



**UNIVERSIDAD DE CHILE**

**FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS  
ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS**

**EVALUACION DE LA PRESENCIA DE  
CALRETICULINA EN GLÁNDULA SALIVAL DE *Triatoma*  
*infestans*, DEFINIDA POR CRITERIOS ANTIGENICOS Y  
FUNCIONALES**

**KATHERINE WEINBERGER STANGE**

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

**PROFESOR GUIA: Dr. ARTURO FERREIRA VIGOUROUX**

SANTIAGO, CHILE  
2011



**UNIVERSIDAD DE CHILE**



FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS  
ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS

EVALUACION DE LA PRESENCIA DE  
CALRETICULINA EN GLÁNDULA SALIVAL DE *Triatoma*  
*infestans*, DEFINIDA POR CRITERIOS ANTIGENICOS Y  
FUNCIONALES

**KATHERINE WEINBERGER STANGE**

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

NOTA FINAL: .....

		NOTA	FIRMA
PROFESOR GUIA	:ARTURO FERREIRA VIGOUROUX	.....	.....
PROFESOR CONSEJERO	: JUAN DIEGO MAYA ARANGO	.....	.....
PROFESOR CONSEJERO	: FERNANDO FREDES MARTINEZ	.....	.....

SANTIAGO, CHILE

2011

# Evaluación de la presencia de calreticulina en glándula salival de *Triatoma infestans*, definida por criterios antigénicos y funcionales

**KATHERINE WEINBERGER STANGE**

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

La enfermedad de Chagas, una zoonosis que afecta al continente Americano, es causada por el protozoo flagelado *Trypanosoma cruzi* y su principal vía de transmisión es vectorial, a través de insectos hematófagos de la subfamilia *Triatominae*. Epidemiológicamente, en Chile el vector más importante es *Triatoma infestans*. La saliva de artrópodos hematófagos tiene propiedades vasodilatadoras e inmunomoduladoras que favorecen la ingestión de sangre, sin daño aparente para el hospedero. Extractos de glándula salival de algunos de estos organismos inhiben la ruta clásica y alterna de activación del sistema del complemento humano. Se ha aislado en la saliva de otros artrópodos hematófagos a calreticulina (CRT), una proteína altamente pleiotrópica que está presente en todos los linajes celulares, excepto eritrocitos. En este estudio se demostró la presencia de CRT en extracto de glándula salival de *T. infestans* (TiCRT), usando criterios antigénicos y funcionales. Se analizó el extracto completo de glándula salival de *T. infestans* mediante electroforesis en gel de poliacrilamida al 10% p/v, en presencia de dodecil sulfato de sodio y  $\beta$ 2-mercaptoetanol (SDS-PAGE). Una réplica fue sometida a electrotransferencia, donde anticuerpos heterólogos reconocieron TiCRT putativa. Funcionalmente, y de acuerdo a lo esperado, se verificó que la TiCRT putativa presente en el extracto de glándula salival se unió específicamente al componente C1q, módulo de reconocimiento de señales de peligro de la ruta clásica del sistema del complemento humano. Más aún, el extracto de glándula salival, conteniendo TiCRT, inhibió esa ruta de activación, según lo verificado en ensayos inmunométricos. Muy probablemente, la unión de TiCRT a C1q medió una disminución en el depósito a la fase sólida de C4b. Esta es la unidad central de las convertasas de C3 y de C5 del complemento. Tomados en conjunto, estos resultados permiten proponer que el extracto de glándula salival de *T. infestans* contiene una molécula con peso aparente y propiedades antigénicas y funcionales compatibles con aquellas conocidas para CRT.

**Palabras claves:** calreticulina; *Triatoma infestans*; enfermedad de Chagas; *Trypanosoma cruzi*; sistema del complemento

Chagas' disease, a zoonosis affecting the American continent, is caused by the flagellated protozoan *Trypanosoma cruzi* and its principal way of transmission is vectorial, through hematophagous insects of the *Triatominae* subfamily. Epidemiologically, in Chile the most important vector is *Triatoma infestans*. The saliva from hematophagous arthropods has vasodilating and immunomodulatory properties that favor the blood ingestion, without apparent damage to the host. Salivary gland extracts of these organisms inhibit the activation of the classical and alternative pathway of the human complement system. Calreticulin (CRT), a highly pleiotropic protein, which is present in all the cellular lineages except erythrocytes, has been isolated from the saliva of other hematophagous arthropods. In this study was demonstrated the presence of CRT in *T. infestans* salivary gland extract (TiCRT), using antigenic and functional criteria. Whole *T. infestans* salivary gland extract was analyzed in 10% w/v sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE), in the presence of  $\beta$ 2-mercaptoethanol. A replica was subjected to western blotting, where heterologous antibodies recognized putative TiCRT. Functionally, and as expected, it was verified that TiCRT present in the salivary gland extract specifically bound C1q, the danger signal recognition module from the classical pathway of the human complement system. Moreover, the TiCRT-containing salivary gland extract, did inhibit that route of activation, as verified in immunometric assays. Most likely, in this assay the TiCRT binding to C1q mediated a decrease in the deposit to the solid phase of C4b. This is the central unit of the C3 and C5 complement convertases. Altogether, these data allow proposing that the salivary gland extract from *T. infestans* contains a molecule that has apparent weight and antigenic and functional properties compatible with those known for CRT.

