate*) (Sigma®), acrilamida (Winkler®), persulfato de amonio (Sigma®), N , N , N', N'-Tetrametiletilendiamina (TEMED) (Bio-Rad®), membrana de nitrocelulosa (Bio-Rad®), Albúmina Sérica Bovina (BSA) (Winkler®), Sustrato quimioluminiscente (SuperSignal® West Pico, Thermo scientific).

Anticuerpo monoclonal anti α - tubulina (Sigma®), anticuerpo monoclonal de ratón anti-conejo conjugado a peroxidasa (Dako®), anticuerpo de cabra anti-ratón conjugado a peroxidasa (Sigma®) y anticuerpo policlonal de conejo anti-TcCRT (donado por el Dr. Arturo Ferreira, Instituto de Ciencias Biomédicas, Facultad de Medicina, Universidad de Chile).

Medio de cultivo RPMI 1640 (Life Thecnology®), C1q (CompTech®), Fragmentos F(ab')₂ (donados por el Dr. Arturo Ferreira), 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) (Invitrogen®), Paraformaldheído (Electron Microscopy Sciences®), Medio montaje fluorescencia (Dako®), Glicina (Sigma®), detergente Tritón X-100 (Sigma®), Placas de poliestireno de 24 pocillos (Thermo Scientific®).

Métodos

1. Obtención de tripomastigotes de *T. cruzi* a través de metaciclógenesis.

Mantenimiento de epimastigotes

Alícuotas congeladas de Epimastigotes de la cepa Tulahuén de *T. cruzi* fueron donados por el Dr. Fernando Sánchez, de la Universidad Nacional de Salta, Argentina. Estos parásitos fueron previamente modificados genéticamente, con el fin de sobreexpresar TcCRT como se describe en Sánchez *et al.*, 2012.

Epimastigotes de la cepa Tulahuén, TcCRT+ y wt fueron descongelados y cultivados a 28°C en un medio LIT (*liver infusion tryptose*) suplementado con 5% de suero fetal bovino y 1% de Penicilina/Estreptomicina (Biological Industries®). Con la finalidad de obtener una transformación morfológica de epimastigotes hacia tripomastigotes metacíclicos infectivos (metaciclógenesis), se cultivaron los epimastigotes en un medio LIT suplementado, al cual se

le adicionó 10% p/v de homogenizado intestinal de vinchuca (HIV) (por sugerencia del Dr. Fernando Sánchez). Tripomastigotes metacíclicos infectantes se observaron en cultivos alrededor de 7 días más tarde. A los cultivos que poseían epimastigotes genéticamente modificados se les agregó 50 µl del antimicrobiano G418 (Geneticin®, Life Technologies) como presión de selección a la incorporación del plasmidio con el gen de *TcCRT*.

Mantenición de tripomastigotes

Tripomastigotes de la cepa Tulahuén wt y TcCRT+ de *T. cruzi* fueron mantenidos a través de infecciones repetidas en cultivos en monocapa de células VERO (fibroblastos de riñón de mono verde africano, *Cercopithecus aethiops*) con 75% de confluencia en RPMI 1640, suplementado con Penicilina-Estreptomicina (100 U/mL), L-glutamina (2mM), piruvato de sodio (1mM) y 10% suero fetal bovino (SFB) inactivado por calor, en una atmósfera de 5% CO₂ a 37°C (Cestari *et al.* 2012).

Mantenición de células VERO

Células VERO fueron mantenidas en una confluencia de 75% en RPMI 1640, suplementado con Penicilina-Estreptomicina (100 U/mL), L-glutamina (2mM), piruvato de sodio (1mM) y 10% SFB inactivado por calor, en una atmósfera de 5% CO₂ a 37°C.

2. Validación de la sobreexpresión de TcCRT en los tripomastigotes de cultivo genéticamente modificados.

Inmunodetección de TcCRT

Se prepararon geles de poliacrilamida al 12%, de 1,5 mm de grosor, en presencia de dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE) y en condiciones reductoras. Para el gel separador se utilizó una solución de acrilamida (Winkler®), al 30% p/v en agua desionizada, solución tampón (pH 8,8), persulfato de amonio al 10% p/v y TEMED 0,065% v/v. Tras la polimerización a 37°C del gel de corrida, se preparó sobre él, el gel concentrador (“*stacking*”), al 4% p/v a partir de los mismos reactivos antes mencionados, pero con una solución tampón de pH 6,8. La polimerización de este gel se realizó con un separador discontinuo. Previo a depositar las muestras en el gel, las proteínas fueron calentadas a 100°C durante 5 minutos. La electroforesis se realizó a 100 Volts y a temperatura ambiente, en una cámara Bio-Rad®.

Una vez finalizada la separación electroforética, se realizó la electrotransferencia de proteínas desde el gel de poliacrilamida a una membrana de nitrocelulosa (Bio-Rad®), en un sistema húmedo estándar (Bio-Rad®), durante 60 min a 100 Volts a 4°C. Luego, se bloqueó la membrana, durante toda la noche a 4°C, utilizando una solución de fosfato buffer salino (PBS), conteniendo 5% del detergente Tween-20 (PBS-Tween) y 0,05% de BSA.

Al día siguiente, se incubó la membrana con el primer anticuerpo (Ac); un Ac policlonal (Po) de conejo anti-TcCRT diluído (1:2.000), generado en el Laboratorio de Inmunología de la Agresión Microbiana del Dr. Arturo Ferreira, durante 60 minutos a temperatura ambiente. Luego, se lavó e incubó con un segundo Ac de ratón anti-conejo conjugado a peroxidasa, diluído 1:2.000 (Dako®) durante 45 minutos a temperatura ambiente. Finalmente, se reveló la membrana con sustrato para peroxidasa (SuperSignal® West Pico, Thermo scientific). A continuación del revelado y mediante un procedimiento de remoción (“*stripping*”), se consiguió disociar los Ac de la membrana previamente utilizados, esto se realizó con el fin de poder utilizar la membrana de nitrocelulosa nuevamente para la incubación con el Ac control de carga anti- α tubulina, diluído 1:1.000 (Sigma®) y un Ac secundario anti-ratón conjugado a peroxidasa (1:2.000) (Sigma®), para finalmente revelar la membrana como se hizo previamente.

