



UNIVERSIDAD DE CHILE



FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS
ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS

ESTANDARIZACIÓN DEL MODELO ANGIOGÉNICO DE
TAPÓN DE MATRIGEL EN RATÓN Y EVALUACIÓN DEL
EFECTO DE CALRETICULINA DE *Trypanosoma cruzi*

MARÍA LEONORA BEATRIZ DUASO INOSTROSA

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

PROFESOR GUÍA: ARTURO FERREIRA

SANTIAGO, CHILE
2011



UNIVERSIDAD DE CHILE



FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS
ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS

ESTANDARIZACIÓN DEL MODELO ANGIOGÉNICO DE TAPÓN DE MATRIGEL EN RATÓN Y EVALUACIÓN DEL EFECTO DE CALRETICULINA DE *Trypanosoma cruzi*

MARÍA LEONORA BEATRIZ DUASO INOSTROSA

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

NOTA FINAL

PROFESOR GUÍA : ARTURO FERREIRA

NOTA FIRMA

.....

PROFESOR CONSEJERO : FERNANDO FREDES

.....

PROFESOR CONSEJERO : EDUARDO KESSI

.....

ÍNDICE

ÍNDICE	ii
ÍNDICE DE FIGURAS.....	v
ABREVIATURAS.....	vi
RESUMEN	viii
ABSTRACT	x
INTRODUCCIÓN	1
REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	3
Enfermedad de Chagas	3
<i>Trypanosoma cruzi</i>	5
Efecto antineoplásico de la infección chagásica.....	8
Angiogénesis.....	10
Calreticulina (CRT).....	10
<i>Isoformas y expresión de Calreticulina</i>	10
<i>Funciones de CRT</i>	12
<i>CRT y angiogénesis</i>	13
Calreticulina de <i>Trypanosoma cruzi</i>	13
<i>TcCRT y angiogénesis</i>	14
HIPÓTESIS	16
OBJETIVO GENERAL	17
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	17

MATERIAL Y MÉTODOS	18
MATERIALES	18
<i>Reactivos Biológicos</i>	18
<i>Reactivos Comerciales</i>	18
MÉTODOS	19
1. <i>Estandarización del ensayo de tapón de Matrigel in vivo para medir angiogénesis.</i>	19
Inoculación de Matrigel.....	19
Obtención Muestra de Matrigel desde tapones implantados <i>in vivo</i>	19
2. <i>Estandarización de la concentración de factor de crecimiento fibroblástico básico (bFGF) por tapón de Matrigel</i>	20
Inoculación de Matrigel.....	20
Muestras histológicas.....	20
Tinción Hematoxilina-eosina.....	20
Inmunohistoquímica.....	21
Cuantificación de Angiogénesis.....	22
3. <i>Determinación de la presencia de rTcCRT y rHuCRT en extracto proteico de tapones de Matrigel (EPM)</i>	22
Extracción proteica tapones de Matrigel.....	22
Cuantificación de proteínas totales.....	22
Electroforesis.....	23
Transferencia.....	23
4. <i>Cuantificación del efecto de rTcCRT y rHuCRT sobre la angiogénesis en modelo in vivo de tapón de Matrigel en ratón</i>	24
Inoculación de Matrigel con CRT.....	24
Análisis estadístico.....	24
Consideraciones Bioéticas.....	24

RESULTADOS	26
1. <i>Estandarización del ensayo de tapón de Matrigel in vivo para medir angiogénesis.</i>	<i>26</i>
2. <i>Estandarización de la concentración de factor de crecimiento fibroblástico básico (bFGF) por tapón de Matrigel</i>	<i>27</i>
3. <i>Determinación de la presencia de rTcCRT y rHuCRT en EPM</i>	<i>30</i>
4. <i>Cuantificación del efecto de rTcCRT y rHuCRT sobre la angiogénesis en modelo in vivo de tapón de Matrigel en ratón</i>	<i>32</i>
DISCUSIÓN	35
CONCLUSIÓN	39
BIBLIOGRAFÍA	40
ANEXOS	50
Anexo 1	50
Anexo 2	52
Anexo 3	54

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Distribución endémica de Enfermedad de Chagas en el mundo	3
Figura 2: Ciclo de vida de <i>Trypanosoma cruzi</i> , agente causal de la Enfermedad de Chagas	6
Figura 3: Obtención de tapón de Matrigel para análisis histológico e inmunológico. .	26
Figura 4: El bFGF promueve la infiltración de células endoteliales, en tapones de Matrigel inoculados subcutáneamente en ratones C57BL/6.....	27
Figura 5: Las células que infiltran los tapones de Matrigel subcutáneo en ratones C57BL/6 son de naturaleza endotelial.....	28
Figura 6: El factor de crecimiento fibroblástico (bFGF) promueve la infiltración de células endoteliales en tapones de Matrigel subcutáneos.....	29
Figura 7: Anticuerpos policlonales anti-TcCRT y anti-HuCRT reconocen las calreticulinas respectivas en EPMs	30
Figura 8: Anticuerpos monoclonales anti-TcCRT y anti-HuCRT reconocen las proteínas respectivas en EPMs	31
Figura 9: Características macro y microscópicas de tapón de Matrigel en ratones C57BL/6	32
Figura 10: rTcCRT y rHuCRT disminuyen la infiltración celular endotelial en los tapones de Matrigel inoculados en tejido subcutáneo de ratones C57BL/6.....	34

ABREVIATURAS

°C	Grados Celsius
aa	Aminoácidos
Ac	Anticuerpo
AcMo	Anticuerpo Monoclonal
AcPo	Anticuerpo Policlonal
Ag	Antígeno
Asp	Ácido aspártico
BCIP	5-bromo-4-cloro-3-indolilfosfato
bFGF	Factor de crecimiento fibroblástico básico
BSA	Albúmina sérica bovina
cDNA	DNA complementario
CAM	Membrana corioalantoidea de pollo
CRT	Calreticulina
Cys	Cisteina
DAB	Cromógeno diamino benzidina
EPM	Extracto proteico de Matrigel
ETOH	Etanol
g	gravedad
Glu	Ácido glutámico
h	Hora
H ₂ O _d	Agua destilada
HuCRT	Calreticulina humana
HUVEC	Células endoteliales de cordón umbilical humano
Ig	Inmunoglobulina
IWB	Inmuno electrotransferencia
kDa	Kilo Daltons
Leu	Leucina
LIAM	Laboratorio de Inmunología de la Agresión Microbiana
LPS	lipopolisacarido
Lys	Lisina

M	Molar
mg	miligramo
min	minuto
ml	mililitro
mm	milímetro
mM	milimolar
NBT	Azul nitrotetrazolio
ng	nanogramo
PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida
PCR	Reacción de polimerasa en cadena
PBS	Buffer fosfato salino
PM	Peso molecular
pg	picogramo
PSA	Persulfato de amonio
RE	Retículo endoplásmico
rHuCRT	Calreticulina Humana recombinante
rTcCRT	Calreticulina de <i>Trypanosoma cruzi</i> recombinante
SDS	Dodecil sulfato de sodio
TcCRT	Calreticulina de <i>Trypanosoma cruzi</i>
TEMED	N,N,N',N'-tetrametiletilendiamina
V	voltios
µg	microgramo
µl	microlitro
µM	micromolar
µm	micrones

RESUMEN

La angiogénesis es la generación de nuevos capilares a partir de vasos sanguíneos pre-existentes. Fisiológicamente, se produce sólo en casos excepcionales (inflamación crónica, ciclo menstrual, cicatrización, etc.), y es un mecanismo fundamental para el crecimiento de un tumor, desde los 2 mm³.

Calreticulina (CRT) es una proteína multifuncional, altamente conservada, expresada en todas las células nucleadas. CRT humana (HuCRT) y su dominio N-terminal, vasostatina, interfieren con la angiogénesis, inhibiendo así la proliferación de células endoteliales. Anteriormente, en el Laboratorio de Inmunología de la Agresión Microbiana (LIAM), se ha descrito que CRT de *Trypanosoma cruzi* (TcCRT) es antiangiogénica en el ensayo *in vivo* de membrana corioalantoidea de pollo (CAM). Estas propiedades también son expresadas por TcCRT y su dominio N-terminal, en ensayos *ex vivo* e *in vitro*, en células endoteliales arteriales y venosas de dos especies de mamíferos, *Rattus rattus* y *Homo sapiens sapiens*. Este efecto se correlaciona, en experimentos *in vitro*, con la inhibición de la morfogénesis capilar, la proliferación y la migración de las células endoteliales y con la internalización de TcCRT por estas células, también descrito en el LIAM.

El objetivo general de este estudio fue validar los resultados antiangiogénicos de TcCRT obtenidos *in vivo* en aves, así como los generados *in vitro* y *ex vivo*, con varias especies de mamíferos, usando ahora un ensayo *in vivo* en un modelo mamífero. Esto se basa en la posibilidad de que las moléculas que regulan la angiogénesis pueden actuar de forma diferente en diferentes especies. Matrigel es una preparación de membrana basal solubilizada extraída del sarcoma de ratón Engelbreth-Holm-Swarm (EHS). Entre los ensayos *in vivo* descritos para medir la angiogénesis, está el ensayo de tapón de Matrigel, que se utilizó en esta investigación, que se basa en la siguiente hipótesis: Dadas las propiedades antiangiogénicas que TcCRT expresa en una variedad de ensayos *in vitro*, *ex vivo*, en células mamíferas y, también *in vivo* en aves, entonces, TcCRT inhibirá la angiogénesis en el modelo *in vivo* de tapón de Matrigel en mamíferos (*Mus musculus*). Los objetivos específicos para

satisfacer esta hipótesis, fueron: **1.** Estandarizar el ensayo de tapón de Matrigel *in vivo* para medir angiogénesis, **2.** Estandarizar la concentración de factor de crecimiento fibroblástico básico (bFGF) por tapón de Matrigel, **3.** Determinar la presencia de TcCRT recombinante (rTcCRT) y HuCRT recombinante (rHuCRT) en extracto proteico de tapones de Matrigel, y **4.** Cuantificar el efecto de rTcCRT y rHuCRT sobre la angiogénesis en el modelo *in vivo* de tapón de Matrigel en ratón.

500µl de Matrigel, que contiene 300ng de bFGF (para promover la infiltración de células endoteliales), fueron inoculados por vía subcutánea a ratones C57BL/6. Siete días más tarde, fue posible diseccionar y analizar los tapones, tanto inmunológica e histológicamente. Además, los anticuerpos mono y policlonales, anti-TcCRT y anti-HuCRT reconocieron las proteínas recombinantes en extracto proteico de tapón de Matrigel. rHuCRT y rTcCRT inhibieron la proliferación de células endoteliales promovido por bFGF en los tapones de Matrigel.

En síntesis, se demostró que TcCRT inhibe la migración de células endoteliales a una matriz fisiológica semisólida, tal como el Matrigel ubicado subcutáneamente en ratones. Dado que la migración de células endoteliales es un pre-requisito para la morfogénesis capilar, es muy probable que este ensayo se correlacione con la capacidad de inhibición que la molécula parasitaria ejerce *in vivo* sobre el crecimiento tumoral. Este es el primer estudio que define un efecto antiangiogénico para la calreticulina parasitaria, *in vivo* en mamíferos. Aun cuando, más indirectamente, este efecto podría correlacionarse con las propiedades antitumorales de *T. cruzi*, reportadas por otros laboratorios, y recientemente confirmadas en el LIAM.

ABSTRACT

Angiogenesis is the generation of new capillaries from pre-existing blood vessels. Physiologically, it occurs only exceptionally (chronic inflammation, menstrual cycle, wound healing, etc.), and it is a fundamental mechanism for tumor growth, beyond 2 mm³.

Calreticulin (CRT) is a multifunctional, highly conserved protein, expressed in all nucleated cells. Human CRT (HuCRT) and its N-terminal domain, vasostatin, interfere with angiogenesis, thus inhibiting endothelial cell proliferation. Previously, in the Laboratory of immunology of Microbial Aggression (LIAM), it has been described that *Trypanosoma cruzi* CRT (TcCRT) is antiangiogenic in the *in vivo* chick embryonic chorioallantoid membrane (CAM) assay. These properties are also expressed by TcCRT and its N-terminal domain, on arterial and venous endothelial cells from two mammal species, *Rattus rattus* and *Homo sapiens sapiens*, in *ex vivo* and *in vitro* assays. This effect correlates with capillary morphogenesis, proliferation and migration inhibition of endothelial cells and with TcCRT internalization by these cells, as also described in LIAM, in *in vitro* experiments.

The general aim of this study was to validate the antiangiogenic TcCRT results obtained *in vivo* in birds, as well as those generated *in vitro* and *ex vivo*, with several mammal species, using now an *in vivo* mammalian model. This is necessary since molecules regulating angiogenesis may act differently on different species. Matrigel is a soluble basement membrane preparation extracted from the Engelbreth-Holm-Swarm (EHS) mouse sarcoma. Among the *in vivo* angiogenesis assays, Matrigel plugs were used in this investigation, to test the following hypothesis: Given the antiangiogenic properties that TcCRT expresses on a variety of *in vitro* and *ex vivo* assays on mammal cells, as well as *in vivo* in birds, the parasite molecule will inhibit angiogenesis in the *in vivo* Matrigel plug assay in mammals (*Mus musculus*). The specific aims to satisfy this hypothesis are: **1.** To standardize the Matrigel plug *in vivo* assay in order to measure angiogenesis, **2.** To standardize the concentration of basic fibroblast growth factor

(bFGF) in Matrigel plugs, **3.** To determine the rTcCRT and rHuCRT presence in a protein extract obtained from Matrigel plugs and, **4.** To quantify the recombinant TcCRT (rTcCRT) and recombinant HuCRT (rHuCRT) effects on angiogenesis in the *in vivo* Matrigel plug assay in mice.

500µl of Matrigel, containing 300ng of bFGF (to promote endothelial cell infiltration), were inoculated subcutaneously to C57BL/6 mice. Seven days later, the plugs were dissected and immunologically and histologically analyzed. Mono and polyclonal antibodies, anti-TcCRT and anti-HuCRT recognized the recombinant proteins in a Matrigel plug protein extract. Both rHuCRT and rTcCRT inhibited endothelial cell proliferation promoted by bFGF in the Matrigel plugs.

In synthesis, was demonstrated that TcCRT inhibits endothelial cell migration to a semisolid physiological matrix, such as Matrigel, located subcutaneously in mice. Since endothelial cell migration is a pre requisite for capillary morphogenesis, it is very likely that this assay will correlate with the inhibitory capacity that the parasite molecule exerts on *in vivo* tumoral growth. This is the first study that defines an antiangiogenic effect for parasite calreticulin, *in vivo* in mammals. More indirectly, this effect could be correlated to the *T. cruzi* anti-tumor properties reported by other laboratories, and recently confirmed in LIAM.

INTRODUCCIÓN

La enfermedad de Chagas es una importante patología parasitaria endémica de 21 países de América. Investigadores soviéticos concluyeron hace más de 80 años que la infección con *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*) tiene un efecto “bioterapéutico” sobre el crecimiento de tumores sólidos en ratones. Usando, un modelo de tumor mamario experimental, estos resultados han sido reproducidos recientemente en el Laboratorio de Inmunología de la Agresión Microbiana (LIAM).

Calreticulina (CRT) es una proteína pleiotrópica, que reside en el retículo endoplásmico (RE). Aparte de su función captadora de calcio, en el retículo sarcoplásmico muscular, se le ha asignado 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 funciones.

Humanos, insectos, nemátodos, protozoos y plantas, son algunas de las especies de donde se ha aislado CRT, verificándose la notable conservación de la secuencia aminoacídica, en particular de algunos de sus dominios funcionales.

En el LIAM se ha clonado, secuenciado y expresado el gen que codifica Calreticulina de *T. cruzi* (*TcCRT*).

En el contexto de esta Memoria de Título, es importante considerar lo ya descrito en el LIAM en relación al efecto antiangiogénico de TcCRT y de su dominio N-terminal sobre células endoteliales, arteriales y venosas. Estos efectos se manifiestan en la inhibición de la morfogénesis capilar, de la proliferación y migración de células endoteliales, acompañado por la internalización de TcCRT por estas células.

Estas propiedades de TcCRT podrían explicar, al menos en parte, la resistencia relativa a ciertas agresiones por tumores, inducida por infecciones tripanosómicas.

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

Enfermedad de Chagas

La tripanosomiasis americana o enfermedad de Chagas, en homenaje a su descubridor el investigador brasileño Carlos Chagas, es una importante enfermedad parasitaria resultante de la infección por el protozoo hemoflagelado *Trypanosoma cruzi* (Lannes-Vieira, s.f.). La enfermedad se extiende desde el sur de E.E.U.U. (paralelo 42°, latitud Norte), hasta el sur de Chile y Argentina (paralelo 46°, latitud Sur), con un total de 21 países endémicos (World Health Organization, 2002; OPS/WHO/NTD/IDM, 2006).