**Key terms:** calreticulin; *Triatoma infestans*; Chagas' disease; *Trypanosoma cruzi*; complement system

## INTRODUCCIÓN

La enfermedad de Chagas o Tripanosomiasis Americana es una importante zoonosis que afecta al continente Americano. Existen más de diez millones de personas infectadas y más de cuarenta millones de personas en riesgo de contraer la infección (Schofield *et al.*, 2006). En Chile, esta enfermedad presenta una distribución urbana y peri-urbana en las seis primeras Regiones, incluida la de Arica y Parinacota y la Metropolitana (Acuña, 2002). Su agente etiológico es el protozoo flagelado intracelular *Trypanosoma cruzi*, un parásito que presenta un ciclo de vida indirecto, con un hospedero invertebrado y otro vertebrado (Apt *et al.*, 2008). Aunque se sabe que mamíferos silvestres y también aquellos con valor productivo y afectivo son importantes reservorios del parásito, se desconoce el impacto de este parasitismo sobre ellos. Existen diversas formas de transmisión de esta enfermedad, donde destaca la vectorial, a través de insectos hematófagos del orden *Hemiptera*, familia *Reduviidae*, subfamilia *Triatominae*, siendo los vectores biológicos en nuestro país *Triatoma infestans* que participa en el ciclo doméstico, *Mepraia spinolai* y *Mepraia gajardoi*, ambos responsables del ciclo silvestre. *M. gajardoi* se ha aislado en zonas desérticas costeras del norte de Chile y se desconoce su importancia epidemiológica. Estos insectos son conocidos comúnmente en nuestro país como vinchucas (Canals *et al.*,

2000). Los vectores silvestres se desarrollan principalmente en ambientes ecológicamente cerrados o semiabierto y el parásito se alberga en mamíferos de pequeño y mediano tamaño, además de los insectos vectores (Acuña, 2002). *T. infestans* es el responsable de la mayoría de casos en América Latina y su diseminación en el continente se debe a patrones de migración humana, adaptándose progresivamente a hábitats más estables como el ofrecido por viviendas rurales y su periferia (Schofield, 1988). Otras formas de transmisión incluyen la vía congénita, las transfusiones sanguíneas, el trasplante de órganos, y, excepcionalmente, los accidentes de laboratorio y la vía lactogénica. Recientemente, se ha descrito la importancia de la infección por vía oral, por consumo de alimentos contaminados con parásitos (Miles *et al.*, 2003). No existen vacunas para prevenir la transmisión de esta enfermedad ni para realizar tratamientos a gran escala; sin embargo se han establecido técnicas para interrumpir su transmisión, principalmente eliminando los insectos vectores mediante el uso de insecticidas piretroides y mejorando las condiciones de vivienda (Dias *et al.*, 2002).

En cuanto al ciclo de vida de *T. cruzi*, éste comienza cuando la vinchuca ingiere el protozoo en forma de tripomastigote al alimentarse de un mamífero previamente infectado. En el intestino medio del insecto el protozoo se transforma a la forma epimastigote y se multiplica, para luego convertirse en

tripomastigote metacíclico en el intestino posterior. Esta forma del parásito es entonces depositada en un nuevo hospedero a través de las deyecciones, ingresando por el sitio de la picadura o a través de las mucosas. Una vez dentro de la célula, *T. cruzi* se transforma a su forma amastigote, se multiplica por fisión binaria y puede transformarse a tripomastigote, el que puede invadir células vecinas o diseminarse a otros órganos vía circulación sanguínea (Tyler *et al.*, 2001).

Cavalcante *et al.* (2003) demostraron que la saliva de insectos hematófagos de la subfamilia *Phlebotominae* posee biomoléculas farmacológicamente activas que interfieren en procesos fisiológicos del hospedero vertebrado. Distintos mecanismos contribuyen a este fenómeno, tales como la inhibición de la presentación de antígenos (Theodos y Titus, 1993), la reducción de la producción de óxido nítrico por macrófagos infectados (Hall y Titus, 1995), el aumento de la secreción de interleuquina 4 por linfocitos T (Lima y Titus, 1996) y el aumento de la quimiotaxis de macrófagos (Zer *et al.*, 2001). Otros autores han descrito que la saliva de artrópodos hematófagos posee una serie de propiedades que favorecen la ingestión de sangre del hospedero, tales como la inhibición de la vasoconstricción, de la agregación plaquetaria y de la coagulación (Barros *et al.*, 2009).