3. Estandarización de infectividad de tripomastigotes Tulahuén wt en células VERO.

Cien mil células VERO fueron cultivadas durante 2 horas sobre un cubreobjeto en placas de cultivo de 24 pocillos, infectadas con 10^6 parásitos de la cepa Tulahuén wt, en triplicado, durante 2, 4 y 8 horas. Luego, cada cubreobjeto se lavó 3 veces con PBS y se fijó con paraformaldehído al 4%, durante 20 minutos, a temperatura ambiente. A continuación se permeabilizaron las células con un *buffer* de permeabilización Tritón al 0,5% durante 10 minutos, se lavó en dos oportunidades con Glicina 100 mM durante 10 minutos, posteriormente se tiñó con DAPI durante 10 minutos (todos los procedimientos fueron realizados a temperatura ambiente), para finalmente montar los cubreobjeto sobre un portaobjeto con medio de montaje para fluorescencia (Dako®). Se observó cada muestra al microscopio de fluorescencia (Nikon Elipse E400) (ver Anexo 1) y se sacaron fotografías para fluorescencia y contraste de fases (para definir los límites de la cada célula) de aproximadamente 20 campos totales distintos por condición, seleccionados al azar, con

aumento mayor y zoom máximo de la cámara (Nikon DS Ri1). Cada fotografía realizada con filtro para fluorescencia y contraste de fases fue superpuesta utilizando el programa *ImageJ*®. Los núcleos pequeños (correspondientes a parásitos) dentro o adheridos a la membrana de las células VERO fueron contados escogiendo 100 células al azar. Los resultados se expresaron como promedio del triplicado con su respectiva desviación estándar. Se escogieron las 4 horas de infección como tiempo óptimo de infectividad para el siguiente experimento.

4. Ensayo de infectividad de tripomastigotes Tulahuén en células VERO.

Cien mil células VERO fueron cultivadas durante 2 horas sobre un cubreobjeto en placas de cultivo de 24 pocillos. Paralelamente, se prepararon 6 grupos (en triplicado) con 10^6 tripomastigotes de la cepa Tulahuén wt (por pocillo), y 3 grupos (en triplicado) con 10^6 tripomastigotes de la cepa Tulahuén TcCRT+ (por pocillo), los que fueron incubados con las siguientes condiciones: 1) RPMI; 2) 2 μ g de C1q (estandarizado en Ramírez *et al.*, 2011a) y 3) 2 μ g de C1q con 10 μ g de fragmentos F(ab')₂ anti-TcCRT. Cada grupo (en triplicado) fue incubado por 30 minutos a 37°C. Luego, las células VERO fueron infectadas con 10^6 parásitos (provenientes de los diferentes grupos experimentales) de la cepa Tulahuén (proporción 10:1 parásitos:célula), en triplicado, e incubadas a 37°C durante 4 horas.

Posteriormente, cada cubreobjeto se lavó 3 veces con PBS, se fijó con paraformaldehído 4%, durante 20 minutos a temperatura ambiente. Luego, se permeabilizaron las células con un *buffer* de permeabilización Tritón al 0,5% durante 10 minutos, se lavó dos veces con glicina 100 mM durante 10 minutos, se tiñó con DAPI durante 10 minutos (todos los procedimientos fueron realizados a temperatura ambiente). Por último, se montaron los cubreobjeto sobre un portaobjeto con medio de montaje para fluorescencia (Dako®) y se observaron al microscopio de fluorescencia (Nikon Elipse E400) (ver Anexo 1) donde se sacaron fotografías de aproximadamente 20 campos distintos (por cubreobjeto), seleccionados al azar, con aumento mayor y zoom máximo de la cámara (Nikon DS Ri1). Los núcleos pequeños (correspondientes a parásitos) dentro o adheridos a las células VERO fueron contados escogiendo 100 células al azar. Los resultados se expresan como el promedio de los triplicados con su respectiva desviación estándar.

RESULTADOS

1. Tripomastigotes de cultivo provenientes de epimastigotes de la cepa Tulahuén genéticamente modificada sobreexpresan TcCRT.

Con el fin de verificar que la mutación realizada en el estado de epimastigote se conservara en el estado de tripomastigote de cultivo se realizó un *Western blot* en el cual se cuantificó la expresión relativa de TcCRT en comparación con una proteína constitutiva como α -tubulina. La expresión de TcCRT+ se comparó con su wt. El resultado se describe en la Figura 1.