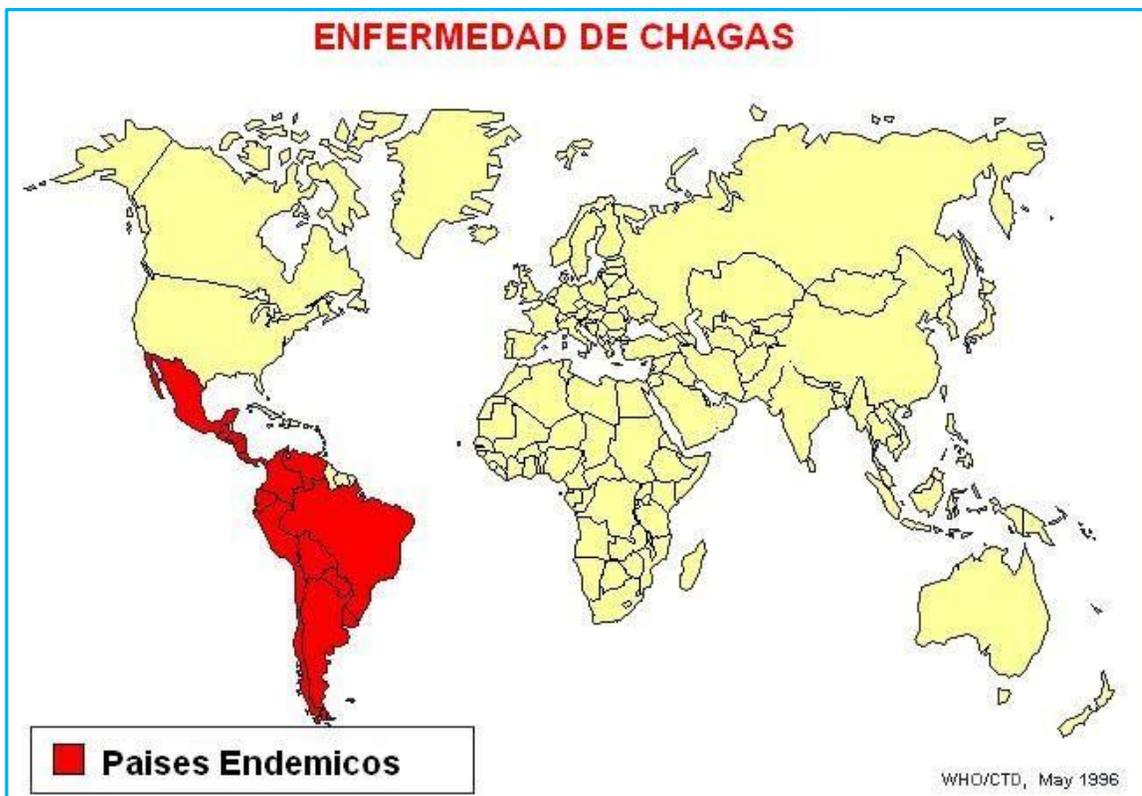


Figura 1: Distribución endémica de Enfermedad de Chagas en el mundo. Se indica con rojo los países que presentan Enfermedad de Chagas endémica (World Health Organization, 2002).

Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), existen 7.694.500 infectados por *T. cruzi* (OPS/WHO/NTD/IDM, 2006). Las tendencias epidemiológicas en los últimos 20 años revelan una reducción en la transmisión vectorial debido a los programas de control a gran escala, con modernos insecticidas piretroides, y al mejoramiento en las viviendas rurales. Esta disminución se ha observado en países como Chile, Uruguay, y recientemente Brasil, lo que ha contribuido a una reducción en la incidencia de la enfermedad en el continente (Prata, 2001; Moncayo, 2003). Las tasas de mortalidad varían entre 8 y 12% dependiendo del país estudiado, la edad, estado fisiológico de los pacientes y modalidad de tratamiento recibido (World Health Organization, 2002). Actualmente, en E.E.U.U., existe más del doble de individuos seropositivos que en Chile, principalmente en inmigrantes, siendo el riesgo mayor, la transmisión transplacentaria (Coura y Albajar, 2010).

El área endémica en Chile se extiende desde la Región de Arica y Parinacota hasta la Región de O'Higgins, incluyendo la Región Metropolitana. La población total de esta área corresponde a un 77% de la población del país pero, considerando que la enfermedad es más frecuente en áreas rurales y periurbanas, la población expuesta corresponde a 801.100 personas. El número de personas infectadas en esta área sería de 160.200 (Olea, 1998; OPS/WHO/NTD/IDM, 2006).

Se conocen tres principales vías de transmisión: **1.** Vectorial, forma clásica de transmisión en áreas endémicas y que consiste en una transmisión indirecta donde influyen factores tales como la pobreza, ruralidad, malas condiciones de la vivienda, temperaturas altas o moderadas y el clima seco; **2.** Transfusional, en Chile no se refieren casos de transmisión por esta vía desde el año 1985; **3.** Transplacentaria, transmisión por alimentos, lactancia materna y accidentes de laboratorio (Olea, 1998).

En el último informe del Ministerio de Salud sobre la enfermedad de Chagas en Chile se concluye, que la notificación de esta patología va en aumento, debido básicamente a dos factores: **1.** Desde 1986, la notificación, y desde 1996, el tamizaje en donantes son obligatorios y **2.** Debido al mayor interés en la patología desde 1991, ya que países del Cono Sur han incentivado diversos programas de control de transmisión vectorial y transfusional (Olea, 1998).

Trypanosoma cruzi

Protozoo hemoflagelado del orden Kinetoplastida, familia Trypanosomatidae, con un ciclo de vida indirecto, que tiene a insectos hematófagos (triatominos), como vectores biológicos, y como hospederos al humano y 150 especies de mamíferos, tanto silvestres como domésticos (Olea, 1998). Los principales triatominos vectores de *T. cruzi* en Sudamérica son *Triatoma infestans* (vinchuca), *Rhodnius prolixus* y *Panstrongylus megistus*. En Chile se encuentran *T. infestans* (ciclo domiciliario), *Mepraia spinolai* y *Mepraia gajardoi* (ciclo silvestre) (World Health Organization, 2002).

La migración de personas infectadas desde áreas endémicas hacia E.E.U.U. o Europa, en busca de oportunidades, ha provocado la transmisión de la enfermedad a través de transfusiones sanguíneas o trasplantes de órganos (Castro *et al.*, 2006).

Por otro lado, según lo reportado por la Organización Mundial de Salud, las tasas de mortalidad varían entre 8 y 12 % dependiendo del país, la edad, el estado fisiológico de los pacientes y la modalidad del tratamiento recibido (World Health Organization, 2002).

Durante su ciclo de vida, *T. cruzi* se adapta a los cambios medioambientales que enfrenta en sus hospederos artrópodos y mamíferos. Así, el parásito experimenta procesos de diferenciación celular, los que involucran cambios en su morfología, metabolismo y regulación del ciclo celular. Los triatominos se infectan al alimentarse de sangre de mamíferos portadores de tripomastigotes sanguíneos, forma no replicativa, responsable de diseminar la infección (Tyler y Engman, 2001). Estos ingresan al tracto digestivo del insecto y en su intestino medio se diferencian a epimastigotes, forma replicativa extracelular. Estos epimastigotes, a medida que avanzan en el medio intestinal, se replican, generando después de quince a treinta días los tripomastigotes metacíclicos. El insecto, inmediatamente después de alimentarse, deposita sobre la piel del mamífero sus deyecciones contaminadas con tripomastigotes metacíclicos, forma infectiva que atraviesa la piel por la zona de la picadura o a través de las mucosas, facilitado esto por rascado y por enzimas proteolíticas de la saliva del insecto (Amino *et al.*, 2002). Los tripomastigotes son fagocitados por células presentadoras de antígeno (Ag), diferenciándose a amastigotes, forma replicativa intracelular. Estos se

multiplican por fisión binaria repletando la célula hospedera, lisan las células infectadas, ingresan a la circulación e infectan a los tejidos blanco, como miocardio, músculo esquelético, músculo liso visceral, células de la glía del sistema nervioso central y placenta (Prata, 2001). El ciclo se completa cuando un triatomino no infectado ingiere sangre con tripomastigotes sanguíneos (Tyler y Engman, 2001).

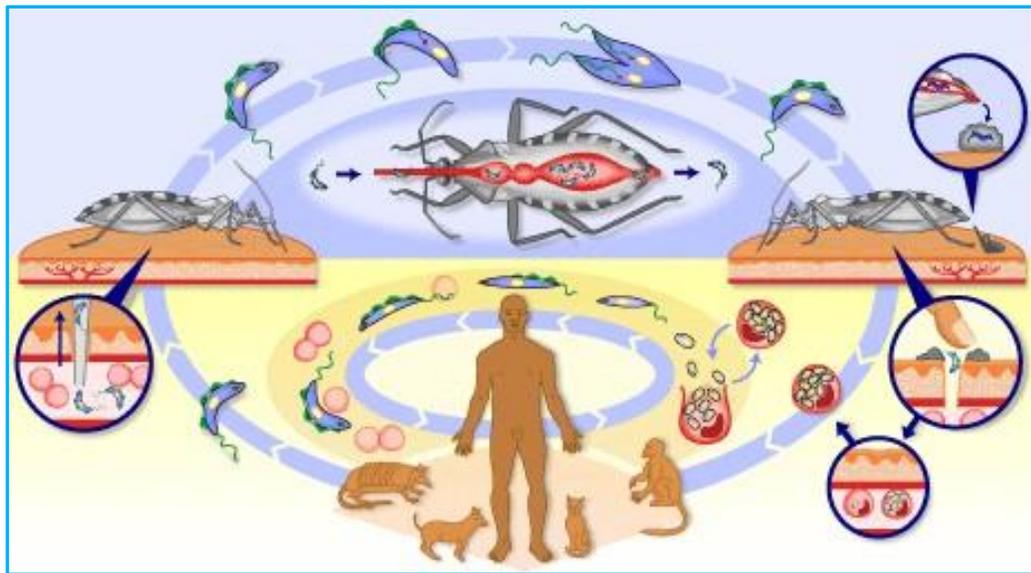


Figura 2: Ciclo de vida de *Trypanosoma cruzi*, agente causal de la Enfermedad de Chagas. El insecto vector (triatomino) al alimentarse de sangre de un individuo infectado con el parásito ingiere los tripomastigotes. Estos, a medida que avanzan por el tracto digestivo del insecto se diferencian a epimastigotes, multiplicándose quince a treinta veces. En el intestino posterior se diferencian nuevamente a tripomastigotes metacíclicos. Luego, el insecto deposita sus deyecciones sobre la piel del mamífero y los parásitos ingresan al individuo a través del sitio de la picadura o a través de las mucosas. Los tripomastigotes penetran células nucleadas y se diferencian a amastigotes multiplicándose repetidas veces. Luego, se diferencian a tripomastigote sanguíneos, lisan la célula, alcanzan la circulación y se diseminan por todo el organismo, quedando expuestos para que nuevamente sean ingeridos por un triatomino, así cerrando el ciclo biológico (World Health Organization, 2002).

La infección por *T. cruzi* tiene una fase aguda inicial que comienza inmediatamente después de la inoculación del parásito y puede durar varias semanas. Se caracteriza por una elevada parasitemia, debido a la intensa multiplicación parasitaria en células presentadoras de Ags y a la posterior liberación de tripomastigotes a la circulación periférica. En la mayoría de los casos, esta fase es asintomática, pero un porcentaje menor de los pacientes pueden presentar, Chagoma

de inoculación y signo de Romaña. Éste último consiste en edema bpalpebral unilateral, sin dolor, acompañado de conjuntivitis e inflamación del linfonodo local. Esto puede acompañarse de manifestaciones de infección generalizada tales como fiebre de 39 a 41°C, anorexia, linfadenopatías regionales, h pato y esplenomegalia moderada y miocarditis. Esta sintomatología es más frecuente en niños (Atías, 1998).

Sin tratamiento, el 5-10% de los pacientes sintomáticos muere a causa de encefalomiелitis o falla cardiaca severa y, raramente, por muerte súbita (Atías, 1998; Prata, 2001).

Los casos de infección aguda que no presentan manifestaciones clínicas pasan a una fase de latencia que puede extenderse por meses e incluso años. En esta fase los parásitos raramente pueden ser detectados en circulación sanguínea, ya que el grado de parasitemia es bajo (Soares *et al.*, 2001).

Los sobrevivientes a la infección aguda entran en una fase crónica que puede durar muchos años, sin llegar a ser causa *per se* de muerte. En áreas endémicas, entre el 15 y 20% de los pacientes manifiestan la fase crónica, de estos el 10 a 30% desarrollan miocarditis y mega síndromes. Entre los signos más tempranos de miocarditis está la aparición de alteraciones en el electrocardiograma (ECG), principalmente bloqueos de rama derecha del haz de His. La miocarditis es más frecuente en adultos jóvenes, con falla cardíaca por congestión biventricular, que frecuentemente se complica con tromboembolias pulmonares y sistémicas. El bloqueo auriculoventricular completo o arritmias ventriculares, pueden causar paro cardíaco súbito (Atías, 1998).

En el esófago se produce la disfunción del esfínter esofágico y desórdenes del peristaltismo causan disfagia, regurgitaciones, episodios recurrentes de neumonía por broncoaspiración y dilatación permanente del esófago (megaesófago). El megacolon se caracteriza por períodos prolongados de estreñimiento y ocasionalmente obstrucción intestinal y vólvulos (Atías, 1998). En esta etapa, la enfermedad puede ser inhabilitante y causa directa o concurrente de mortalidad. El curso de la enfermedad depende de diferentes factores: carga parasitaria en el sitio de la inoculación, grupo genético y cepa del parásito, primoinfección o reinfección, estado inmunológico del hospedero y tipo de vector, entre otros factores (Coura, 2007).

El examen directo de sangre para buscar tripomastigotes sanguíneos, es útil, sobre todo en las dos primeras semanas posteriores a la infección (Atías, 1998). Infecciones crónicas requieren de procedimientos diagnósticos más sensibles con amplificación de parásitos por medio de reacción de polimerasa en cadena (PCR). Otra opción es el xenodiagnóstico que consiste en tener triatominos libres de infección y dejar que se alimenten desde el paciente clínicamente sospechoso, para luego examinar las deyecciones de las vinchucas, 30 y 60 días después, en busca de parásitos. La detección inmediata de enfermedad de Chagas crónica requiere de la demostración de anticuerpos (Ac) específicos anti-*T. cruzi* en suero de pacientes o en test basados en ácidos nucleicos, mediante la detección por PCR (Teixeira *et al.*, 2006).

Efecto antineoplásico de la infección chagásica

El investigador soviético Roskin inició un acercamiento diferente, a la terapia contra el cáncer, que él llamó bioterapia. Consistió en encontrar un agente biológico que promueva la destrucción selectiva de las células cancerígenas, sin dañar a las normales. En la década de 1920, al mismo tiempo que investigaba sobre el cáncer, Roskin había estudiado diferentes protozoos particularmente tripanosomas y concluyó, en 1931, que la infección con *T. cruzi* tuvo un efecto bioterapéutico en el crecimiento de carcinomas en ratones. Los tumores en los animales control (no infectados con el tripanosoma) crecieron más rápidamente que los tumores en los experimentales, y los ratones infectados con tripanosoma con tumores vivieron más que ratones infectados sin implantes (Roskin y Exemplarskaja, 1931; Oliveira *et al.*, 2001; Krementsov, 2009).

Roskin y Klyueva en 1937, a partir del *T. cruzi*, "sintetizaron un suero eficaz para disolver tumores en ratones", al cual denominaron "Preparación Tripanosoma". Las propiedades del suero fueron evaluadas durante 1939, mediante experimentos con animales de laboratorio, la probó en sí mismo y el ensayo clínico en tres pacientes con cáncer (Rivera, 2005). Los investigadores propusieron que estos resultados proporcionaron un concepto sólido para una terapia contra el cáncer. Los resultados se

publicaron y a partir de ese momento el paso a seguir era el desarrollo de otros ensayos clínicos, para lo cual se requería una preparación clínicamente estable (Bongard y Roskin, 1939; Roskin, 1939; Rivera, 2005).

A mediados de 1940, Klyueva desarrolló una preparación más activa que cualquier otra obtenida previamente. A fines de 1940, Klyueva y Roskin lograron desarrollar un método de extracción de un "suero anticáncer" a partir de *T. cruzi*. En 1941, los institutos de investigación donde trabajaban los Klyueva y Roskin fueron destruidos y debieron ser reubicados en Sverdlovsk; la investigación fue suspendida (Brantley, 2004).