El sistema del complemento de los mamíferos, brazo efector principal de la inmunidad innata y adaptativa, está provisto de

al menos tres módulos macromoleculares de reconocimiento (C1, MBL y ficolinas) de una vasta variedad de patrones moleculares asociados a microorganismos ("señales de peligro"). Dependiendo del módulo de reconocimiento involucrado, se activará la ruta clásica (C1) ó la de las lectinas (MBL ó ficolinas). El sistema también puede activarse mediante una ruta alterna, independientemente de esos módulos, si se detectan membranas biológicas carentes de ácido siálico, como es frecuente en algunos patógenos. Derivado de esta activación se desencadena una cascada de reacciones proteolíticas y de interacciones moleculares covalentes y no covalentes, con generación de una variedad de péptidos y complejos macromoleculares heteropoliméricos que median funciones pro-inflamatorias (C3a, C4a, C5a), opsonizantes (C3b, C4b), destructoras de membranas biológicas (C5a-C9) y coestimuladoras de la respuesta inmune (C3d, C4d), entre otras.

Los parásitos protozoarios y metazoarios frecuentemente han desarrollado mecanismos para inhibir la activación del complemento. Los parásitos hematófagos también han desarrollado mecanismos para inactivar el complemento presente en la sangre ingerida, posiblemente evitando así el daño a las mucosas digestivas. Por ejemplo, extractos de glándula salival de *Panstrongylus megistus*, *Triatoma brasiliensis*, *Rhodnius prolixus* y *Lutzomyia migonei* inhiben la vía clásica del sistema del complemento, mientras que los de

*Lutzomyia longipalpis* inhiben, además, la vía alterna (Cavalcante *et al.*, 2003). Por otra parte, extracto salival de artrópodos del género *Ixodes* inhibe sólo la vía alterna (Valenzuela *et al.*, 2000; Cavalcante *et al.*, 2003). Esto es muy importante para el hospedero, ya que el sistema del complemento constituye su principal mecanismo de resistencia contra la infestación (Papatheodorou y Brossard, 1987), respondiendo inmediatamente ante el desafío de patógenos, promoviendo la lisis de membranas. La vía clásica es una cascada de reacciones compuesta por diversas moléculas presentes en el plasma en forma inactiva. Algunas de estas son las proteínas C1, C2, C3, C4 y C5. C1 está constituida por C1q, al cual se unen las serino proteasas C1r y C1s, las que al activarse median la proteólisis de C2 y C4, generando fragmentos mayores con actividad catalítica (b) y fragmentos menores (a). Se forma así el complejo C4b,2b (C3 convertasa de la vía clásica) el que activa a C3, generando dos fragmentos, C3a que es liberado a fase fluida y C3b que se une al complejo C4b,2b, formando la C5 convertasa de la vía clásica (C4b,2b,3b), la que activa a C5, generando C5a y C5b. Este último se une a la membrana del antígeno acompañado de C6, C7, C8 y C9, generando un poro en la membrana celular, lo que produce su lisis (Hughes-Jones, 1986). El conjunto de proteínas que forman el poro se conoce como complejo de ataque a membranas, y en él convergen las tres vías de activación del sistema del complemento.

Además de su rol en la inmunidad innata, actuando directamente sobre microorganismos, el sistema del complemento es importante en el normal funcionamiento del sistema inmune adaptativo, contribuyendo a la presentación de antígenos que hace mucho más eficiente a la respuesta humoral (Barrington *et al.*, 2001; Carroll, 2004; Fujita *et al.*, 2004).

En 1991 Ramos *et al.* descubrieron una proteína a la que llamaron Tc45. Ésta fue después denominada calreticulina (CRT) de *T. cruzi* (TcCRT), y se describió que posee un importante efecto inhibitorio de la ruta clásica del sistema del complemento humano (Ferreira *et al.*, 2004), gracias a su capacidad de interferir con la función de las serino proteasas C1r y C1s (Valck *et al.*, 2010). TcCRT juega también un importante rol en la autoinmunidad (Ribeiro *et al.*, 2009), inhibe la angiogénesis y suprime el crecimiento tumoral (López *et al.*, 2010), estimula la infectividad parasitaria (Ramírez *et al.*, 2010), y modula el sistema del complemento (Valck *et al.*, 2010).

Por otro lado, en 1995 Jaworski *et al.* reportaron la secreción de CRT en saliva de *Amblyomma americanum* y *Dermacentor*, sugiriendo un rol de esta proteína en el proceso de alimentación del parásito, a través de su capacidad inmunosupresora y antihemostática en el hospedero. En 1996, Jaworski *et al.* descubrieron la presencia de esta proteína en glándulas salivales de pulgas de la especie *Xenopsylla cheopis*.