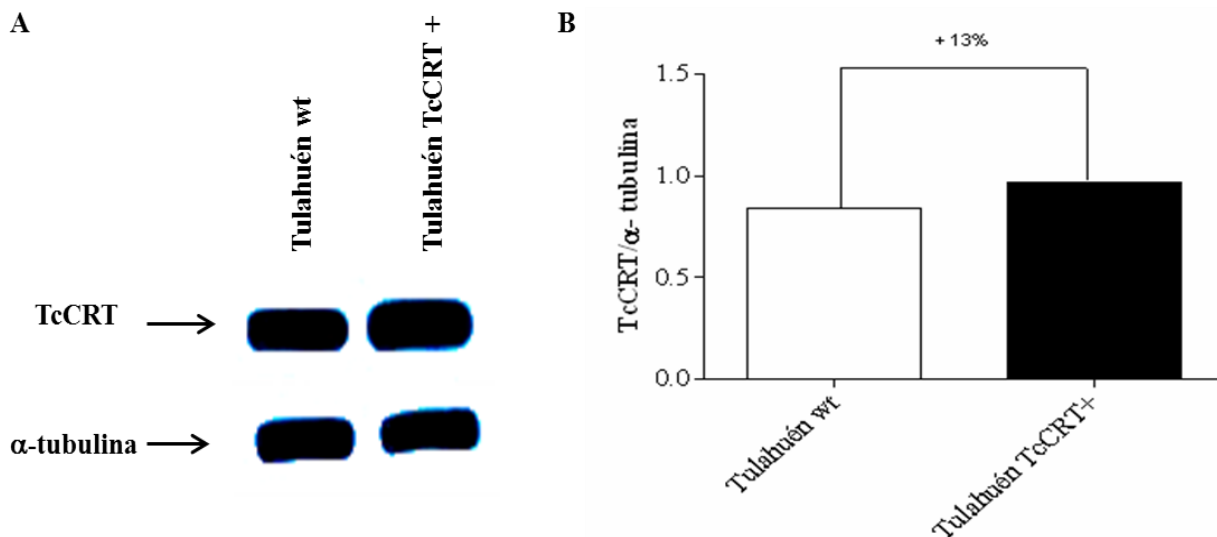


Figura 1. La expresión de TcCRT es mayor en los tripomastigotes mutantes Tulahuén TcCRT+ en comparación con Tulahuén wt. A. 10 μ g de proteína fue analizada por *Western blot* para cada variante. El lisado de células fue separado mediante *SDS-PAGE*, transferido sobre una membrana de nitrocelulosa e incubado con AcPo anti-TcCRT y un Ac monoclonal anti α -tubulina. B. Las bandas fueron analizadas y cuantificadas por densitometría con el programa *ImageJ*®, obteniéndose que los mutantes sobreexpresan un 13% más del polipéptido TcCRT.

Se realizó el *Western blot* utilizando los extractos totales de tripomastigotes de la cepa Tulahuén en sus variantes wt y sobreexpresante TcCRT+ (Figura 1A). Para ello, una cantidad

equivalente de proteínas (10 µg) de cada una de las poblaciones fue analizada. Se incubó la membrana de nitrocelulosa con un AcPo anti-TcCRT y un Ac monoclonal anti α -tubulina fue utilizado como control de carga (proteína que se expresa constitutivamente). Mediante el uso del programa *ImageJ*® se obtuvo por densitometría una estimación de la cantidad del polipéptido TcCRT que contienen cada una de estas poblaciones de parásitos. Se estableció una relación entre la expresión de TcCRT con la expresión de α - tubulina para cada una de las variantes. Obteniéndose que los mutantes sobreexpresantes contienen un 13% más de TcCRT en comparación con la población wt (Figura 1B).

2. El 13% de sobreexpresión de TcCRT no aumenta la infectividad mediada por la interacción TcCRT/C1q en la superficie parasitaria.

Para llevar a cabo los ensayos de infectividad se utilizaron células VERO. Sin embargo, como los estudios previos de infectividad celular se realizaron en modelos celulares, distintos de la célula VERO, fue necesario estandarizar la infección celular temprana, y así establecer un tiempo óptimo de infección. Este tiempo, corresponde al lapso necesario para encontrar parásitos dentro o adheridos a las células VERO y relacionados con la infectividad o internalización parasitaria y no con la replicación de amastigotes dentro de la célula (replicación parasitaria). Así, la estandarización del tiempo de infección celular, se realizó utilizando tripomastigotes Tulahuén wt. Al observar que, a medida que aumentan las horas de incubación, se incrementa la infectividad, se escogió un tiempo de 4 horas para realizar el ensayo final. Este tiempo corresponde al promedio entre el tiempo mínimo (menor cantidad de parásitos dentro o adheridos a la célula VERO) y el tiempo máximo (mayor cantidad de parásitos dentro o adheridos a la célula VERO) utilizados en este ensayo. Los resultados se observan en la Figura 2.

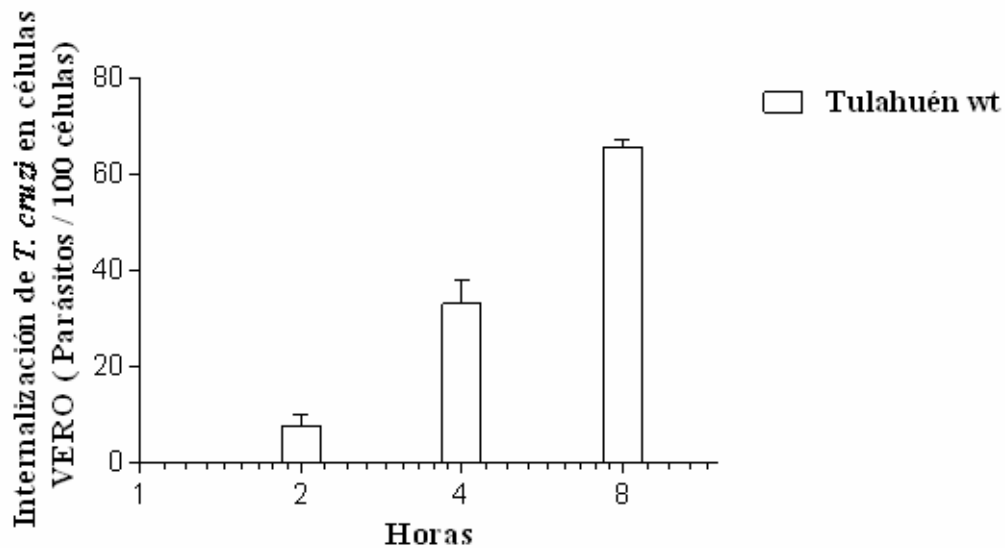


Figura 2. La internalización de *T. cruzi* se incrementa a mayor tiempo de incubación. 10^5 células VERO fueron infectadas con 10^6 tripomastigotes de la cepa Tulahuén wt. Las células fueron teñidas con DAPI y se realizó un recuento del número de parásitos internalizados o adheridos en 100 células. Cada condición horaria fue realizada en triplicado.

El rol de la sobreexpresión de TcCRT en la capacidad infectiva de tripomastigotes de la cepa Tulahuén fue analizado en células VERO (Figura 3). Se comparó la cepa Tulahuén en su variante TcCRT+ y su variante wt en iguales condiciones (parásitos, parásitos más C1q, y parásitos más C1q más fragmentos $F(ab')_2$ anti-TcCRT). Como era de esperar y de acuerdo con la literatura, los parásitos de ambas variantes pre-tratados con C1q alcanzan una mayor infección celular, mientras que este aumento de infectividad se ve reducido cuando los parásitos son pre-tratados con fragmentos de inmunoglobulina $F(ab')_2$ anti-TcCRT y C1q. Sin embargo, no hubo diferencias estadísticamente significativas en cuanto a infectividad entre ambas variantes de la cepa Tulahuén.