En 1943, Klyueva y Roskin regresaron a Moscú y en febrero de 1945, reiniciaron su investigación. Realizaron mayores esfuerzos para producir la Preparación Tripanosoma que, a partir de ese momento se llamó Preparación KR (Klyueva y Roskin, 1946; Valier, 2004). Klyueva y Roskin fueron llevados ante la Corte de Honor en 1947 y allí fueron acusados de la venta del secreto de la Preparación KR a E.E.U.U. En 1951, fueron despedidos y su laboratorio fue cerrado (Cantor, 2003). En 1958, el Consejo de Ministros emitió una resolución donde recomendaba organizar la producción de la Preparación KR en uno de los laboratorios experimentales del Instituto Minzdrav. En 1961, Roskin murió. Ese mismo año, la Preparación KR fue producida y distribuida en las clínicas oncológicas en Rusia, bajo la denominación Antibiótico Cruzin (Rivera, 2005).

En 1971, Klyueva falleció y con ella desapareció el Antibiótico Cruzin. Ese mismo año, el medicamento fue retirado de la lista de preparaciones aprobadas por el Comité Estatal de Farmacología y su producción se canceló (Kremenstov, 2002).

En 1989 la Universidad Estatal de Moscú reinició la investigación sobre las propiedades antitumorales de *T. cruzi*, sin embargo, aun no se ha determinado la base molecular de este efecto (Kallnikova *et al.*, 2001; Rivera, 2005).

Quizás el interés internacional en este importante tema se vio opacado por la situación política que ocurrió simultáneamente en los Estados Unidos y la Unión Soviética, particularmente a inicios de la década del 50. La "Guerra Fría", con Joseph Stalin en la U.R.S.S y con Joseph McCarthy, en E.E.U.U., agravada por la crisis

nuclear que culminó con la ejecución de Julius y Ethel Rosenberg en este último país (Radosh y Milton, 1997), hizo que el tema de la relación entre *T. cruzi* y cáncer pasara a un cuasi olvido.

Angiogénesis

La angiogénesis, ó formación de nuevos vasos sanguíneos a partir de capilares pre-existentes, ocurre en procesos fisiológicos como la cicatrización o el ciclo reproductivo de la mujer, pero cuando se pierde su regulación, se asocia a patologías como la artritis, obesidad o cáncer. La angiogénesis parece estar controlada por un equilibrio de factores pro y antiangiogénicos que determinan el desplazamiento de un “switch” angiogénico hacia la activación o inhibición. Por lo tanto, la activación de la angiogénesis requiere niveles relativos aumentados de factores estimuladores y/o la disminución, también relativa, de los niveles de sus inhibidores naturales (Bergers y Benjamín, 2003).

La investigación en angiogénesis ha tenido un desarrollo explosivo, a nivel mundial, durante la última década y, en los últimos años, se han comenzado a utilizar factores inhibidores de la angiogénesis en un intento por controlar el crecimiento tumoral (Bergers y Benjamín, 2003).

Calreticulina (CRT)

Isoformas y expresión de Calreticulina

Calreticulina (CRT) fue aislada por Ostwald y MacLennan (1974), y fue clonada en 1989 (Fliegel *et al.*, 1989; Smith y Koch, 1989). A la fecha, el cDNA y los genes que codifican CRT han sido aislados de varios vertebrados, invertebrados y plantas superiores (Hawn *et al.*, 1993; Liu *et al.*, 1993; Chen *et al.*, 1994; Dresselhaus *et al.*, 1996; Crofts *et al.*, 1998; Labriola *et al.*, 1999). No se han encontrado genes para CRT en levaduras y procariontes. En humano y ratón se han detectado dos isoformas, con

53% (humano) y 49% (ratón) de identidad con la CRT identificada previamente en ambas especies (Persson *et al.*, 2002).

CRT es una proteína de 46 kDa con una secuencia señal N-terminal digerible y una señal de retención en el retículo endoplásmico Lys, Asp, Glu, Leu (KDEL) (Fliegel *et al.*, 1989).

El análisis estructural de CRT predice que la proteína contiene al menos tres dominios con propiedades funcionales específicas. La secuencia aminoacídica del dominio N-terminal globular es extremadamente conservada en todas las CRTs. Este dominio une Zn^{2+} , además contiene tres Cys, y esta ubicación es conservada desde plantas superiores hasta humanos (Michalak *et al.*, 1992). Dos de estos residuos forman un puente disulfuro, el que podría ser importante para el correcto plegamiento del dominio N-terminal (Matsuoka *et al.*, 1994).

El dominio P comprende una secuencia rica en prolina con tres repeticiones de la secuencia de aminoácidos PXXIXDPDAXKPEDWDE (repeticiones A), seguidas de tres repeticiones de la secuencia de aminoácidos GXWXPPXIXNPXYX (repeticiones B). Esta región une Ca^{2+} con alta afinidad, y en esta unión podrían ser esenciales las repeticiones aminoacídicas (Baksh y Michalak, 1991).

El dominio C-terminal es el menos conservado. Une Ca^{2+} con alta capacidad, es altamente ácido y termina con la señal de retención en el retículo endoplásmico KDEL (Michalak *et al.*, 1999).

La localización subcelular de CRT es amplia y no está completamente clara. Debido a su señal de retención en el RE, CRT originalmente era reconocida como una chaperona tipo lectina que residía únicamente en el lumen del RE (Ostwald y MacLennan, 1974), pero además se ha encontrado en el núcleo (Burns *et al.*, 1994), citoplasma (Holaska *et al.*, 2001), gránulos citotóxicos en linfocitos T (Dupuis *et al.*, 1993), suero sanguíneo (Sueyoshi *et al.*, 1991), el espacio extracelular de varios tipos celulares (Eggleton *et al.*, 1994; Booth y Koch, 1989), y se encuentra también en la superficie de la mayoría de las células mamíferas (Arosa *et al.*, 1999; White *et al.*, 1995; Basu y Srivastava, 1999; Ferreira *et al.*, 2004a). Se ha determinado su presencia

en saliva humana (Bigler y Streckfus, 2004; Coddou *et al.*, 2010) y en glándula salival de algunos parásitos (Jaworski *et al.*, 1996; Weinberger *et al.*, 2010).

Estas localizaciones subcelulares son posibles gracias a una retrotranslocación de CRT desde el RE al citosol. Se ha descrito que 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).

Funciones de CRT

CRT ha sido implicada en muchas funciones celulares asociadas a los distintos dominios de esta proteína, siendo las principales y más conocidas la unión a Ca^{2+} y el actuar como chaperona en el lumen del RE, aunque se han descrito varias funciones más, fuera del RE. CRT funciona como chaperona tipo lectina para muchas proteínas (Krause y Michalak, 1997), está involucrada en el proceso de control de calidad durante la síntesis de una variedad de moléculas, como canales iónicos, receptores de superficie, integrinas y transportadores (Zhang *et al.*, 1997). El sitio de unión tipo lectina de CRT se localiza en el dominio P, y la unión a Ca^{2+} en este dominio es esencial para esta función (Vassilakos *et al.*, 1998).

En cuanto a la unión de Ca^{2+} , CRT aumenta la capacidad de almacenamiento de este ión en el RE (Nash *et al.*, 1994).

La sensibilidad a la concentración de Ca^{2+} está confinada al dominio C-terminal de CRT, sugiriendo que podría actuar como un sensor en el lumen del RE (Corbett *et al.*, 1999).

CRT también modula la adhesividad celular al interactuar con integrinas, mientras las células se adhieren (Coppolino y Dedhar, 1999). Además de su acción directa sobre integrinas, CRT podría modular la adhesividad celular al regular la expresión génica de moléculas relacionadas con la adhesión (Opas *et al.*, 1996; Fadel *et al.*, 1999).

CRT en la superficie de células apoptóticas funciona como una señal de reconocimiento y remoción a través de la activación del receptor LRP1 en la superficie

celular de fagocitos (Gardai *et al.*, 2005). CRT juega un papel clave en la respuesta inmune antitumoral. En células de cáncer de colon de ratón CT26, antraciclinas inducen una rápida translocación preapoptótica de CRT a la superficie celular. Allí CRT genera un “eat me signal”, ya sea directamente o, entre otras posibilidades, reclutando C1 del sistema del complemento. El bloqueo de CRT suprime la fagocitosis de células tumorales tratadas con antraciclinas por células dendríticas y suprime su inmunogenicidad en ratón (Obeid *et al.*, 2007).

CRT y angiogénesis

Calreticulina humana (HuCRT) inhibe la angiogénesis y el crecimiento tumoral en varios modelos *in vivo*. Se han propuesto dos mecanismos para explicar este fenómeno. CRT se une a laminina e inhibe la adhesión de células endoteliales a esta proteína. Tres fragmentos derivados de HuCRT (aa 120-180, aa 1-180 o vasostatina, y aa 120-400 o D120CRT), así como toda la molécula, inhiben la proliferación de células endoteliales, la generación de nuevos vasos sanguíneos y el crecimiento tumoral (Pike *et al.*, 1999).

Calreticulina de *Trypanosoma cruzi*

Como se mencionó previamente, la expresión de CRT ha sido descrita en variados parásitos. Este hecho, unido al alto grado de conservación de dominios funcionales de la proteína, sugieren que CRT podría tener roles importantes en la biología del parásito y en su interacción con hospederos vertebrados (Ferreira *et al.*, 2004a). Se trata de una proteína vital pues, la inactivación de su gen, en el modelo murino, conduce a muerte embrionaria, durante el segundo tercio gestacional (Guo *et al.*, 2002).

En 1991, en el Laboratorio de Inmunología de la Agresión Microbiana (LIAM), donde se realizó esta Memoria de Título, se identificó un Ag inmunogénico de *T. cruzi*, que fue designado como Tc45, una proteína de 45 kDa. El gen que codifica a Tc45 se

ha clonado, secuenciado, expresado y se concluyó que se trata de Calreticulina de *T. cruzi* (TcCRT) (Molina *et al.*, 2005).

TcCRT y angiogénesis

TcCRT es una molécula de 45 kDa (Ramos, *et al.*, 1991), electroforéticamente dimórfica y posee un segmento que tiene 46% de identidad y 60% de homología con el fragmento antiangiogénico funcional de HuCRT (aa 120-180), lo que llevó a un estudio sobre sus propiedades antiangiogénicas. En ensayos en membrana corioalantoidea de pollo (ensayo CAM), tanto TcCRT recombinante como la molécula nativa mostraron una inhibición significativa de la angiogénesis, incluso a muy bajas concentraciones (del orden de picogramos por membrana implantada). Además, se observó inhibición de la angiogénesis con TcCRT sintetizada *in situ*, después de la administración de la construcción plasmidial pSecTag2B/TcCRT (Molina *et al.*, 2005).

En ensayo *ex vivo* de anillos aórticos de rata, se observa crecimiento capilar. La incubación de los anillos con TcCRT 1 μ M inhibió completamente este crecimiento. TcCRT tiene un efecto antiangiogénico dosis-dependiente, hasta alcanzar una completa inhibición. El dominio vasostático de TcCRT (N-TcCRT) muestra el mismo efecto inhibitorio que la molécula completa, en este modelo experimental (López *et al.*, 2010).

El ensayo de morfogénesis en Matrigel, entrega información acerca de la habilidad de las células endoteliales de reorganizarse y diferenciarse en estructuras tipo capilar. TcCRT interfiere fuertemente con este proceso. Células endoteliales de cordón umbilical humano (HUVEC) no tratadas (control) formaron la típica red celular luego de 5 horas de sembradas. Aunque un efecto fuertemente inhibitorio se observó con HuCRT 1 μ M, cuando TcCRT y N-TcCRT fueron comparadas con HuCRT en forma equimolar, los efectos de las moléculas parasitarias fueron más potentes que el de la contraparte humana (López *et al.*, 2010).

Aunque TcCRT contiene una señal KEDL, de retención en el RE, y carece de un dominio transmembrana, ha sido detectada en la superficie de tripomastigotes, amastigotes y epimastigotes (Ferreira *et al.*, 2004a; Souto-Padron *et al.*, 2004). Además podría ser liberada de la célula mediante un proceso secretorio activo o por muerte celular, ya que se ha localizado CRT en la vía secretoria de varios organismos, incluidos parásitos (Ferreira *et al.*, 2004a; Suchitra y Joshi, 2005). La propiedad antiangiogénica de TcCRT, junto a la accesibilidad de la molécula, ya sea en la superficie del parásito o por su secreción en el hospedero, podrían explicar, al menos en parte, el efecto antineoplásico de la infección con *T. cruzi*.

Debido a que las moléculas que regulan la angiogénesis pueden comportarse en forma diferente en distintas especies, es de gran importancia validar los resultados obtenidos en el ensayo CAM con TcCRT, en particular, *in vivo*, en mamíferos. Dentro de los ensayos *in vivo* descritos está el modelo de tapón de Matrigel en ratón (Maeshima *et al.*, 2001).

HIPÓTESIS

Basados en los antecedentes anteriores, proponemos la siguiente Hipótesis:

Dadas las propiedades antiangiogénicas que TcCRT expresa en una variedad de ensayos *in vitro* y *ex vivo*, en células mamíferas y, también *in vivo* en aves, entonces, TcCRT inhibirá la angiogénesis en el modelo *in vivo* de tapón de Matrigel en mamíferos (*M. musculus*).

OBJETIVO GENERAL

Contribuir a la comprensión de los términos moleculares que rigen las interacciones hospedero/parásito, al determinar la capacidad de la calreticulina de *Trypanosoma cruzi* para inhibir la angiogénesis, en un modelo mamífero.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Estandarizar el ensayo de tapón de Matrigel *in vivo* para medir angiogénesis.
2. Estandarizar la concentración de factor de crecimiento fibroblástico básico (bFGF) por tapón de Matrigel.
3. Determinar la presencia de rTcCRT y rHuCRT en extracto proteico de tapones de Matrigel (EPM).
4. Cuantificar el efecto de rTcCRT y rHuCRT sobre la angiogénesis en el modelo *in vivo* de tapón de Matrigel en ratón.

MATERIAL Y MÉTODOS

MATERIALES

Reactivos Biológicos

Anticuerpo monoclonal de ratón anti-TcCRT E2G7. Sueros policlonales de conejo anti-TcCRT y anti-HuCRT (Aguilar *et al.*, 2005). TcCRT recombinante (Aguillón *et al.*, 2000). HuCRT recombinante. Producidos en el Laboratorio de Inmunología de la Agresión Microbiana (LIAM), Programa Disciplinario de Inmunología, Instituto de Ciencias Biomédicas (ICBM), Facultad de Medicina de la Universidad de Chile.

Ratones

C57BL/6, hembras, 6 semanas de edad, del Bioterio Central del Instituto de Ciencias Biomédicas, Facultad de Medicina, Universidad de Chile.

Reactivos Comerciales

Anticuerpo monoclonal de ratón anti-HuCRT (BD Biosciences).

Anticuerpo de rata anti-CD31 de ratón (PECAM-1/CD31, Clon ER-MP12) (Cell Sciences®).

Anticuerpo de conejo anti-Ig (H+L) de rata biotinilado (Vector Laboratories Inc.).

Matrigel reducido en factor de crecimiento: BD Matrigel™, Basement Membrane Matrix, Growth Factor Reduced (BD Biosciences), Basement Membrane extract, Growth Factor Reduced (Culturex).

Reactivos comerciales y equipos (**Anexo 1**).

MÉTODOS

1. Estandarización del ensayo de tapón de Matrigel *in vivo* para medir angiogénesis.

Inoculación de Matrigel

El Matrigel es una preparación de membrana basal solubilizada extraída del sarcoma de ratón Engelbreth-Holm-Swarm (EHS). Éste es un tumor rico en proteínas de matriz extracelulares. Sus principales componentes son la laminina, seguida de colágeno IV, entactina y heparan sulfato. Mantenido a 4°C, se encuentra en estado líquido, mientras que a 37°C, se gelifica (Akhtar *et al.*, 2002; Ohashi *et al.*, 2006). Por ello, 24 h antes de la inoculación todo el material plástico utilizado para la preparación de los implantes fue mantenido a -20°C (tubos Eppendorf, puntas y jeringas).

Los implantes de Matrigel (500µl) se inocularon subcutáneamente, utilizando jeringas para insulina, en la zona lumbosacra, en ratones hembras C57BL/6, de 6 semanas. Después de la inyección, el Matrigel gelifica y forma un tapón subcutáneo.

Obtención Muestra de Matrigel desde tapones implantados *in vivo*

Luego de 7 días, los ratones fueron sacrificados por dislocación cervical y el tapón se localizó por palpación. Se disecó la piel alrededor del tapón en un perímetro de 5 cm aproximadamente, con tijeras Metzenbaum recta, bajo lupa, con hojas de bisturí número 22, pinzas de disección anatómica y quirúrgica, tijeras Mayo y Westcott rectas. Finalmente fueron lavados con PBS 1X.