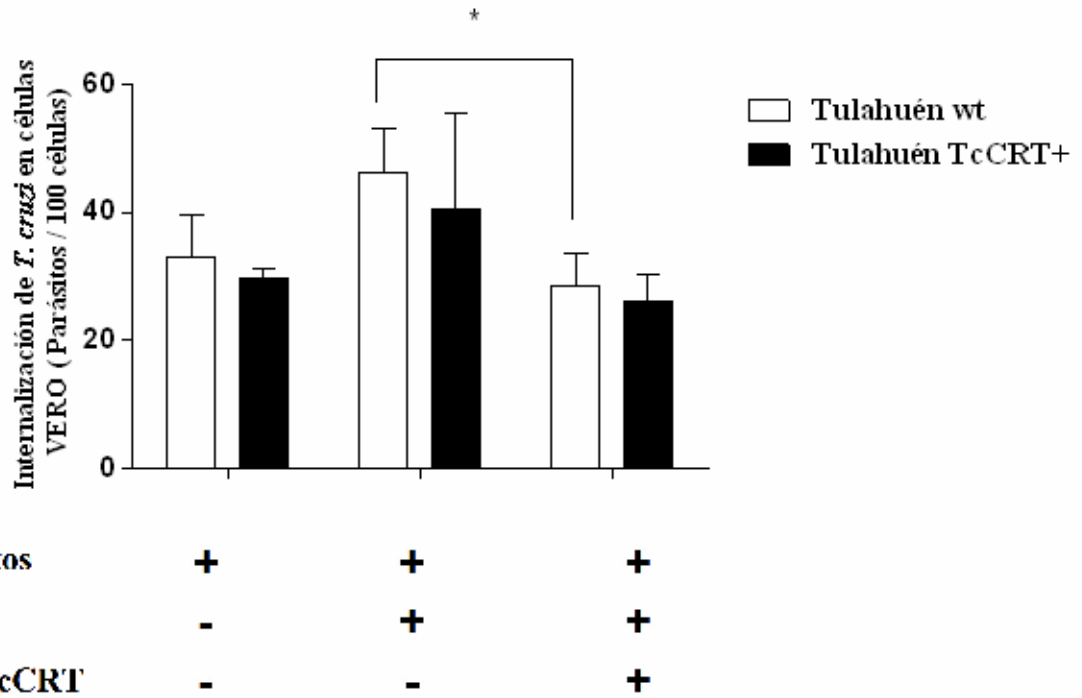


Figura 3. Un 13% de sobreexpresión de TcCRT no aumenta la infectividad mediada por la interacción TcCRT/C1q. 10^5 células VERO fueron infectadas con 10^6 tripomastigotes de la cepa Tulahuén wt o TcCRT+, pretratados con C1q o con fragmentos de anticuerpo $F(ab')_2$ anti-TcCRT más C1q. Las células fueron teñidas con DAPI y se realizó un recuento del número de parásitos internalizados o adheridos en 100 células. El experimento fue realizado en triplicado y los datos se presentan como su promedio y respectiva desviación estándar. La significancia de la diferencias fue evaluada utilizando ANOVA de dos colas, seguido por Bonferroni post-test. * $p=0.0115$

DISCUSIÓN

La Calreticulina es una proteína altamente conservada, que se encuentra presente en todas las células de organismos superiores, excepto en eritrocitos. Dentro de sus funciones se le describe ser: chaperona tipo lectina, encargada de la señalización y almacenamiento de calcio, modulación de la expresión génica, mediador de autoinmunidad, posee propiedades antiangiogénicas y de inhibición del crecimiento tumoral, participa en la actividad lítica de perforinas de células T y NK, y en la inhibición de la actividad del SC *in vitro* dependiente de C1q (Michalak *et al.*, 1999; Johnson *et al.*, 2001).

TcCRT, su homóloga en el parásito *T. cruzi*, es una proteína de 45 kDa (Ramos *et al.*, 1991), que contiene una secuencia de retención para el RE “KDEL” (Aguillón *et al.*, 1995; Aguillón *et al.*, 2000). Sin embargo, se ha reportado su presencia también en el complejo Golgi, reservosomas, bolsillo flagelar, superficie celular, citosol, núcleo y kinetoplasto (Ferreira *et al.*, 2004; Souto-Padron *et al.*, 2004). TcCRT inhibe la angiogénesis (Molina *et al.*, 2005) y el crecimiento de tumores (López *et al.*, 2010). Es traslocada desde el RE hacia el exterior del parásito, donde gracias a su capacidad para interactuar con C1q, primer componente de la vía clásica del SC, resulta inhibiéndolo en las primeras etapas de su activación (Ferreira *et al.*, 2004). Por otro lado, es un hecho comprobado que tripomastigotes en presencia de suero normal humano o C1q, aumentan su infectividad en un 50% (Rimoldi *et al.*, 1989). En la superficie del parásito, TcCRT se comporta como un potente factor de virulencia que no sólo contribuye en la evasión del sistema inmune del hospedero, sino que también interactúa con C1q, molécula relacionada con la infectividad de *T. cruzi* (Rimoldi *et al.*, 1989; Ferreira *et al.*, 2004; Ramírez *et al.*, 2011a). Este fenómeno ha sido probado tanto *in vivo* como *in vitro*, en distintos modelos celulares, incluyendo la placenta humana, donde la interacción entre TcCRT y C1q se ha descrito como un importante factor de virulencia asociado a infectividad (Castillo *et al.*, 2013). Este mecanismo puede ser tal vez, una adaptación evolutiva por parte del parásito para favorecer una prolongada interacción con el hospedero (Ramírez, *et al.*, 2011b).

Recientemente, en un trabajo de investigación, se generaron epimastigotes de *T. cruzi* modificados genéticamente con el fin de entender el rol biológico *in vivo* desempeñado por TcCRT en *T. cruzi*. Así, se generaron epimastigotes que presentan una delección monoalélica del gen de *TcCRT* (TcCRT +/-), mientras a otros se les insertó un plasmidio con el gen *TcCRT*

con el objetivo de sobreexpresar dicha proteína (TcCRT+). Además, se intentó generar un doble *knockout* (-/-) para TcCRT el cual resultó inviable, lo que demuestra el carácter esencial de dicha proteína para la supervivencia del parásito (Sánchez *et al.*, 2012). En este trabajo se evidenció que los epimastigotes TcCRT +/- mostraron un deterioro en la síntesis de TcCRT, una reducida tasa de propagación y metacicloogénesis, mientras que los TcCRT+ mostraron un aumento en los niveles de esta proteína. Asimismo, los parásitos mutantes monoalélicos fueron significativamente más susceptibles a la muerte mediada por el SC. Por el contrario, los parásitos TcCRT+ mostraron mayores niveles de resistencia a la muerte mediada por la vía clásica y de las lectinas, pero no por la vía alterna (Sánchez *et al.*, 2012).

De aquí se desprende la idea de estudiar la sobreexpresión de TcCRT, particularmente en la infectividad parasitaria, por lo que en la presente Memoria de Título, nos propusimos en base a evidencia previa (Ramírez *et al.*, 2011a) que TcCRT en condición de sobreexpresión y en interacción con C1q aumentaría la infectividad parasitaria en comparación con parásitos que no sobre expresan la proteína.

Para poder desarrollar este trabajo, epimastigotes de la cepa Tulahuén genéticamente modificados, que sobreexpresan en un ~50% TcCRT (Sánchez, 2014¹) fueron sometidos a metacicloogénesis. Los tripomastigotes TcCRT+ obtenidos fueron analizados mediante *Western blot* y sus bandas sometidas a densitometría. Se observó una sobreexpresión de un 13% más de polipéptido en aquellos mutantes en relación con los tripomatigotes no genéticamente modificados (wt) (Figura 1B).

Esta diferencia en la sobreexpresión de TcCRT entre epimastigotes modificados y los tripomastigotes derivados de éstos, podría ser explicado por un fenómeno que afectó la expresión del gen de *TcCRT* en esta última forma. Como es sabido, *T. cruzi* existe en cuatro formas morfológicamente y biológicamente distintas durante su ciclo de desarrollo en mamíferos e insectos, y la expresión de proteínas de superficie difiere entre ellas, lo que se traduce en cambios significativos en la abundancia relativa de las proteínas de *T. cruzi* en todo su ciclo de vida (Atwood *et al.*, 2005). Este fenómeno sucede en otros tripanosomátidos como

¹ SANCHEZ, F. 2014. [Comunicación Personal]. U de Chile, Fac. de Ciencias Veterinarias y Pecuarias.

Leishmania chagasi, donde por ejemplo, la proteasa de superficie gp63 posee tres isoformas durante la conversión de fase, y una forma de gp63 de 64 kDa no presentes en promastigotes, la cual es altamente expresada en la forma de amastigotes. Los RNAs de gp63 derivados de las tres clases diferentes de genes *msp* (*mspS*, *mspL* y *mspC*) también son expresados diferencialmente. Promastigotes infecciosos contienen ARNm de *mspS* y genes *mspC*, mientras que los amastigotes derivados de cultivo expresan ARNm sólo de *mspL* y genes de la clase *mspC*. Además, 24 horas después de la fagocitosis por macrófagos, existe un aumento transitorio en el nivel de proteínas hsp70 y hsp90, las cuales disminuyen posteriormente a nivel basal (Streit *et al.*, 1996). Un evento similar puede haber ocurrido en estos tripomastigotes mutantes de cultivo derivados de epimastigotes genéticamente modificados.

Cabe mencionar que incluso entre formas parasitarias más semejantes como lo son los tripomastigotes metacíclicos y tripomastigotes sanguíneos o de cultivo existen diferencias en cuanto a los mecanismos de invasión de células de mamífero, es decir, estas formas parasitarias involucran distintos conjuntos de moléculas de superficie para inducir la activación de las vías de transducción de señales que conducen a una movilización de Ca^{2+} en el momento de la invasión celular (Yoshida y Cortez, 2008). En este escenario, es esperable que la composición del patrón molecular de superficie difiera entre epimastigotes (forma no infectante) y tripomastigotes derivados de sangre o de cultivos celulares.

Por otra parte, podríamos explicar esta diferencia en la sobreexpresión de TcCRT mediante la acción de mecanismos epigenéticos que pudieran haber afectado su expresión genética. En células eucariotas, la iniciación de la transcripción es un punto regulador clave en el control del nivel de expresión génica (Clayton y Shapira, 2007). La modulación de los sitios de iniciación de transcripción de muchos organismos está regulada por la interacción cooperativa de modificaciones epigenéticas del ADN y las histonas (Klose y Bird, 2006; Quina *et al.*, 2006). La modificación del ADN, modificación de las histonas, la remodelación y abundancia de los nucleosomas trabajan juntos para regular la estructura de la cromatina y la transcripción de la Polimerasa II. Por ejemplo, la modificación de las colas de las histonas, incluyendo acetilación de H4/H3 en promotores de la Polimerasa II, conduce a una disminución de la abundancia de los nucleosomas y al aumento del reclutamiento de la Polimerasa II, resultando en un aumento de la tasa de iniciación de la transcripción. Esta evidencia sugiere entonces que

el control de la expresión génica se regula de forma epigenética en tripanosomas (Ekanayake y Sabatini, 2011), por lo que no podemos descartar que algún fenómeno de este tipo haya afectado la expresión del gen de *TcCRT*, y esto haya derivado en un silenciamiento parcial de la sobreexpresión de TcCRT en la forma de tripomastigote.

Los ensayos realizados para determinar el rol de la sobreexpresión de TcCRT por tripomastigotes, mostraron que no existen diferencias estadísticamente significativas en cuanto a infectividad celular, es decir, un 13% más de TcCRT no aumenta el nivel de infectividad de tripomastigotes en comparación con los wt (Figura 3). Esta situación podría ser explicada inicialmente porque un 13% más de proteína podría no ser una cantidad significativa, y por esto no necesariamente sería responsable de una mayor infección. Ahora bien, también nos podemos cuestionar el hecho que esta sobreexpresión de TcCRT no necesariamente se traduzca una mayor cantidad de la proteína sobre la superficie celular, particularmente sobre la zona de emergencia flagelar, y sólo se deba a una mayor síntesis intracelular del polipéptido, resultando en que lo expresado sobre la superficie celular es muy bajo para tener un efecto tangible en infectividad. Este hecho no puede ser descartado, ya que se necesitan otros enfoques experimentales para poder demostrarlo. Cabe recordar que CRT posee múltiples localizaciones subcelulares, donde media una variedad de procesos celulares (Jiang *et al.*, 2014). Dentro del lumen del RE, CRT junto con otras chaperonas residentes en él, participa en el plegamiento de proteínas y glicoproteínas, previene la agregación de proteínas, y participan en el control de calidad, a través de la identificación de proteínas mal plegadas para su destrucción mediante ubiquitinación (Mesaeli *et al.*, 1999). Además, regula el metabolismo del Ca^{2+} , el *clearance* de células apoptóticas, la adhesión y migración celular (Gardai *et al.*, 2005; Martins *et al.*, 2010), entre otros.