2. Estandarización de la concentración de factor de crecimiento fibroblástico básico (bFGF) por tapón de Matrigel.

Se cuantificó la infiltración de células endoteliales por análisis histológico de rutina e inmunohistoquímica.

Inoculación de Matrigel

Los grupos experimentales corresponden a 75, 150 y 300ng de bFGF, (Sgadari *et al.*, 1996; Naumova *et al.*, 2006), en 500 μ l por tapón de Matrigel. Como control se usó Matrigel con volumen equivalente de PBS 1X.

Muestras histológicas

Los tapones de Matrigel fueron fijados en formaldehído 4% v/v, en tampón fosfato pH 7,3 durante 24 h. Posteriormente, fueron lavados en agua corriente durante 2 h, deshidratados mediante inmersión en concentraciones crecientes de etanol (ETOH) (80%, 90%, 95%, 100%, 100%,100%),10 min cada vez, aclarados en xilol 100% 3 veces durante 15 min e incluidos en parafina fundida a 60°C (Bancroft y Gamble, 2008; Kiernan, 2008). Posteriormente, se obtuvieron cortes de 5 μ m de espesor, para técnicas histológicas de rutina e inmunohistoquímicas. Los cortes fueron colocados en portaobjetos silanizados con carga positiva (Superfrost® plus, Thermo scientific) y sometidos a las diferentes técnicas descritas más abajo.

Tinción Hematoxilina-eosina

Este método fue utilizado para el análisis histológico de rutina. La hematoxilina es un colorante básico que tiñe estructuras basófilas de color azul-violeta oscuro. La eosina es un colorante ácido que tiñe estructuras acidófilas de color rojo o rosado (Bancroft y Gamble, 2008; Kiernan, 2008).

Los cortes fueron teñidos por 2 min en hematoxilina de Mayer, lavados en agua corriente por 5 min, seguido de lavados en agua destilada (H₂O_d) por 2 min, teñidos en eosina acuosa al 10% acidificada con ácido acético glacial por 3 min y enjuagados con H₂O_d (Bancroft y Gamble, 2008; Kiernan, 2008).

Posteriormente, los cortes teñidos fueron desparafinados en xilol 100%, 3 veces por 15 min, e hidratados en concentraciones decrecientes de ETOH (100%, 100%, 100%, 95%, 80%,70% y H₂O_d), por 10 min cada vez. Los preparados fueron montados con Entellan (Merck®) (Kiernan, 2008; Bancroft y Gamble, 2008), observados en un microscopio (Nikon, Optiphot-2 o Leitz Wetzlar) y las imágenes fueron capturadas con un equipo de digitalización (Canon Powershot SX100 15) acoplado al microscopio.

Inmunohistoquímica

Se utilizó el kit ABC-R.T.U Vectastain Universal® (ScyTek, ACA) para la técnica de inmunoperoxidasa.

Los cortes desparafinados fueron incubados con bloqueador de peroxidasas endógenas (ScyTek, ACA) y suero normal equino R.T.U al 2,5% v/v (ScyTek, ACA). La dilución de los Ac, tiempo y temperatura óptima de incubación fueron determinados experimentalmente en el laboratorio:

El AcMo primario anti-PECAM-1/CD31 (Cell Sciences® HM1084), para el reconocimiento específico de los endotelios, se usó 1:50 v/v, en diluyente para Ac (UltraClean Diluent, Thermo Scientific), durante 20 h a 4°C.

Posteriormente, las muestras fueron incubadas con un Ac secundario biotilado Anti-IgG de Rata (H+L) (Vector Laboratories, Inc. BA-4000), 1:50 v/v, en diluyente para Ac (UltraClean Diluent, Thermo Scientific), durante 2 h y el complejo Ag-Ac, revelado con el cromógeno diamino benzidina (DAB). El contraste nuclear se realizó con Hematoxilina de Mayer. La detección de estos Ags se realizó post-tratamiento de recuperación de Ag mediante incubación en un tampón citrato de sodio (Antigen Unmasking Solution®, ScyTek, ACA), a 100°C, durante 60 min, en una Vaporera Oster® (Modelo 5711-052, Oster).

Cuantificación de Angiogénesis

Las muestras se observaron al microscopio, se contaron células endoteliales por campo, en 100 campos, seleccionados al azar, por cada grupo experimental.

3. Determinación de la presencia de rTcCRT y rHuCRT en extracto proteico de tapones de Matrigel (EPM).

Este objetivo se realizó mediante una inmuno electrotransferencia (IWB).

Extracción proteica tapones de Matrigel

Se inoculó Matrigel líquido con bFGF y rTcCRT (1µg/ml) o rHuCRT (1µg/ml), para llevarlos a un volumen final de 500µl. La obtención de los tapones se realizó como se describe en el método para obtener el Objetivo Especifico 1. Posteriormente, se realizó un extracto proteico del Matrigel obtenido (EPM). Para ello, se agregaron 500µl de buffer de lisis con inhibidor de proteasas (Complete, Mini, EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail Tablets provided in *EASYpack*, Roche), las muestras fueron sonicadas (Microson™ XL2000, Misonix), a nivel 5, por 1 min. Luego se incubaron por 10 min en hielo, se centrifugaron a 16170 g, por 30 min a 4°C. El sobrenadante fue transferido a un tubo limpio.

Cuantificación de proteínas totales

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

Electroforesis

Se prepararon geles de poliacrilamida al 10% de 1,5 mm de grosor en presencia de dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE) y en condiciones reductoras. Como gel separador se utilizó una solución de acrilamida al 30% p/v, agua desionizada, solución tampón Tris-HCl (pH 8,8), persulfato de amonio (PSA) al 10% p/v y N,N,N',N'-Tetrametiletilendiamina (TEMED) 0,065% v/v. Una vez polimerizado este, a temperatura ambiente, se preparó sobre él, el gel concentrador ("stacking"), utilizando los mismos reactivos anteriormente mencionados, pero a 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 hervidas durante 5 min. La electroforesis se realizó en una cámara Bio-Rad a 100 V, a temperatura ambiente (Laemmli, 1970).

Las muestras cargadas fueron 20 μ g de proteínas totales de EPM. También se corrió en los geles, 10 ng de rTcCRT y 10 ng de rHuCRT. Estos controles fueron útiles para determinar posición electroforética. Los geles fueron teñidos con azul de Coomasie. La réplica del gel fue sometida a transferencia.

Transferencia

Las proteínas separadas mediante electroforesis fueron transferidas a una membrana de nitrocelulosa (Hybond-ECL, Amersham), en un sistema húmedo estándar durante 60 min a 100 V, a 4°C (Bio-Rad). Luego, la membrana se bloqueó en PBS-leche al 5%, durante toda la noche a 4°C. (Towbin *et al.*, 1979). Posteriormente, esta fue incubada con Acs primarios policlonales (AcPos) (anti-TcCRT o anti-HuCRT), y Ac monoclonales (AcMos) (anti-TcCRT o anti-HuCRT), según el caso, durante 90 min a temperatura ambiente. A continuación, se lavó e incubó con un Ac secundario (Ac de cabra anti-Ig de conejo o ratón), conjugado a fosfatasa alcalina (DAKO), en las mismas condiciones que el anterior. Finalmente, fue revelado con sustrato para fosfatasa

alcalina (NBT: Nitro Blue Tetrazolium, BCIP: Fosfato 5-bromo-4-cloro-indol, Sigma, y buffer para fosfatasa alcalina).

4. Cuantificación del efecto de rTcCRT y rHuCRT sobre la angiogénesis en modelo *in vivo* de tapón de Matrigel en ratón.

Este objetivo se realizó mediante la cuantificación de la infiltración de células endoteliales por análisis histológico de rutina e inmunohistoquímica, como se describe en el método para obtener el Objetivo Especifico 2.

Inoculación de Matrigel con CRT

Los grupos experimentales fueron Matrigel líquido con bFGF 300ng/tapón y rTcCRT (1µg/ml),o rHuCRT (1µg/ml) y como grupos controles Matrigel con bFGF o volumen equivalente de PBS 1X, en 500µl.

Análisis estadístico

Los resultados se expresaron como promedio más desviación estándar o error estándar, según corresponda. La significancia de las variables cuantitativas se evaluó mediante ANDEVA de una cola.

Los experimentos se realizaron en triplicado en tres oportunidades distintas.

Consideraciones Bioéticas

Todos los procedimientos con animales experimentales se realizaron de acuerdo con el “Guide to the Care and Use of Experimental Animals”, (Olfert *et al.*, 1993) y cuenta con la aprobación del Comité de Bioética Sobre Investigación en Animales, Facultad de Medicina. Universidad de Chile (**Anexo 2**). Los animales

proviene del Bioterio Central de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile y se mantuvieron en una de las Unidades Experimentales del Bioterio LIAM. Todo el sistema contó con supervisión Médico Veterinaria permanente.

RESULTADOS

1. Estandarización del ensayo de tapón de Matrigel *in vivo* para medir angiogénesis.

El inoculo de Matrigel fue preparado a 4°C, aplicándose exitosamente un tapón de 500µl en el tejido subcutáneo dorsal de cada individuo (ratones C57BL/6 hembras de seis semanas) (**Fig. 3A**). Luego de 7 días, los animales fueron sacrificados. Se obtuvo tapones íntegros desde todos los individuos inoculados, los que pesaron, en promedio, 150mg cada uno (**Fig. 3D**).

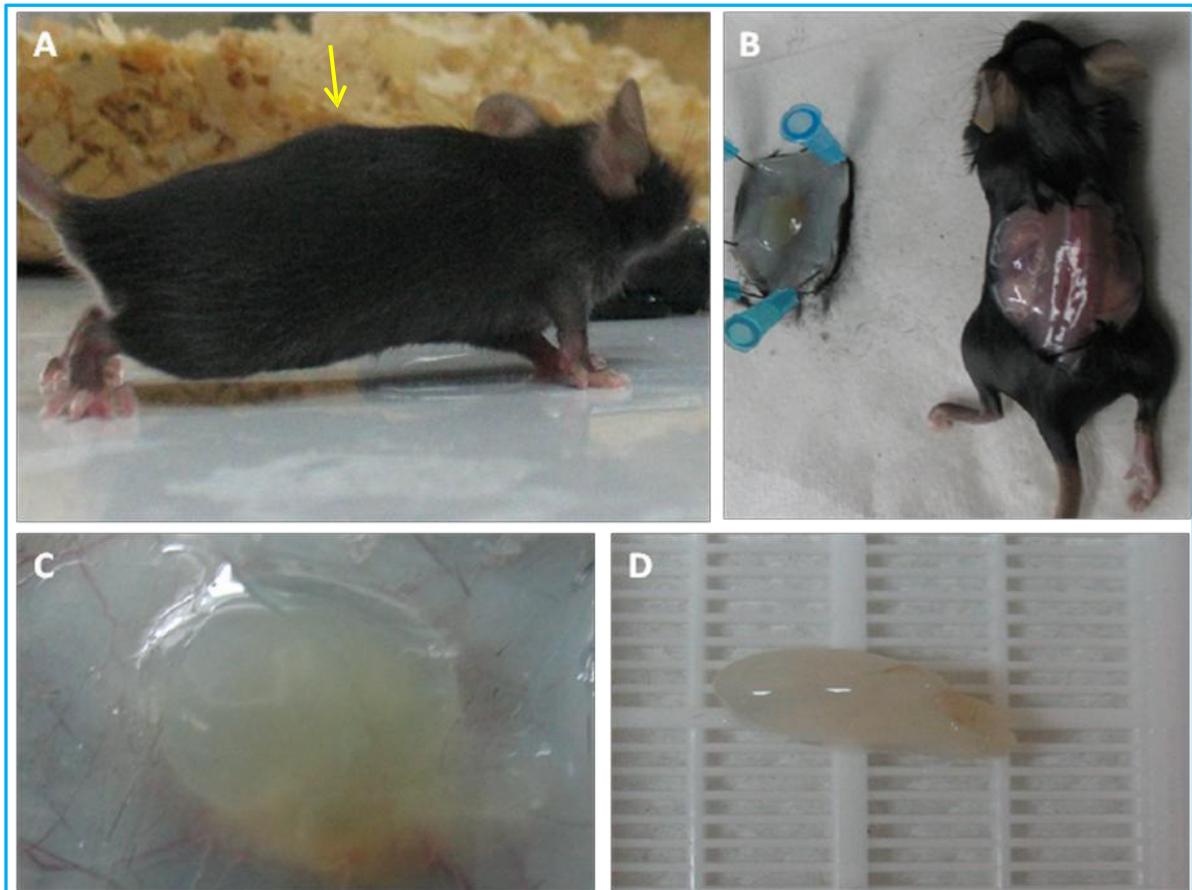


Figura 3: Obtención de tapón de Matrigel para análisis histológico e inmunológico. (A) Visión macroscópica del implante 7 días post inoculación en tejido subcutáneo de ratones C57BL/6 (flecha); **(B)** Disección de tapón de Matrigel; **(C)** Cara interna del tapón y **(D)** Tapón post fijación con formalina tamponada.

2. Estandarización de la concentración de factor de crecimiento fibroblástico básico (bFGF) por tapón de Matrigel.

En el examen macroscópico de los implantes no detecto diferencias en peso (aproximadamente 150mg en todos los tratamientos) ni número de vasos sanguíneos en la piel y tejido subcutáneo adyacente.

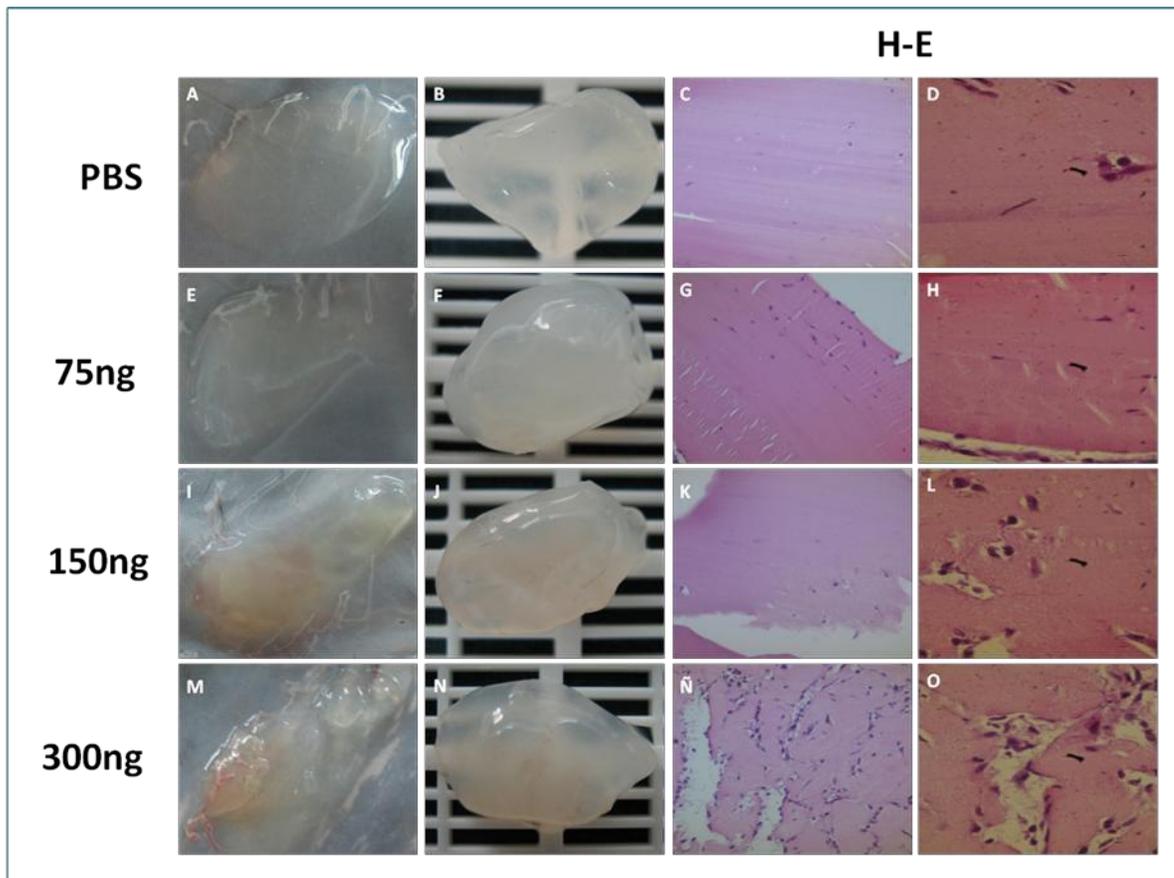


Figura 4: El bFGF promueve la infiltración de células endoteliales, en tapones de Matrigel inoculados subcutáneamente en ratones C57BL/6. Experimento confirmatorio. Se probó 0 (A-D), 75 (E-H), 150 (I-L) y 300ng (M-O) de bFGF por tapón. Las observaciones se realizaron en tejido subcutáneo fresco (A,E,I,M); tapones post fijación (B,F,J,N); cortes de tapón teñidos con H-E y observados a 40X (C,G,K,Ñ) y 100X (D,H,L,O).

La inmunodetección con AcMo Anti-PECAM-1/CD31 de ratón (Cell Sciences® HM1084) evidenció que la infiltración celular dentro de los implantes son células endoteliales y no otro tipo celular (**Fig. 5, flechas ejemplifican la inmunodetección**).

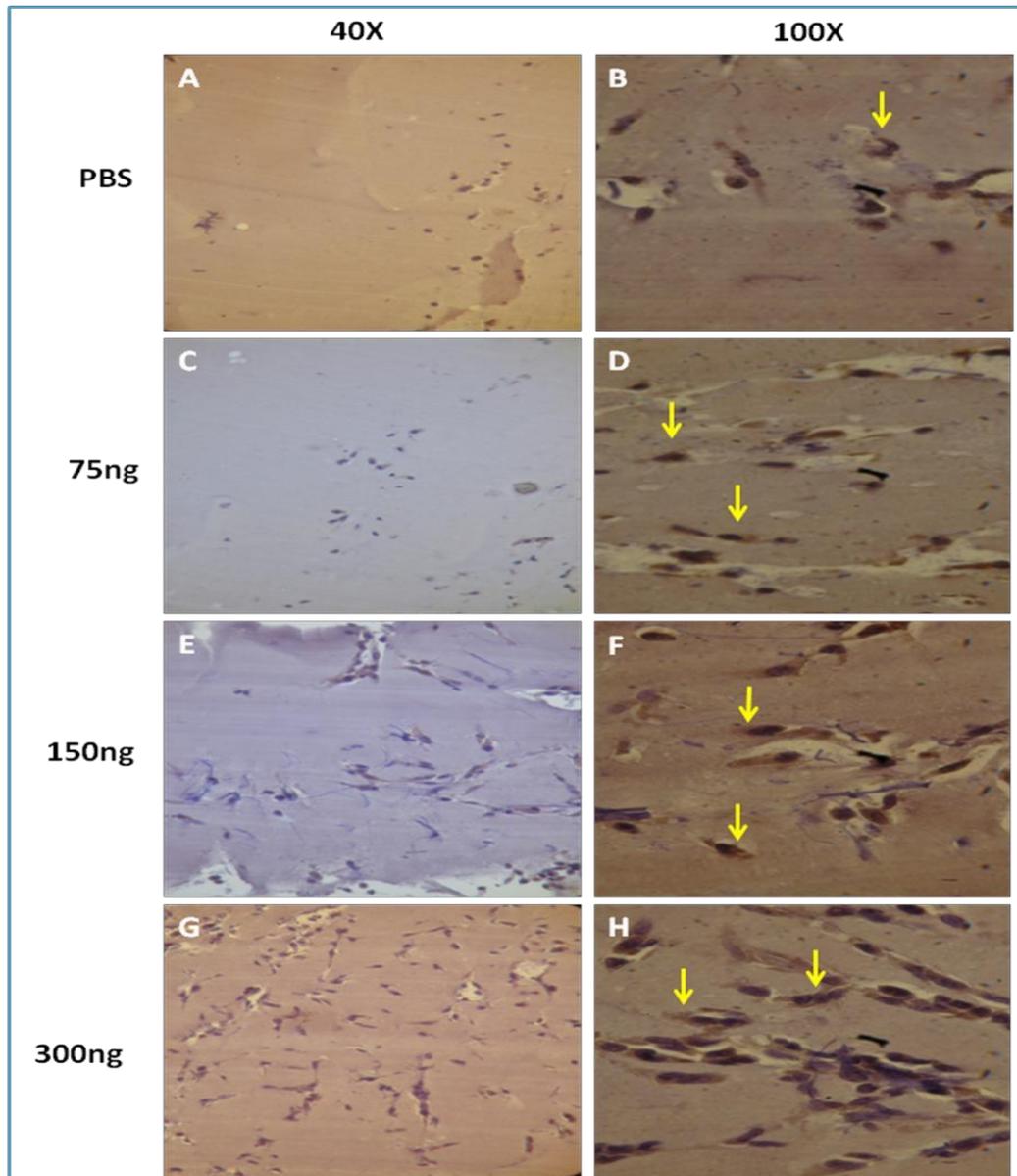


Figura 5: Las células que infiltran los tapones de Matrigel subcutáneo en ratones C57BL/6 son de naturaleza endotelial. Las flechas muestran Inmunorreactividad con Ac Anti-PECAM-1/CD31 en tapones con PBS 1X (A,B) o con 75 (C,D), 150 (E,F) y 300ng de bFGF (G,H).

De cada grupo se procesaron cortes representativos de todo el tapón tomándose 100 campos al azar, a un aumento 100X, para cuantificar el número de células endoteliales. Estos cortes fueron observados al microscopio (Nikon, Optiphot-2 o Leitz Wetzlar) y las imágenes fueron capturadas con un equipo de digitalización (Canon Powershot SX100 15), acoplado al microscopio.

La Figura 6 muestra que, solo en los implantes con 300ng de bFGF/tapón, se observó diferencias significativas en el número de células endoteliales infiltradas, con respecto al control (ANDEVA de una cola).

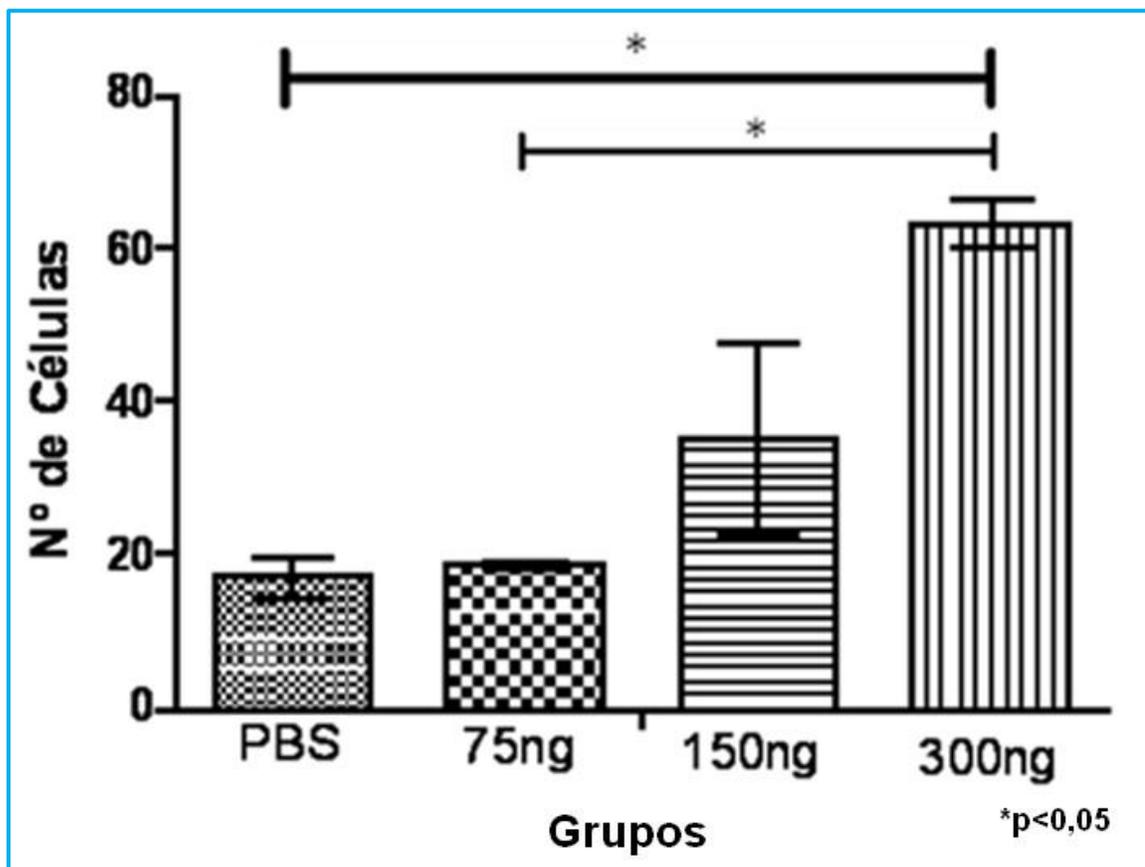


Figura 6: El factor de crecimiento fibroblástico (bFGF) promueve la infiltración de células endoteliales en tapones de Matrigel subcutáneos. Cada columna representa la cuantificación del promedio de 100 lecturas por grupo. Las barras representan desviaciones estándar.

3. Determinación de la presencia de rTcCRT y rHuCRT en EPM.

1 μ l de EPM mezclado con bFGF y rTcCRT ó rHuCRT (1 μ g/ml de Matrigel) contienen 7,3 μ g ó 1,6 μ g de proteínas totales, respectivamente.

- **Reconocimiento de rTcCRT y rHuCRT en EPM con Anticuerpos policlonales.**

Los AcPOs anti-TcCRT y anti-HuCRT, 1:1.000, reconocieron bandas proteicas de 58 y 50 kDa, en los EPMS con rTcCRT y rHuCRT, respectivamente (**Fig. 7B y C**).

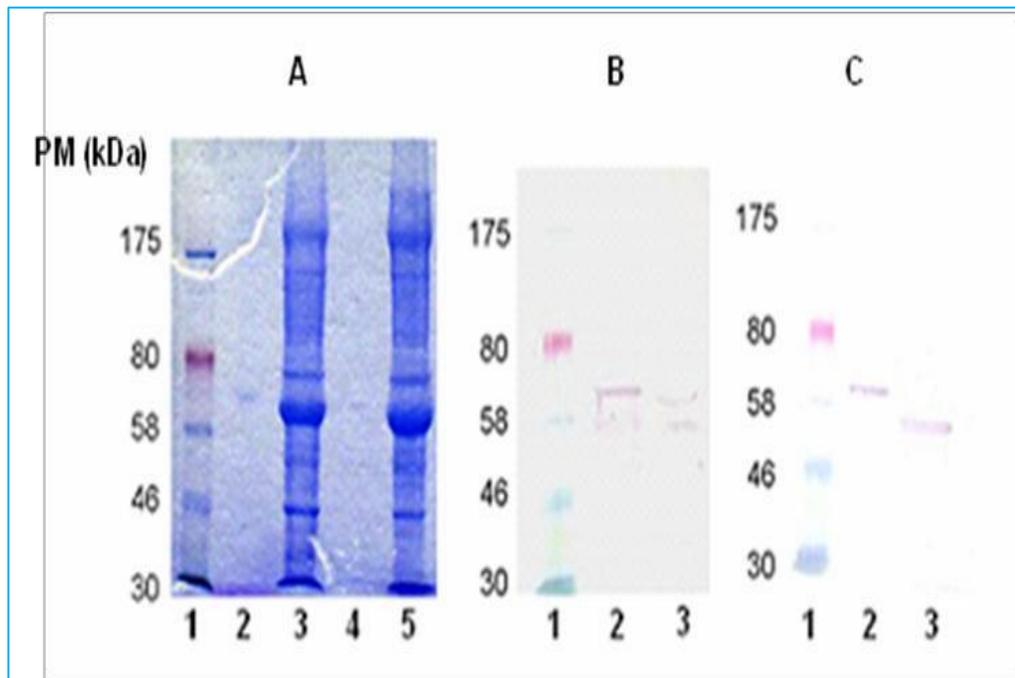


Figura 7: Anticuerpos policlonales anti-TcCRT y anti-HuCRT reconocen las calreticulinas respectivas en EPMS. (A) SDS-PAGE al 10%. Carril 1: Estándar de PM; 2: 10 ng de rTcCRT; 3: 20 μ g de EPM, con bFGF y rTcCRT; 4: 10 ng de rHuCRT, 5: 20 μ g de EPM, con bFGF y rHuCRT. **(B)** IWB. Carril 1: marcador de PM; 2: 10 ng de rTcCRT; 3: 20 μ g de EPM, con bFGF y rTcCRT Revelado con AcPo anti-TcCRT y como Ac secundario Ig de cabra anti-Ig de conejo. **(C)** IWB. Carril 1: marcador de PM; 2: 10 ng de rHuCRT; 3: 20 μ g de EPM, con bFGF y rHuCRT. Revelado con AcPo anti-HuCRT y como Ac secundario Ig de cabra anti-Ig de conejo.

- **Reconocimiento de rTcCRT y rHuCRT en EPMs con Anticuerpos monoclonales.**

Los AcMos anti-TcCRT y anti-HuCRT, 1:1.000, reconocieron bandas proteicas de 58 y 50 kDa, en los EPMs, correspondientes a rTcCRT y rHuCRT, respectivamente (Fig. 8).

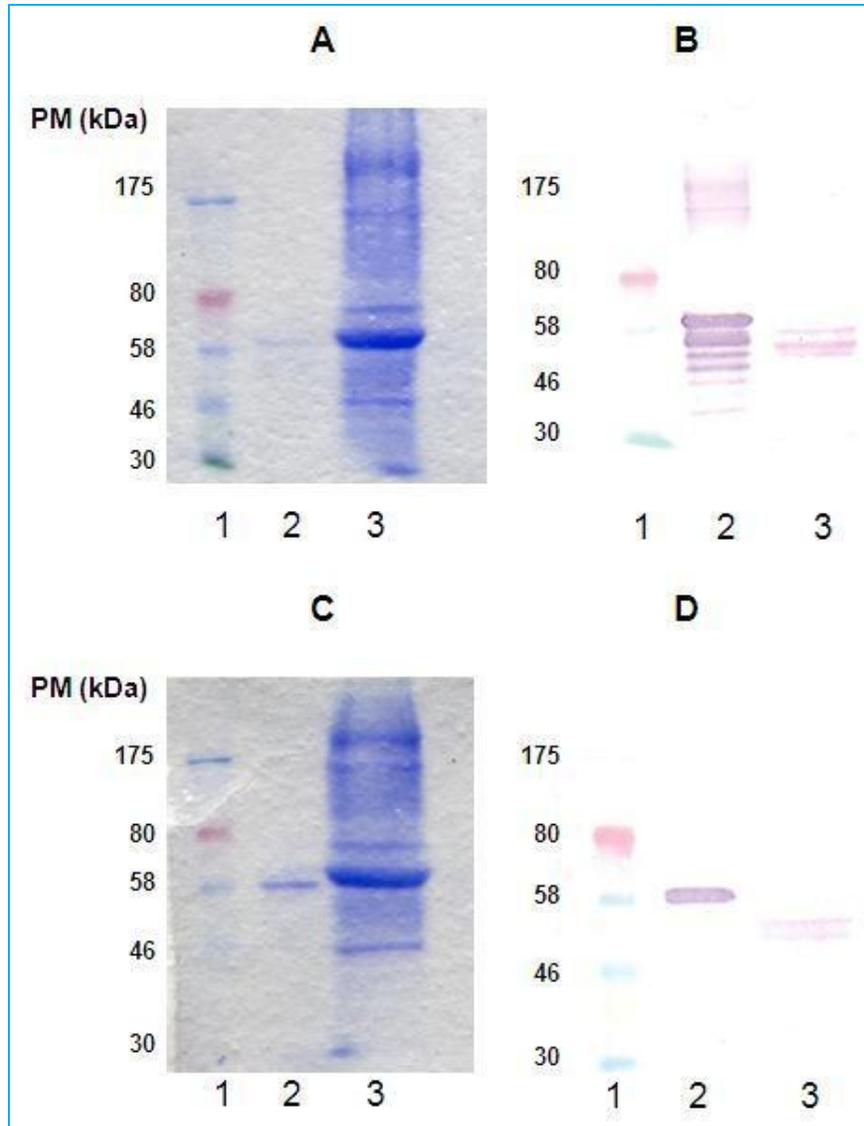


Figura 8: Anticuerpos monoclonales anti-TcCRT y anti-HuCRT reconocen las proteínas respectivas en EPMs. (A) SDS-PAGE al 10%. **(B)** IWB. Carril 1: marcador de PM; 2: 10 ng de rTcCRT; 3: 20 µg de EPM, con bFGF y rTcCRT. Revelado con AcMo anti-TcCRT y como Ac secundario Ig de cabra anti-Ig de ratón. **(C)** SDS-PAGE al 10%. **(D)** IWB. Carril 1: marcador de PM; 2: 10 ng de rHuCRT; 3: 20 µg EPM con bFGF y rHuCRT. Revelado con AcMo anti-HuCRT y como Ac secundario Ig de cabra anti-Ig de ratón.