CRT presente en la superficie celular no posee un dominio transmembrana y se ha informado que ésta puede formar complejos con integrinas (Johnson *et al.*, 2001). CRT puede ser detectada en la superficie de neutrófilos en un complejo con la proteína anclada a glicosilfosfatidilinositol (GPI), CD59. Es así como se sugiere que CRT unida a la superficie está formando un complejo con una o más proteínas ancladas a GPI dentro de lípidos *rafts* (Ghiran *et al.*, 2003; Otabor *et al.*, 2004). Ante esta evidencia podríamos pensar que TcCRT está anclada a la membrana a través de la asociación con una o más proteínas, pudiendo ser

que en el caso particular de esta sobreexpresión de TcCRT, ésta o estas proteínas de anclaje no se sobreexpresen ligadas a la sobreexpresión de TcCRT o que la cantidad de estas proteínas no sea suficiente para unir la TcCRT sobreexpresada, y por tanto, a pesar de existir una mayor cantidad de TcCRT esta no se encuentra disponible sobre la superficie celular. Para dilucidar esto, deberíamos primeramente identificar la proteína o las proteínas a las que se une TcCRT, luego, ver si ésta o éstas se sobreexpresan junto con la sobreexpresión de TcCRT, y por último, chequear si ésta o éstas participan activamente en el proceso de infectividad celular.

Como era de esperar, bajo las condiciones experimentales realizadas, la infección celular en presencia de C1q se vio aumentada, mientras que en presencia de los fragmentos de inmunoglobulinas F(ab')₂ anti-TcCRT la internalización se mostró reducida (Figura 3), tal como se había evidenciado en trabajos previos. Sin embargo, la reducción de la infección alcanzada por parte de los fragmentos no es total (no alcanza el nivel basal), pudiendo ser entonces que existan otros factores de virulencia sobre la superficie celular de tripomastigotes, como es el caso por ejemplo de Trombospondina-1 (TSP-1). Ésta, es una glicoproteína de la matriz extracelular (MEC) que constituye un grupo de proteínas únicas con multidominios que son sintetizadas, secretadas e incorporadas en la MEC por muchos tipos celulares (Lawler, 2000). Se ha reportado que el parásito regula positivamente la expresión de TSP-1 y otras proteínas de la MEC en las células de músculo liso de la arteria coronaria humana, con el fin de mejorar el proceso de invasión celular (Simmons *et al.*, 2006; Nde *et al.*, 2006). Además, se ha sugerido que tripomastigotes de *T. cruzi* se unen a varios componentes de la MEC tales como laminina (Giordano *et al.*, 1994), fibronectina (Ouaisi *et al.*, 1984), colágeno (Santana *et al.*, 1997) y la galectina-3 humana (Moody *et al.*, 2000; Kleshchenko *et al.*, 2004) para aumentar la infección celular a través de mecanismos no bien entendidos. Recientemente, se ha demostrado que TSP-1 de células hospederas interactúa con TcCRT expresada sobre la superficie del parásito para mejorar la infección celular; sin embargo TSP-1 no interactúa con C1q (Johnson *et al.*, 2012). En contraste, el aumento de infectividad en presencia de C1q puede deberse no sólo a la interacción con TcCRT, sino que también a la interacción con otros factores de virulencia de superficie, aún no descritos.

En síntesis, la interacción entre TcCRT y C1q participa en la infectividad parasitaria. Sin embargo, un 13% de sobreexpresión de TcCRT en la forma infectante de tripomastigote no

produce un aumento en la infectividad, posiblemente debido a que esta sobreexpresión no se manifiesta en la superficie parasitaria, sino más bien de forma intracelular, asociada a otros procesos ligados a esta proteína.

REFERENCIAS

- **AGUILLON, J.C.; FERREIRA, L.; PEREZ, C.; COLOMBO, A.; MOLINA, M.; WALLACE, A.; SOLARI, A.; CARVALLO, P.; GALINDO, M.; GALANTI, N.; ORN, A.; BILLETA, R.; FERREIRA, A.** 2000. Tc45, a dimorphic *Trypanosoma cruzi* immunogen with variable chromosomal localization, is calreticulin. *Am J Trop Med Hyg.* 63:306-312.
- **AGUILLON, J.C.; BUSTOS, C.; VALLEJOS, P.; HERMOSILLA, T.; MORELLO, A; HELLMAN, U.; ORN, A.; FERREIRA, A.** 1995. Purification and preliminary sequencing of Tc-45, an immunodominant *Trypanosoma cruzi* antigen: absence of homology with cruzipain, cruzain, and a 46-kilodalton protein. *Am J Trop Med Hyg.* 53:211-215.
- **ARAYA, J.E.; CORNEJO, A.; ORREGO, P.R.; CORDERO, E.M.; CORTEZ, M.; OLIVARES, H.; NEIRA, I.; SAGUA, H.; DA SILVEIRA, J.F.; YOSHIDA, N.; GONZALEZ, J.** 2008. Calcineurin B of the human protozoan parasite *trypanosoma cruzi* is involved in cell invasion. *Microbes Infect.* 10:892-900.
- **ATWOOD, J.A.; WEATHERLY, D.B.; MINNING, T.A.; BUNDY, B.; CAVOLA, C.; OPPERDOES, F.R.; ORLANDO, R.; TARLETON, L.** 2005. The *Trypanosoma cruzi* proteome. *Science.* 309:473-475.
- **CASTILLO, C.; RAMIREZ, G.; VALCK, C.; AGUILAR, L.; MALDONADO, I.; ROSAS, C.; GALANTI, N.; KEMMERLING, U.; FERREIRA, A.** 2013. The interaction of classical complement component C1 with parasite and host calreticulin mediates *Trypanosoma cruzi* infection of human placenta. *PLoS Negl Trop Dis.* 7:e2376.
- **CESTARI, I.; ANSA-ADDO, E.; DEOLINDO, P.; INAL, J.; RAMIREZ, M.** 2012. *Trypanosoma cruzi* immune evasion mediated by host cell-derived Microvesicles. *J Immunol.* 188:1942-1952.
- **CLAYTON, C.; SHAPIRA, M.** 2007. Post-transcriptional regulation of gene expression in trypanosomes and leishmanias. *Mol. Biochem. Parasitol.* 156:93-101.
- **CLAYTON, J.** 2010. Chagas Disease 101. *Nature.* 465:4-5.
- **DE LANA, M.; MARQUES, E.** 2010. Biology of *Trypanosoma cruzi* and biological diversity. **In:** Telleria, J.; Tibayreng, M. *American Trypanosomiasis one hundred years of research.* Elsevier Insights. Londres, Inglaterra. pp. 339-363.
- **EKANAYAKE, D.; SABATINI, R.** 2011. Epigenetic regulation of polymerase II transcription initiation in *Trypanosoma cruzi*: Modulation of nucleosome abundance, histone modification, and polymerase occupancy by O-linked thymine DNA glucosylation. *Eukariot Cell.* 10:1465-1472.