4. Cuantificación del efecto de rTcCRT y rHuCRT sobre la angiogénesis en modelo *in vivo* de tapón de Matrigel en ratón.

Se inoculó una mezcla de Matrigel con 300ng de bFGF/tapón (determinada de acuerdo con los resultados obtenidos en el Objetivo Especifico 2) y rTcCRT o rHuCRT (1µg/ml) o volumen equivalente de PBS 1X.

Al examen macroscópico de las muestras, no se detectó diferencias de peso entre los grupos. Se observó una diferencia en la coloración en el tejido subcutáneo adyacente (**Fig. 9, I, M**) en las muestras tratadas, en relación a los controles. Estas diferencias no se observaron en el análisis histológico de rutina, con Hematoxilina Eosina.

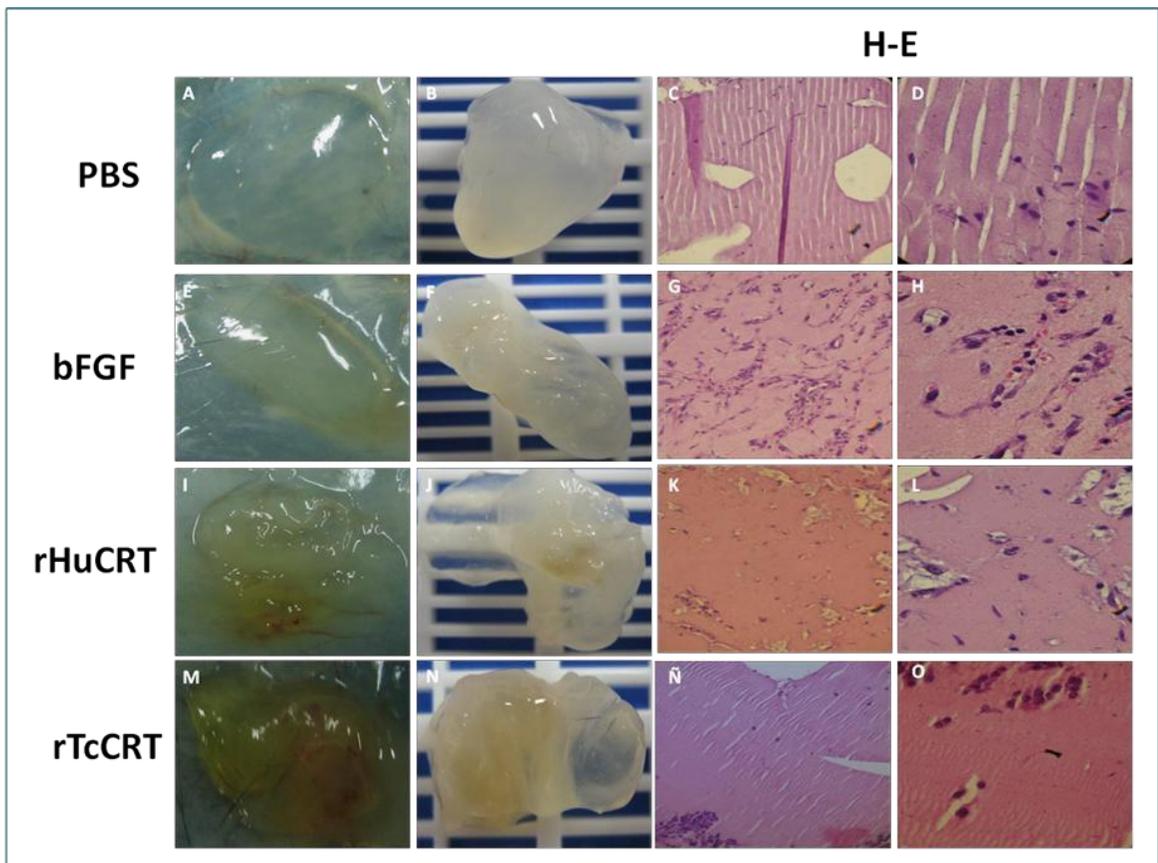


Figura 9: Características macro y microscópicas de tapón de Matrigel en ratones C57BL/6. Matrigel con PBS 1X (**A-D**), bFGF 300ng/tapón (**E-H**), rHuCRT (1µg/ml) (**I-L**) y rTcCRT (1µg/ml) (**M-O**). Las observaciones se realizaron en tejido subcutáneo fresco (**A,E,I,M**); tapones post fijación (**B,F,J,N**); cortes de tapón teñidos con H-E y observados a 40X (**C,G,K,Ñ**) y 100X (**D,H,L,O**).

La inmunodetección con AcMo Anti-PECAM-1/CD31 de ratón (Cell Sciences® HM1084) evidencio infiltrado exclusivo de células endoteliales en los implantes (**Fig. 10 fechas ejemplifican la inmunodetección**).

La cuantificación del infiltrado se realizó como fue detallado en el Objetivo Específico Número 2.

Ambas CRT inhibieron la infiltración de células endoteliales mediada por el factor de crecimiento bFGF, pero no hubo diferencias entre las CRT recombinantes ($p < 0,001$).

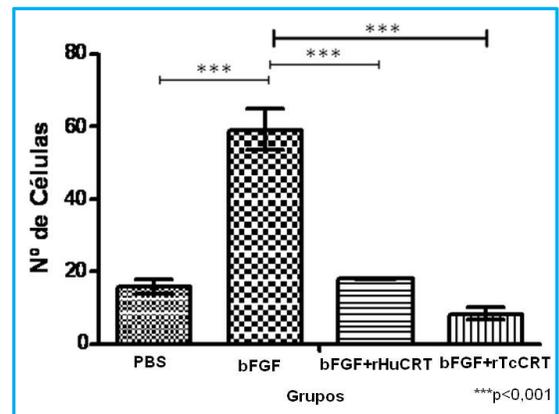
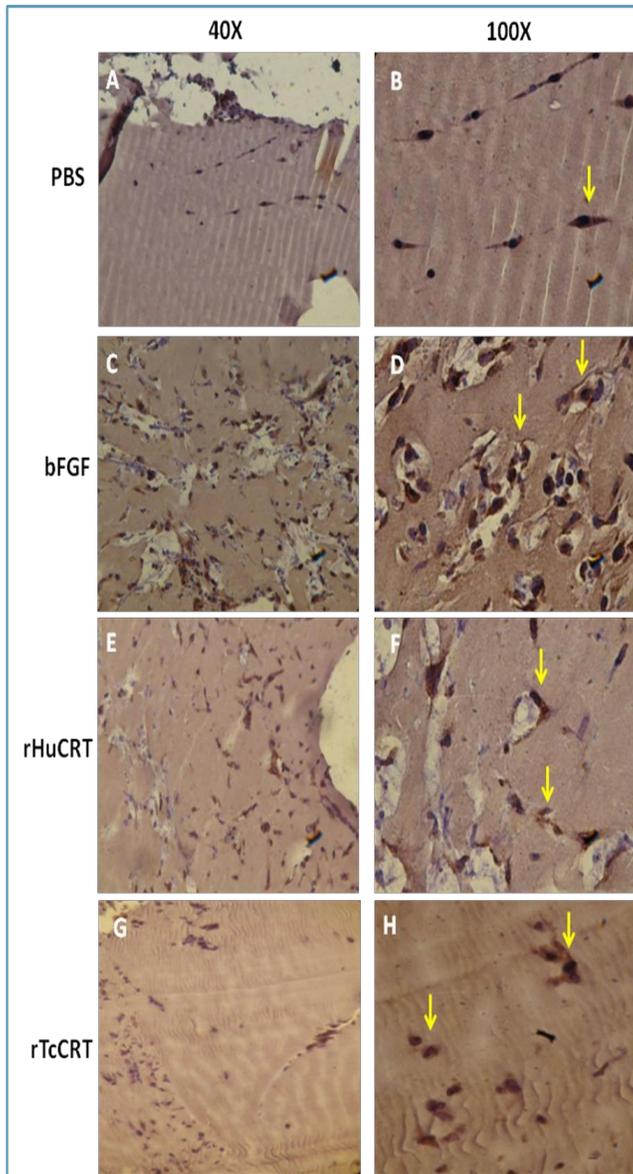


Figura 10: rTcCRT y rHuCRT disminuyen la infiltración celular endotelial en los tapones de Matrigel inoculados en tejido subcutáneo de ratones C57BL/6. Las fechas muestran Inmunorreactividad con Ac Anti-PECAM-1/CD31 en: (A,B) tapones con PBS 1X, (C,D) bFGF 300ng/tapón, (E,F) bFGF y rHuCRT (1µg/ml), (G,H) bFGF y rTcCRT (1µg/ml), (I) Cuantificación del efecto antiangiogénico de rTcCRT y rHuCRT. Cada columna representa el promedio de 100 lecturas por grupo. Las barras representan desviaciones estándar. ***p<0,001

DISCUSIÓN

Esta Memoria de Título se fundamenta en estudios anteriores del Laboratorio de Inmunología de la Agresión Microbiana (López *et al.*, 2010), que proponen que en las interacciones hospedero/parasito, hay términos moleculares que pueden beneficiar al hospedero. Así, *T. cruzi* utiliza una variedad de propiedades de su calreticulina que le permiten modular, en su favor, no solo su infectividad (Ramírez *et al.*, 2011) y aspectos centrales de importantes brazos efectores de la inmunidad innata y adaptativa (Ferreira *et al.*, 2004b; Ramírez *et al.*, 2011; Valck *et al.*, 2010), sino también inhibir la angiogénesis y, en consecuencia, el crecimiento tumoral (López *et al.*, 2010). Es plausible que este último aspecto beneficie al hospedero y al parasito, al posibilitar interacciones prolongadas. Se prolongaría la sobrevivencia del hospedero y, por ende, aumentaría la posibilidad de expansión del genoma parasitario.

En los últimos años, se han comenzado a utilizar factores inhibidores de la angiogénesis en un intento por controlar el crecimiento tumoral (Bergers y Benjamín, 2003).

CRT de mamíferos, particularmente la humana, es una molécula con actividad antiangiogénica (Pike *et al.*, 1999). Se trata de una proteína multifuncional expresada en todas las células nucleadas (Hawn *et al.*, 1993; Liu *et al.*, 1993; Chen *et al.*, 1994; Dresselhaus *et al.*, 1996; Crofts *et al.*, 1998; Labriola *et al.*, 1999). HuCRT y su dominio N-terminal, vasostatina, inhiben la proliferación de células endoteliales, la generación de nuevos vasos sanguíneos y el crecimiento tumoral (Pike *et al.*, 1999).

En el LIAM se ha descrito que TcCRT presenta propiedades antiangiogénicas a través de ensayos *in vitro*, *ex vivo* e *in vivo*, esto últimos en huevos embrionados de aves (*G. gallus*). La capacidad antiangiogénica de TcCRT, se correlaciona con la inhibición que provocan varias cepas de *T. cruzi* en el crecimiento de tumores (Kallinikova *et al.*, 2001). Aunque este efecto se ha descrito hace más de 80 años, y ha sido reproducido en el LIAM recientemente, aún se desconoce la naturaleza de la capacidad antitumoral de la infección tripanosómica. Parte de la explicación podría ser la inhibición de la angiogénesis por TcCRT.

El objetivo general de esta Memoria de Título fue determinar la capacidad de TcCRT para inhibir la Angiogénesis de mamíferos, en un modelo *in vivo*. Esto, dada la gran importancia de validar los resultados obtenidos en el LIAM en el ensayo CAM (Molina *et al.*, 2005), en una especie que fuera afectada por la Enfermedad de Chagas.

Entre los ensayos *in vivo* descritos, que permiten medir angiogénesis, está el modelo de tapón de Matrigel en ratón (Sgadari *et al.*, 1996; Maeshima *et al.*, 2001; Akhtar *et al.*, 2002; Naumova *et al.*, 2006; Ohashi *et al.*, 2006). Fue necesario estandarizar un protocolo para este modelo, diferente a los descritos en la literatura (Sgadari *et al.*, 1996; Maeshima *et al.*, 2001; Akhtar *et al.*, 2002; Naumova *et al.*, 2006; Ohashi *et al.*, 2006), para satisfacer así los Objetivos Específicos propuestos aquí.

Por consideraciones bioéticas, se inoculó solo un tapón de Matrigel de 500 μ l subcutáneamente, por animal. La alternativa de inocular dos tapones, en ratones de tan pequeños (6 semanas), generaría estrés y esfuerzos por lamer insistentemente la zona, lo que podría interferir con los resultados esperados.

El inóculo de Matrigel se aplicó exitosamente en el tejido subcutáneo dorsal de los ratones (**Fig. 3A**). No se apreció signos ni síntomas que indicaran alteraciones patológicas, derivadas del proceso de implante mismo. Los tapones fueron recuperados íntegros desde todos los individuos inoculados (**Fig. 3D**).

La estandarización del nuevo protocolo para este ensayo, requirió de la determinación de una concentración de factor de crecimiento que mediara una infiltración medible de células endoteliales. Las concentraciones usadas fueron 75 y 300 ng/tapon (Sgadari *et al.*, 1996; Naumova *et al.*, 2006) y también 150ng/tapon. Macroscópicamente, no fue posible determinar diferencias en peso o número de vasos sanguíneos en la piel y tejido subcutáneo adyacente. En el estudio histológico (**Fig. 4**), inmunohistoquímico (**Fig. 5**) y la cuantificación de la infiltración celular en las muestras, los promedios de células endoteliales por grupo mostraron que, con 300 ng/tapón, se obtuvo diferencias significativas en el número de células endoteliales infiltradas con respecto al control (**Fig. 6**).

El estudio inmunohistoquímico comprobó que el infiltrado celular en los tapones de Matrigel corresponde a células endoteliales, dada la positividad de todas ellas con el AcMo Anti-PECAM-1/CD31 (**Fig. 6**).

En la determinación de CRT mediante IWB, tanto los AcPo como los AcMo anti-TcCRT y anti-HuCRT, reconocen una banda proteica de 58 kDa para EPM con rTcCRT y 50 kDa para EPM con rHuCRT (**Fig. 7, B, C, Fig. 8, B y D**). La diferencias de pesos relativos con las correspondientes moléculas recombinantes, sería producto de un grado de proteólisis limitada de las CRTs al interior de los EPMs, por enzimas desconocidas. La banda proteica reconocida por el AcMo anti-TcCRT, alrededor de los 175 kDa, podría interpretarse como producto de agregación proteica, mediante enlaces covalentes (**Fig. 8B**), generados en ausencia de β -2-mercaptoetanol. Este es un alcohol no cargado (no une SDS), que durante la corrida electroforética permanece en el pocillo, posibilitándose así la formación de enlaces inter cadenas polipeptídicas, por interacción de grupos sulfhidrilos activos.

Previo a la electroforesis, a los EPMs se les midió proteínas totales. La diferencia de los contenidos proteicos entre el EPM con rTcCRT (7,3 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) y el EPM con rHuCRT (1,6 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$), la genera el contenido sanguíneo del primero, adyacente al cual se generó un hematoma el cual no pudo ser totalmente disecado del implante (**Fig. 7 y 8**).

Como rTcCRT y rHuCRT provienen de *E. coli*, LPS es un contaminante frecuente. La endotoxina tiene un papel controversial en la regulación de la angiogénesis (Pipili-Synetos *et al.*, 2000; Pollet *et al.*, 2003). Sin embargo, estudios realizados previamente en el LIAM, demuestran que LPS no tuvo efecto en la angiogénesis experimental, en las concentraciones presentes en las preparaciones de rTcCRT usadas (3,5pg de LPS/ng de rTcCRT) (López, 2008; López *et al.*, 2010).

Por otra parte, el estudio inmunohistoquímico realizado en los grupos tratados con CRTs no muestra que estas proteínas promuevan la infiltración de células inflamatorias en los tapones. (**Fig. 9 y 10**).

Finalmente, no se obtuvieron diferencias en la inhibición de infiltración celular entre rHuCRT y rTcCRT (**Fig. 10I**), a diferencia de los resultados en el ensayo *in vivo*

CAM (Molina *et al.*, 2005), *ex vivo* en anillos aórticos de rata e *in vitro* en morfogénesis capilar (López *et al.*, 2010), en los cuales TcCTR mostró un efecto mucho más potente que HuCRT. Quizás la sensibilidad de esos ensayos fue superior a la de los implantes *in vivo*.

Así, TcCRT inhibe la infiltración de endotelios, en implantes subcutáneos de Matrigel, en ratones. Esta información es compatible con la posibilidad que el efecto anti tumoral *in vivo* de TcCRT recombinante sobre tumores mamarios experimentales, demostrado recientemente en el LIAM, se deba a un rol antiangiogénico de la proteína parasitaria. Más aún, el efecto anti tumoral de la infección tripanosómica demostrado por otros laboratorios y comprobado en el LIAM, podría explicarse, al menos en parte por una acción antiangiogénica de la calreticulina nativa parasitaria.