- **FERNANDES, M.C.; CORTEZ, M.; GERALDO, K.A.; STRAUS, A.H.; YOSHIDA, N.; MORTARA, R.A.** 2007. Novel strategy in *Trypanosoma cruzi* cell invasion: implication of cholesterol and host cell microdomains. *Int J Parasitol.* 37:1431-1441.
- **FERREIRA, V.; VALCK, C.; SANCHEZ, G.; GINGRAS, A.; TZIMA, S.; MOLINA, M.C.; SIM, R.; SCHWAEBLE, W.; FERREIRA, A.** 2004. The classical activation pathway of the human complement system is specifically inhibited by calreticulin from *Trypanosoma cruzi*. *J Immunol* 172:3042-50.
- **GARDAL, S.J.; MC PHILLIPS, 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.
- **GHIRAN, I.; KLICKSTEIN, L.B.; NICHOLSON-WELLER, A.** 2003. Calreticulin is at the surface of circulating neutrophils and uses CD59 as an adaptor molecule. *J Biol Chem.* 278:21024-21031.
- **GIORDANO, R.; CHAMMAS, R.; VEIGA, S.S.; COLLI, W.; ALVES, M.J.** 1994. An acidic component of the heterogeneous Tc-85 protein family from the surface of *Trypanosoma cruzi* is a laminin binding glycoprotein. *Mol Biochem Parasitol.* 65:85-94.
- **JIANG, Y.; DEY, S.; MATSUNAMI, H.** 2014. Calreticulin: Roles in cell-surface protein expression. *Membranes.* 4:630-641.
- **JOHNSON, S.; MICHALAK, M.; OPAS, M.; EGGLETON, P.** 2001. The ins and outs of calreticulin: from the ER lumen to the extracellular space. *Trends Cell Biol.* 11:122-129.
- **JOHNSON, C.A.; KLESHCHENKO, Y.Y.; IKEJIANI, A.O.; UDOKO, A.N.; CARDENAS, T.C.; PRATAP, S.; DUQUETTE, M.; LIMA, M.F.; LAWLER, J.; VILLALTA, F.; NDE, P.N.** 2012. Thrombospondin-1 interacts with *Trypanosoma cruzi* surface calreticulin to enhance cellular infection. *PLoS ONE.* 7:e40614.
- **KLESHCHENKO, Y.Y.; MOODY, T.N.; FURTAK, V.A.; OCHIENG, J.; LIMA, M.F.; VILLALTA, F.** 2004. Human galectin-3 promotes *Trypanosoma cruzi* adhesion to human coronary artery smooth muscle cells. *Infect Immun.* 72:6717-6721.
- **KLOSE, R.J.; BIRD, A.P.** 2006. Genomic DNA methylation: the mark and its mediators. *Trends Biochem Sci.* 31:89-97.
- **LAWLER, J.** 2000. The functions of thrombospondin-1 and -2. *Curr Opin Cell Biol.* 12:634-640.
- **LEY, V.; ROBBINS, E.S.; NUSSENZWEIG, V.; ANDREWS, N.W.** 1990. The exit of *Trypanosoma cruzi* from the phagosome is inhibited by raising the pH of acidic compartments. *J Exp Med.* 171:401-413.

- **LOPEZ, N.; VALCK, C.; RAMIREZ, G.; RODRIGUEZ, M.; RIBEIRO, C.; ORELLANA, J.; MALDONADO, I.; ALBINI, A.; ANACONA, A.; LEMUS, D.; AGUILAR, L.; SCHWAEBLE, W.; FERREIRA, A.** 2010. Antiangiogenic and antitumor effects of *Trypanosoma cruzi* calreticulin. *PLoS Negl Trop Dis.* 4: e730.
- **MARTINS, I.; KEPP, O.; GALLUZZI, L.; SENOVILLA, L.; SCHLEMMER, F.; MENGER, L.; MICHAUD, M.; ZITVOGEL, L.; KROEMER, G.** 2010. Surface-exposed calreticulin in the interaction between dying cells and phagocytes. *Ann N Y Acad Sci.* 1209:77-82.
- **MICHALAK, M.; CORBETT, E.F.; MESAELI, N.; NAKAMMURA, K.; OPAS, M.** 1999. Calreticulin: one protein, one gen, many functions. *Biochem J.* 344:281-292.
- **MOLINA, M.; FERREIRA, V.; VALCK, C.; AGUILAR, L.; ORELLANA, J.; ROJAS, A.; RAMIREZ, G.; BILLETTA, R.; SCHWAEBLE, W.; LEMUS, D.; FERREIRA, A.** 2005. An *in vivo* role for *Trypanosoma cruzi* calreticulin in antiangiogenesis. *Mol Biochem Parasitol.* 140:133-140.
- **MOODY, T.N.; OCHIENG, J.; VILLALTA, F.** 2000. Novel mechanism that *Trypanosoma cruzi* uses to adhere to the extracellular matrix mediated by human galectin-3. *FEBS Lett.* 470:305-308.
- **NDE, P.N.; SIMMONS, K.J.; KLESHCHENKO, Y.Y.; PRATAP, S.; LIMA, M.F.; VILLALTA, F.** 2006. Silencing of the laminin gamma-1 gene blocks *Trypanosoma cruzi* infection. *Infect Immun.* 74:1643–1648.
- **OTABOR, I.; SHIVRAJ, T.; BEURSKENS, F.; GHIRAN, I.; SCHWAB, P.; NICHOLSON-WELLER, A.; KLICKSTEIN, L.B.** 2004. A role for lipid rafts in C1q-triggered O₂-generation by human neutrophils. *Mol Immunol.* 41:185-190.
- **OUAISSI, M.A.; AFCHAIN, D.; CAPRON, A.; GRIMAUD, J.A.** 1984. Fibronectin receptors on *Trypanosoma cruzi* trypomastigotes and their biological function. *Nature.* 308:380-382.
- **QUINA, A.S.; BUSCHBECK, M.; DI CROCE, L.** 2006. Chromatin structure and epigenetics. *Biochem Pharmacol.* 72:1563-1569.
- **RAMIREZ, G.; VALCK, C.; MOLINA, M.; RIBEIRO, C.; LOPEZ, N.; SANCHEZ, G.; FERREIRA, V.; BILLETTA, R.; AGUILAR, L. MALDONADO, I.; CATTAN, P.; SCHWAEBLE, W.; FERREIRA, A.** 2011a. *Trypanosoma cruzi* calreticulin: A novel virulence factor that binds complement C1 on the parasite surface and promotes infectivity. *Immunobiology.* 216:265-273.
- **RAMIREZ, G.; VALCK, C.; FERREIRA, V.; LOPEZ, N.; FERREIRA, A.** 2011b. Extracellular *Trypanosoma cruzi* calreticulin in the host-parasite interplay. *Trends Parasitol.* 27:115-122.
- **RAMOS, R.; JURI, M.; RAMOS, A.; HOECKER, G.; LAVANDERO, S.; PENA, P.; MORELLO, A.; REPETTO, Y.; AGUILLON, J.C.; FERREIRA, A.** 1991.

An immunogenetically defined and immuno dominant *Trypanosoma cruzi* antigen. Am J Trop Med Hyg. 44:314-322.

- **RIMOLDI, M.T.; TENNER, A.J.; BOBAK, D.A.; JOINER, K.A.** 1989. Complement component C1q enhances invasion of human mononuclear phagocytes and fibroblasts by *Trypanosoma cruzi* trypomastigotes. J Clin Invest. 84:1982-1989.
- **SANTANA, J.M.; GRELLIER, P.; SCHREVEL, J.; TEICEIRA, A.R.** 1997. A *Trypanosoma cruzi* secreted 80 kDa proteinase with specificity for human collagen types I and IV. Biochem J. 325:129-137.
- **SANCHEZ, F.J.; PEREZ, C.; ZAGO, M.; LABRIOLA, C.; FERREIRA, A.; BASOMBRÍO, M.A.** 2012. *Trypanosoma cruzi* carrying a monoallelic deletion of the calreticulin (TcCRT) gene are susceptible to complement mediated killing and defective in their metacyclogenesis. Molec. Immunol. 53:198-205.
- **SIMMONS, K.J.; NDE, P.N.; KLESHCHENKO, Y.Y.; LIMA, M.F.; VILLALTA, F.** 2006. Stable RNA interference of host thrombopondin-1 blocks *Trypanosoma cruzi* infection. FEBS Lett. 580:2365-2370.
- **SOUTO-PADRON, T.; LABRIOLA, C.; DE SOUZA, W.** 2004. Immunocytochemical localisation of calreticulin in *Trypanosoma cruzi*. Histochem. Cell Biol. 122:563-569.
- **STREIT, J.A.; DONELSON, J.E.; AGEY, M.W.; WILSON, M.E.** 1996. Developmental Changes in the expression of *Leishmania chagasi* gp63 and heat shock proteins in a human macrophage cell line. Infect Immun. 64:1810-1818.
- **URBINA, J. A.** 2010. Specific chemotherapy of Chagas disease: Relevance, current limitations and new approaches. Acta Trop. 115:55-68.
- **WHO.** 2014. Chagas disease (American trypanosomiasis). [en línea] <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs340/en/>> [consulta: 27-04-2014]
- **YOSHIDA, N.; CORTEZ, M.** 2008. *Trypanosoma cruzi*: parasite and host cell signaling during the invasion process. Subcell. Biochem. 47:82-91

ANEXO 1

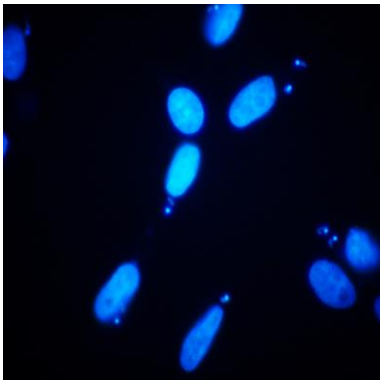
Recuento Parasitario

Para realizar el recuento parasitario dentro de las células VERO, se fotografiaron los cubreobjetos montados sobre portaobjetos con medio de montaje para fluorescencia (Dako®) en el microscopio de fluorescencia (Nikon Elipse E400), allí se fotografiaron aproximadamente 20 campos distintos por cubre objeto, seleccionados al azar. Los campos fueron fotografiados con aumento mayor y zoom máximo de la cámara (Nikon DS Ri1), las fotografías se tomaron en contraste de fases (Fotografía A) y con filtro para fluorescencia (Fotografía B) para cada uno de los campos en cada cubre objeto. Luego, cada fotografía tomada en contraste de fases se superpuso con su respectiva foto con filtro de fluorescencia (Fotografía C). Una a una fueron superpuestas las fotografías utilizando el programa *ImageJ*®, esto con el fin de poder establecer con mayor precisión los límites celulares, ya que para el recuento parasitario se realizó un conteo tanto de los núcleos del parásito al interior de las células VERO como los adheridos a la membrana celular, en 100 células escogidas al azar (por cubre objeto). El experimento fue realizado en triplicado y los resultados fueron expresados como promedio con su respectiva desviación estándar.

Fotografía A



Fotografía B



Fotografía C