CONCLUSIÓN

Dado que calreticulina de *Trypanosoma cruzi* inhibe la migración de células endoteliales a implantes subcutáneos de tapones de Matrigel en ratón, la Hipótesis propuesta en esta memoria de Título "Dadas las propiedades antiangiogénicas que TcCRT expresa en una variedad de ensayos *in vitro* y *ex vivo*, en células mamíferas y, también *in vivo* en aves, entonces, TcCRT inhibirá la angiogénesis en el modelo *in vivo* de tapón de Matrigel en ratón", es aceptada.

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(20):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.
- AKHTAR, N.; DICKERSON, E.B.; AUERBACH, R.** 2002. The sponge/Matrigel angiogenesis assay. *Angiogenesis* 5: 75-80.
- AMINO, R.; MARTINS, R.; PROCOPIO, J.; HIRATA, I.; JULIANO, M., SCHENKMAN, S.** 2002. Trialysin, a novel pore-forming protein from saliva of hematophagous insects activated by limited proteolysis. *J Biol Chem* 277:6207-6213.
- 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.
- ATÍAS, A.** 1998. *Parasitología Médica*. 1ª ed. Publicaciones Técnicas Mediterráneo Ltda. Santiago, Chile 251-264 p.
- BAKSH, S.; MICHALAK, M.** 1991. Expression of calreticulin in *Escherichia coli* and identification of its Ca²⁺ binding domains. *J Biol Chem* 266:21458-21465.
- BANCROFT, J.; GAMBLE, M.** 2008. *Theory and practice of histological techniques*. 6ª ed. Churchill Livingstone. Philadelphia, USA 725 p.

- BASU, S.; SRIVASTAVA, P.K.** 1999. Calreticulin, a peptide-binding chaperone of the endoplasmic reticulum, elicits tumor- and peptide-specific immunity. *J Exp Med* 189:797-802.
- BERGERS, G., BENJAMIN, L.E.** 2003. Tumorigenesis and the angiogenic switch. *Nat Rev Cancer* 3:401-410.
- BIGLER, L.; STRECKFUS, C.** 2004. Unique protein screening analysis of stimulated whole saliva from healthy individuals and breast cancer patients. *Preclínica* 2:52-56.
- BONGARD PI, ROSKIN G.** 1939. Deistvie shizotripannogo endotoksina na zlokachestvenye opukholi. *BEBM* 7:417-418.
- BOOTH, C.; KOCH, G.L.** 1989. Perturbation of cellular calcium induces secretion of luminal ER proteins. *Cell* 59:729-737.
- 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.
- BRANTLEY S.** 2004. Cure: a story of cancer 6:32-3.
- 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.
- CANTOR, D.J.** 2003. The cure: a story of cancer and politics from the annals of the Cold War (Review). *Bull Hist Med* 77:977-979.
- CASTRO, J.A.; DE MECCA, M.M.; BARTEL, L.C.** 2006. Toxic side effects of drugs used to treat Chagas' disease (American trypanosomiasis). *Hum Exp Toxicol* 25(8):471-479.
- CHEN, F.; HAYES, P.M.; MULROONEY, D.M.; PAN, A.** 1994. Identification and characterization of cDNA clones encoding plant calreticulin in barley. *Plant Cell* 6:835-843.

- CODDOU, M.F.; WEINBERGER, K.; DUASO, M.L.; VALCK, C.; RAMÍREZ, G.; AGUILAR, L.; MALDONADO, I.; GONZÁLEZ, A.; FERREIRA, A.** 2010. Search of Calreticulin in saliva of *Canis familiaris*. Manuscrito en preparación.
- 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(1):41-50.
- CORBETT, E.F.; OIKAWA, K.; FRANCOIS, P.; TESSIER, D.C.; KAY, C.; BERGERON, J.J.; THOMAS, D.Y.; KRAUSE, K.H.; MICHALAK, M.** 1999. Ca^{2+} regulation of interactions between endoplasmic reticulum chaperones. *J Biol Chem* 274:6203-6211.
- COURA, J.R.** 2007. Chagas disease: what is known and what is needed: a background article. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 102(1):113-122.
- COURA, J.R.; ALBAJAR, P.** 2010. Chagas disease: a new worldwide challenge. *Nature Outlook Chagas Disease. Nature* 465(7301): 6-7.
- CROFTS, A.J.; LEBORGNE-CASTEL, N.; PESCA, M.; VITALE, A.; DENECKE, J.** 1998. BiP and calreticulin form an abundant complex that is independent of endoplasmic reticulum stress. *Plant Cell* 10:813-824.
- DRESSELHAUS, T.; HAGEL, C.; LORZ, H.; KRANZ, E.** 1996. Isolation of a full-length cDNA encoding calreticulin from a PCR library of in vitro zygotes of maize. *Plant Mol Biol* 31:23-34.
- DUPUIS, M.; SCHAERER, E.; KRAUSE, K.H.; TSCHOPP, J.** 1993. The calcium-binding protein calreticulin is a major constituent of lytic granules in cytolytic T lymphocytes. *J Exp Med* 177:1-7.
- 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.

- FADEL, M.P.; DZIAK, E.; LO, C.M.; FERRIER, J.; MESAELI, N.; MICHALAK, M.; OPAS, M.** 1999. Calreticulin affects focal contact-dependent but not close contact-dependent cell-substratum adhesion. *J Biol Chem* 274:15085-15094.
- 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(17):1279-1291.
- FERREIRA, V.; VALCK, V.; 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.
- 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.
- GUO, L.; NAKAMURA, K.; LYNCH, J.; OPAS, M.; OLSON, E.R.; AGELLON, L.B.; MICHALAK, M.** 2002. Cardiac-specific expression of calcineurin reverses embryonic lethality in calreticulin-deficient mouse. *J Biol Chem* 277(52): 50776-50779.
- HAWN, T.R.; TOM, T.D.; STRAND, M.** 1993. Molecular cloning and expression of SmlrV1, a *Schistosoma mansoni* antigen with similarity to calnexin, calreticulin, and OvRal1. *J Biol Chem* 268:7692-7698.
- 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.
- 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.

- KALLINIKOVA, V.D.; MATEKIN, P.V.; OGLOBLINA, T.A.; LEIKINA, M.I.; KONONENKO, A.F.; SOKOLOVA, N.M.; POGODINA, L.S.** 2001. Anticancer Properties of Flagellate Protozoan *Trypanosoma cruzi* Chagas, 1909. Biology Bulletin 28:244-255.
- KIERNAN, J.A.** 2008. Histological and histochemical methods: theory and practice, 4^a ed. Scion publishing Ltd. Banbury, UK 606 p.
- KLYUEVA, N.G.; ROSKIN, G.I.** 1946. Bioterapyia Zlokachevstvven-nykh Opukholei. Moscow: Izdatelstvo AMN SSSR.
- KRAUSE, K.H.; MICHALAK, M.** 1997. Calreticulin. Cell 88:439-443.
- KREMENSTOV, N.** 2002. The cure. A story of cancer and politics from the annals of the Cold War. The University of Chicago Press. Chicago, USA 198-206 p.
- KREMENTSOV, N.** 2009. *Trypanosoma cruzi*, cancer and the Cold War. Hist Cienc Saude-Man 16 (1): 75-96.
- LABRIOLA, C.; CAZZULO, J.J.; PARODI, A.J.** 1999. *Trypanosoma cruzi* calreticulin is a lectin that binds monoglucosylated oligosaccharides but not protein moieties of glycoproteins. Mol Biol Cell 10:1381-1394.
- LAEMMLI, U.K.** 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 227: 680-685.
- LANNES-VIEIRA, J.** S.f. La Enfermedad. Laboratorio de Investigaciones en Autoinmunidad e Inmunorregulación, Instituto Oswaldo Cruz-Fiocruz, Río de Janeiro, Brasil. [en línea] <http://www.fiocruz.br/chagas_esp/cgi/cqilua.exe/sys/start.htm?sid=4> [consulta 4/10/2008].
- LIU, N.; FINE, R.E.; JOHNSON, R.J.** 1993. Comparison of cDNAs from bovine brain coding for two isoforms of calreticulin. Biochim Biophys Acta 1202:70-76.
- LÓPEZ, N.** 2008. Mecanismos Antiangiogénicos de Calreticulina de *Trypanosoma cruzi*. Tesis Doctorado en Química. Santiago, Chile. Universidad de Chile, Facultad de Medicina. 90 p.

- 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* 4:730.
- MAESHIMA, Y.; MANFREDI, M.; REIMER, C.; HOLTHAUS, K.A.; HOPFER H.; CHANDAMURI, B.R.; KHARBANDA, S.; KALLURI, R.** 2001. Identification of the anti-angiogenic site within vascular basement membrane-derived tumstatin. *J Biol Chem* 4:276(18):15240-15248.
- MATSUOKA, K.; SETA, K.; YAMAKAWA, Y.; OKUYAMA, T.; SHINODA, T.; ISOBE, T.** 1994. Covalent structure of bovine brain calreticulin. *Biochem J* 298 (2):435-442.
- MICHALAK, M.; MILNER, R.E.; BURNS, K.; OPAS, M.** 1992. Calreticulin. *Biochem J* 285 (3):681-692.
- MICHALAK, M.; CORBETT, EF.; MESAELI, N.; NAKAMURA, K.; OPAS, M.** 1999. Calreticulin: one protein, one gene, many functions. *Biochem. J* 344:281-292.
- MOLINA, M.C.; FERREIRA, V.; VALCK, C.; 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(2):133-140.
- MONCAYO, A.** 2003. Chagas disease: current epidemiological trends after the interruption of vectorial and transfusional transmission in the Southern Cone countries. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 98:577-591.
- NASH, P.D.; OPAS, M.; MICHALAK, M.** 1994. Calreticulin: not just another calcium-binding protein. *Mol Cell Biochem* 135:71-78.
- NAUMOVA, E.; UBEZIO, P.; GAROFALO, A.; BORSOTTI, P.; CASSIS, L.; RICCARDI, E.; SCANZIANI, E.; ECCLES, S.A.; BANI, M.R.; GIAVAZZI, R.** 2006. The Vascular Targeting Property of Paclitaxel Is Enhanced by SU6668, a Receptor Tyrosine Kinase Inhibitor, Causing Apoptosis of Endothelial Cells and Inhibition of Angiogenesis. *Clin Cancer Res* 12(6):1839-1849.

OBEID, M.; TESNIERE, A.; GHIRINGHELLI, F.; FIMIA, G.M.; APETOH, L.; PERFETTINI, J.L.; CASTEDO, M.; MIGNOT, G.; PANARETAKIS, T.; CASARES, N.; METIVIER, D.; LAROCLETTE, N.; VAN ENDERT, P.; CICCOSANTI, F.; PIACENTINI, M.; ZITVOGEL, L.; KROEMER, G. 2007. Calreticulin exposure dictates the immunogenicity of cancer cell death. *Nat Med* 13:54-61.

OHASHI, K.; YOKOYAMA, T.; NAKAJIMA, Y.; KOSOVSKY, M. 2006 Technical Bulletin #455 Methods for Implantation of BD Matrigel™ Matrix into Mice and Tissue Fixation. [en línea] http://www.bdbiosciences.com/external_files/dl/doc/tech_bulletin/live/web_enabled/tb455.pdf [consulta 4/10/2008].

OLEA, A. 1998 Situación Epidemiológica de la Enfermedad de Chagas en Chile. [en línea] <http://epi.minsal.cl/epi/html/public/chagaschile.htm> [consulta 16/10/2008]

OLFERT, E.D.; CROSS, B.M.; MCWILLIAM, A.A. 1993. Guide to the care and use of experimental animals [en línea] http://www.ccac.ca/en/CCAC_Programs/Guidelines_Policies/GUIDES/ENGLISH/to_c_v1.htm [consulta 6/10/2008].

OLIVEIRA, E.C.; LEITE, M.S.; MIRANDA, J.A.; ANDRADE, A.L.; GARCIA, S.B.; LUQUETTI, A.O.; MOREIRA, H. 2001. Chronic *Trypanosoma cruzi* infection associated with low incidence of 1,2-dimethylhydrazine-induced colon cancer in rats. *Carcinogenesis* 22:737-740.

OPAS, M.; SZEWCZENKO-PAWLIKOWSKI, M.; JASS, G.K.; MESAELI, N.; MICHALAK, M. 1996. Calreticulin modulates cell adhesiveness via regulation of vinculin expression. *J Cell Biol* 135:1913-1923.

OPS/WHO/NTD/IDM. 2006. Estimación cuantitativa de la enfermedad de Chagas en las Américas. OPS/HDM/CD 425-406.

OSTWALD, T.J.; MACLENNAN, D.H. 1974. Isolation of a High Affinity Calcium-binding Protein from Sarcoplasmic Reticulum. *J Biol Chem* 249:974-979.

PERSSON, S.; ROSENQUIST, M.; SOMMARIN, M. 2002. Identification of a novel calreticulin isoform (Crt2) in human and mouse. *Gene* 297:151-158.

- PIKE, S.E.; YAO, L.; SETSUDA, J.; JONES, K.D.; CHERNEY, B.; APPELLA, E.; SAKAGUCHI, K.; NAKHASI, H.; ATREYA, C.D.; J. TERUYA-FELDSTEIN, J.; WIRTH, P.; GUPTA, G.; TOSATO, G.** 1999. Calreticulin and calreticulin fragments are endothelial cell inhibitors that suppress tumor growth. *Blood* 94:2461-2468.
- PIPILI-SYNETOS, E.; KRITIKOU, S.; PAPADIMITRIOU, E.; ATHANASSIADOU, A.; FLORELLIS, C.; MARAGOUDAKIS, M.E.** 2000. Nitric oxide synthase expression, enzyme activity and NO production during angiogenesis in the chick chorioallantoic membrane. *Br J Pharmacol* 129:207-213.
- POLLET, I.; OPINA, C.J.; ZIMMERMAN, C.; LEONG, K.G.; WONG, F.; KARSAN, A.** 2003. Bacterial lipopolysaccharide directly induces angiogenesis through TRAF6-mediated activation of NF-kappaB and c-Jun N-terminal kinase. *Blood* 102:1740-1742.
- PRATA, A.** 2001 Clinical and epidemiological aspects of Chagas disease. *Lancet Infect Dis* 1(2):92-100.
- RADOSH, R.; MILTON, J.** 1997. The Rosenberg file. 2^a Ed. Yale University Press. Connecticut, USA. 616 p.
- 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.** 2011. *Trypanosoma cruzi* Calreticulin: a novel virulence factor that binds complement C1 on the parasite surface and promotes infectivity. *Immunobiology* 216(1): 265-273.
- 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 immunodominant *Trypanosoma cruzi* antigen. *Am J Trop Med Hyg* 44:314-322.
- RIVERA, D.E.** 2005. Preparación KR: una historia de investigación, ciencia y política / KR preparation: a story of research, science and politics. *Rev Colomb Cancerol* 9(4):221-227.
- ROSKIN, G.** 1939. L'action des toxines sur le cancer experimental. *Acta Med URSS* 2:138-144.

- ROSKIN, G.I.; EXEMPLARSKAJA, E.** 1931. Protozoen Infektion und Experimentellen Krebs. Zeitschr. Krebsforsch 31:628-645.
- SGADARI, C.; ANGIOLILLO, A.L.; TOSATO, G.** 1996. Inhibition of Angiogenesis by Interleukin-12 Is Mediated by the Interferon-Inducible Protein 10. Blood 87: 3877-3882.
- 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.
- SOARES M.B.; PONTES-DE-CARVALHO, L.; RIBEIRO-DOS-SANTOS, R.** 2001 The pathogenesis of Chagas' disease: when autoimmune and parasite-specific immune responses meet. An Acad Bras Cienc 73:547-559.
- SOUTO-PADRON, T.; LABRIOLA, C.A.; DE SOUZA, W.** 2004. Immunocytochemical localisation of calreticulin in *Trypanosoma cruzi*. Histochem Cell Biol 122:563-569.
- SUCHITRA, S.; JOSHI, Y.P.** 2005. Characterization of Haemonchus contortus calreticulin suggests its role in feeding and immune evasion by the parasite. Biochim Biophys Acta 1722:293-303.
- 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.
- TEIXEIRA, A. R.; NITZ, N.; GUIMARO, M.C.; GOMES, C.; SANTOS-BUCH, C.A.** 2006. Chagas disease. Postgrad Med J 82(974): 788-798.
- TOWBIN, H.; STAEHELIN, T.; GORDON, J.** 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheet: Procedure and some applications. Proc Natl Acad Sci 76: 4350-4354.
- TYLER, K.M.; ENGMAN, D.M.** 2001. The life cycle of *Trypanosoma cruzi* revisited. Int J Parasitol 31:472-481.

- VALCK, C.; RAMÍREZ, G.; LÓPEZ, N.; RIBEIRO, C.H.; MALDONADO, I.; SÁNCHEZ, G.; FERREIRA, V.; SCHWAEBLE, W.; FERREIRA, A.** 2010. Molecular mechanisms involved in the inactivation of the first component of human complement by *Trypanosoma cruzi* calreticulin. *Mol Immunol* 47:1516-1521.
- VALIER, H.** 2004. Book Review. The cure: a story of cancer and politics from the annals of the cold war. *Med Hist* 48:382-3.
- 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.
- WEINBERGER, K.; CODDOU, F.; DUASO, M.L.; VALCK, C.; RAMÍREZ, G.; AGUILAR, L.; MALDONADO, I.; ZULANTAY, I.; APT, W.; FERREIRA, A.** 2010. Evaluación de la Presencia de Calreticulina en Glándula Salival de *Triatoma infestans*, Definida por Criterios Antigénicos y Funcionales. Manuscrito en preparación.
- WHITE, T.K.; ZHU, Q.; TANZER, M.L.** 1995. Cell surface calreticulin is a putative mannoside lectin which triggers mouse melanoma cell spreading. *J Biol Chem* 270:15926-15929.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION.** 2002. Control of Chagas' disease. Report of the WHO Expert Committee. *World Health Organ Tech Rep Series* 905.
- ZHANG, J.X.; BRAAKMAN, I.; MATLACK, K.E.; HELENIUS, A.** 1997. Quality control in the secretory pathway: the role of calreticulin, calnexin and BiP in the retention of glycoproteins with C-terminal truncations. *Mol Biol Cell* 8:1943-1954.

ANEXOS

Anexo 1

Reactivos Comerciales

BioRad (USA): N,N,N',N'-tetrametiletilendiamina (TEMED), persulfato de amonio (PSA), reactivo de Bradford.

BD Biosciences (USA): Matrigel reducido en factor de crecimiento (BD Matrigel™, Basement Membrane Matrix, Growth Factor Reduced). Anticuerpo monoclonal de ratón anti-HuCRT.

Cell Sciences® (USA): Anticuerpo de rata anti-CD31 de ratón (PECAM-1/CD31, Clon ER-MP12).

Cultrex (USA): Matrigel reducido en factor de crecimiento (Basement Membrane extract, Growth Factor Reduced).

GE Healthcare (USA): Acrilamida, bis-acrilamida, membrana de nitrocelulosa.

Leitz (Alemania): Cromógeno diamino benzidina (DAB).

McCormick scientific (USA): Parafina (paraplast plus).

MERCK (Alemania): Ácido acético, azul de bromofenol, metanol, xilol.

New England Biolabs (UK): Estándar de peso molecular pre-teñido amplio rango (ColorPlus Prestained Protein Marker, Broad Range (7-175 kDa)).

Roche (Alemania): Inhibidor de proteasas (Complete, Mini, EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail Tablets provided in *EASYpack*).

ScyTek Laboratories (USA): Bloqueador de peroxidasas endógenas, bloqueador de reacciones inespecíficas (Pro-Blok), kit ABC-R.T.U Vectastain Universal®, suero normal equino R.T.U. al 2,5%, tampón citrato de sodio (Antigen Unmasking Solution®), Hematoxilina.

Sigma-Aldrich (USA): NBT-BCIP (Nitro blue tetrazolium /Fostato 5-bromo-4-cloro-indol), anticuerpo de cabra anti-Ig de conejo conjugado a fosfatasa alcalina, Azul de Coomasie R250, glicina, β 2-mercaptoetanol, dodecil sulfato de sodio (SDS), Tris base, eosina.

Thermo Scientific (USA): UltraClean Diluent.

US Biological (USA): Albúmina sérica bovina (BSA).

Vector Laboratories Inc. (USA): Anticuerpo de conejo anti-Ig (H+L) de rata biotinilado.

Vetec analytical reagents (Brasil): Xilol.

Winkler (Chile): Tween 20.

Lista Equipos

BioRad (USA): Cámara electroforesis.

Canon (Japón): Cámara fotográfica digital (Powershot SX100 15).

Jenway (UK): Espectrofotómetro (Genova N° 1795).

Leitz (Alemania): Micrótopo Rotatorio Minot (WS-LEITZ1512).

Misonix (USA): Sonicator (Microson TM XL2000).

Nikon (Japón): Microscopio (Optiphot-2).

Oster® (USA): Vaporera (Modelo 5711-052).

Thermo scientific (Alemania): Portaobjetos silanizados con carga positiva (Superfrost® plus).

Anexo 2

**CERTIFICADO DE PROTOCOLO DE INVESTIGACIÓN EN ANIMALES
AJUSTADO A LAS NORMAS ETICAS DE LA FACULTAD DE MEDICINA DE
LA UNIVERSIDAD DE CHILE Y DE CONICYT**



El Comité de Bioética sobre la Investigación en Animales certifica que el Protocolo de Manejo y Cuidados de Animales de Laboratorio 2009 del Proyecto "Trypanosoma cruzi Calreticulin Interplay with the Complement System and Angiogenesis". Cuyo autor responsable es el **Dr. Arturo Ferreira Vigouroux**, del Laboratorio de Inmunología de la Agresión Microbiana, Programa Disciplinario de Inmunología, ICBM, Facultad de Medicina, Universidad de Chile, y que aplica al concurso FONDECYT.

Se atiene a las normativas bioéticas de la investigación científica en animales ya que:

- 1) Fue revisado por el comité constituido por nueve personas, tres de ellas veterinarios, seis son académicos con más de 10 años de experiencia en investigación con animales quienes, asimismo, han estado evaluando éticamente estos estudios durante los últimos cuatro años. El comité consta, además, con una periodista diplomada en Bioética Clínica (que actúa como miembro externo no del área de investigación) e investigadores de variados campos incluidos los que no utilizan animales. Dos de los veterinarios son los Jefes del Bioterio de la Facultad y tienen una amplia experiencia en la mantención, cuidado y manejo de animales además de ser Diplomados en Bioética de la investigación y clínica.
- 2) El comité sólo acepta protocolos acordes con las leyes y permisos vigentes en Chile que están vinculados a la regulación del trato de los animales y que se atienen a las normativas internacionales aceptadas por las leyes chilenas. También vela porque las sustancias que son utilizadas en estos seres vivos y que están prohibidas, reguladas o sujetas a prescripción retenida en seres humanos, no sean empleadas por los investigadores o facilitadas a otros individuos.
- 3) En la revisión se exige que el protocolo sea firmado por un investigador o académico que se haga responsable de todas aquellas acciones que están relacionadas con el animal y que se lleven a cabo en el recinto que se encuentra bajo su autoridad. De igual manera, se le solicita que el protocolo tenga un título claro, que en términos simples se explicita lo que se pretende lograr con el estudio y que se detalle la duración de la investigación. Asimismo, que en el documento se señale que el director de la institución también se responsabiliza por la actividad científica en que están implicados los animales de experimentación usados en las dependencias bajo su autoridad.
- 4) El comité sólo aprueba protocolos cuyas propuestas son convincentes y garantizan la obtención de conocimientos o tecnologías científicamente válidas que justificarían el posible sufrimiento, malestar o aflicción de los animales, dado que estos logros redundarían en un beneficio tanto para el ser humano como para los propios sujetos de experimentación.
- 5) El comité vela porque todas las personas que manejan a los animales tengan la preparación necesaria para hacerlo en forma acreditada o equivalente.

- 6) El comité cuida con esmero que el uso de estos seres vivos se concrete sólo cuando es estrictamente necesario, por lo tanto, siempre y cuando se constate que no hay posibilidad de reemplazarlos por otro diseño de experimentación. También vela porque las especies seleccionadas sean las apropiadas y porque el número de los animales empleados sea el mínimo necesario para obtener resultados válidos. De igual manera, se preocupa de que las técnicas o intervenciones impliquen el menor sufrimiento posible, esto es particularmente relevante al momento de evaluar las prácticas de manipulación e intervenciones invasivas de los animales, así como su traslado, manejo del dolor, anestesia, eutanasia y los recintos donde se realizarán estos procedimientos, siempre de acuerdo a la especie y el número empleado. Se ha examinado con cuidado especial las condiciones éticas de la mantención de animales en experimentación antes, durante y después de las intervenciones. Un acápite especial se refiere a la evaluación del término de los experimentos debido a que el sufrimiento animal puede ser excesivo aún cuando no se haya completado la experiencia científica.
- 7) El comité también se preocupa de que haya una institución que sustente física y económicamente la investigación y que se haga responsable de la confidencialidad de los experimentos con animales.
- 8) El Comité vela porque los restos de estos seres vivos, así como de los reactivos químicos, físicos o bióticos que se utilizan en su experimentación sean manejados bajo las normas más estrictas de seguridad y bioseguridad, con el objetivo de proteger no sólo a quienes están involucrados en los experimentos, sino también a la comunidad general. Se exige que todos los investigadores se atengan a las normativas de Bioseguridad exigidas por la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile, que se están actualizando permanentemente de acuerdo a las universalmente aceptadas.
- 9) Se adjunta el Protocolo correspondiente que especifica los requerimientos indicados.



DR. CARLOS VALENZUELA Y.
Presidente

Comité de Bioética Sobre la Investigación en Animales

CVY/mva.
Protocolo Nº 0283 Dr. Arturo Ferreira Vigouroux
Santiago, 29 de Enero de 2009.

Anexo 3

Calculo PM relativo

Para calcular el PM de la banda que corresponde a las muestras de EPM se calculó la movilidad electroforética relativa (Rf). La Rf es inversamente proporcional al logaritmo del PM. (Tabla 1).

Tabla 1: Determinación del peso molecular de EPM con rTcCRT, mediante SDS-PAGE. Las muestras fueron reducidas con 2-mercaptoetanol, y corridas en un gel al 10% de concentración.

Marcador	PM (kDa)	Migración (mm)	Rf
MBP- β -galactosidasa	175	16	0,296
MBP-truncada- β -galactosidasa	80	27	0,5
MBP-CBD	58	34	0,629
CBD- <i>Mxe</i> Intein-2CBD	46	43	0,796
CBD- <i>Mxe</i> intein	30	51	0,944
CBD- <i>E. coli</i> par	23	53	0,981
EPM + rTcCRT	x	34	0,629

MBP = 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-CDB = fusión de MBP y dominio de unión a la quitina. CDB-*Mxe* intein-2CBD = fusión de dominio quitina vinculante y el intein *Mxe* seguido de dos copias del dominio quitina vinculante. CDB-*Mxe* intein = fusión del dominio quitina vinculante seguido por el intein *Mxe*. CBD-*E. coli* Par = fusión del dominio quitina vinculante seguido de una proteína de *E. coli* parvulina-like.

Trazando un gráfico con estándares de PM conocido, se obtiene una línea de referencia en la cual se puede interpolar muestras de PM desconocido. El Rf se calcula dividiendo la distancia (mm) recorrida por la banda en cuestión, entre la distancia recorrida por el colorante azul de bromofenol. Al graficar estos datos (x=Rf, y=Log PM) se observa la relación mencionada (**Gráfico 1**). El PM estimado para la proteína incógnita (EPM + rTcCRT) es de 58 kDa interpolando mediante una regresión lineal en los puntos adecuados.

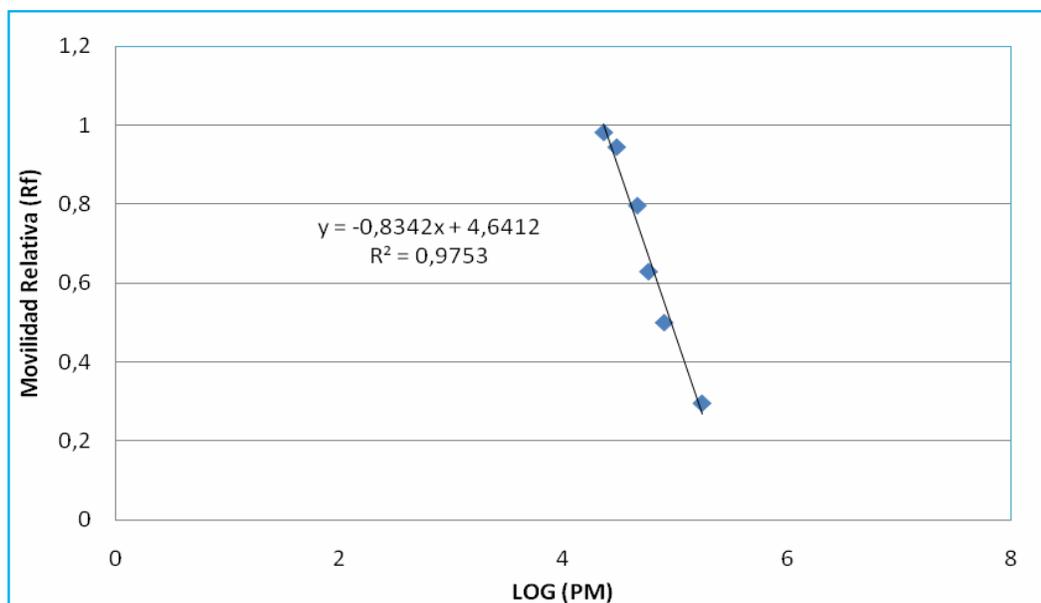


Gráfico 1: Curva de referencia para la estimación del PM aparente de EPM + rTcCRT mediante SDS-PAGE. Los datos corresponden a los resumidos en la tabla 1.

Tabla 2: Determinación del peso molecular de EPM + rHuCRT, mediante SDS-PAGE. Las muestras fueron reducidas con 2-mercaptoetanol, y corridas en un gel al 10% de concentración.

Marcador	PM (kDa)	Migración (mm)	Rf
MBP-β-galactosidasa	175	18	0,31
MBP-truncada-β-galactosidasa	80	30	0,517
MBP-CBD	58	37	0,637
CBD- <i>Mxe</i> Intein-2CBD	46	44	0,758
CBD- <i>Mxe</i> intein	30	54	0,931
CBD- <i>E.coli</i> par	23	56	0,965
EPM + rHuCRT	x	41	0,706

MBP = 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-CDB = fusión de MBP y dominio de unión a la quitina. CDB-*Mxe* intein-2CBD = fusión de dominio quitina vinculante y el intein *Mxe* seguido de dos copias del dominio quitina vinculante. CDB-*Mxe* intein = fusión del dominio quitina vinculante seguido por el intein *Mxe*. CBD-*E. coli* Par = fusión del dominio quitina vinculante seguido de una proteína de *E. coli* parvulina-like.

El PM estimado para la proteína incógnita (EPM + rHuCRT) es de 50 kDa interpolando mediante una regresión lineal en los puntos adecuados (**Gráfico 2**).

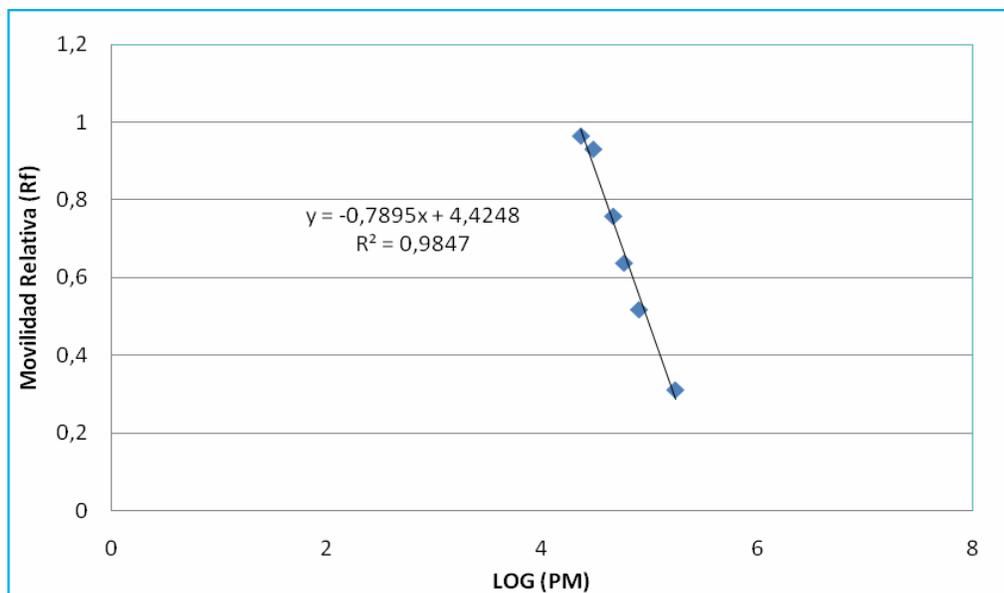


Gráfico 2: Curva de referencia para la estimación del PM aparente de EPM + rHuCRT mediante SDS-PAGE. Los datos corresponden a los resumidos en la tabla 2.