CRT fue después estudiada por Michalak *et al.* (1999), quienes describieron que esta proteína tiene un peso molecular de 46 kDa y, que a pesar de portar una señal de retención (KDEL o relacionada) en el retículo endoplásmico (RE), también se la ha localizado fuera de éste, en núcleo (Burns *et al.*, 1994), gránulos citoplasmáticos de células T citotóxicas (Andrin *et al.*, 1998), superficie celular (Arosa *et al.*, 1999), citosol (Holaska *et al.*, 2001), aparato de Golgi y kinetoplastos (Souto-Padrón *et al.*, 2004). También se ha detectado CRT en acrosomas de espermatozoides (Nakamura *et al.*, 1993), espacio extracelular de varios tipos celulares (Eggleton *et al.*, 1994), saliva de garrapatas (Jaworski *et al.*, 1995), saliva humana (Bigler y Streckfus, 2004) y membrana celular de *T. cruzi*, preferentemente en la zona de emergencia flagelar (Ferreira *et al.*, 2004). Desde el punto de vista estructural, CRT presenta tres dominios: N, que inhibe la proliferación de células endoteliales y suprime la angiogénesis; C, que une calcio con baja afinidad y factores de la coagulación sanguínea y, P, que une calcio con alta afinidad y posee actividad chaperona, modelando el plegamiento proteico. Desde el punto de vista funcional, dentro del RE, CRT es una molécula chaperona y regula la homeostasis del calcio. En el primer caso, está relacionada con el control de la síntesis de variadas moléculas como canales de iones, receptores de superficie, integrinas y

transportadores. En el segundo, afecta el transporte de calcio a través de la membrana del RE, regulando la concentración de calcio intra retículo. Además CRT cumple otras funciones fuera del RE, tales como la modulación de la adhesión celular, de la señalización de calcio dependiente de integrina y de la expresión génica sensible a esteroides (Michalak *et al.*, 1999).

Se propone entonces, que en extracto de glándula salival de *T. infestans* existe CRT, lo que explicaría, al menos en parte, el efecto anticomplemento que manifiesta la saliva de estos parásitos hematófagos. El objetivo general de este trabajo es conocer nuevas variantes relevantes en la interacción hospedero vertebrado / parásito / vector hematófago, determinando la presencia y el efecto anticomplemento de CRT en glándula salival de *T. infestans*. Para esto, los objetivos específicos son, en primer lugar, obtener extracto de glándula salival de vinchuca. En segundo lugar, mediante un criterio antigénico, determinar la presencia de CRT en dicho extracto y la unión de la CRT putativa contenida en el extracto glandular a C1q inmovilizado, y, finalmente, mediante un criterio funcional, determinar el efecto inhibitor del extracto glandular salival sobre la vía clásica del sistema del complemento humano.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### *Materiales*

rTcCRT, el suero pre-inmune de conejo, el suero pre-inmune de llama, el anticuerpo policlonal (AcPo) de conejo anti-TcCRT, el AcPo de llama anti-TcCRT y el AcPo de conejo anti-inmunoglobulina (Ig) de llama fueron generados en el Laboratorio de Inmunología de la Agresión Microbiana (LIAM), Programa Disciplinario de Inmunología, Instituto de Ciencias Biomédicas (ICBM), Facultad de Medicina, Universidad de Chile (Aguilar *et al.*, 2005). El suero normal humano fue obtenido desde un donante sano perteneciente al LIAM.

### *Triatoma infestans*

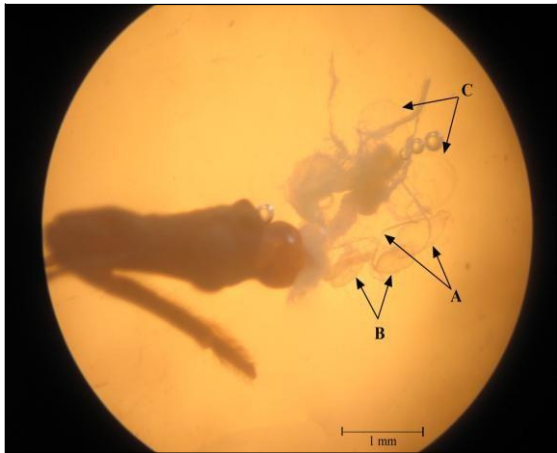
Las vinchucas se obtuvieron del Laboratorio de Parasitología, Programa de Biología Molecular y Celular, ICBM, Facultad de Medicina, Universidad de Chile. Para este trabajo se utilizaron ejemplares adultos de ambos sexos, no infectados con el protozoo.

### *Disección de glándulas salivales de T. infestans*

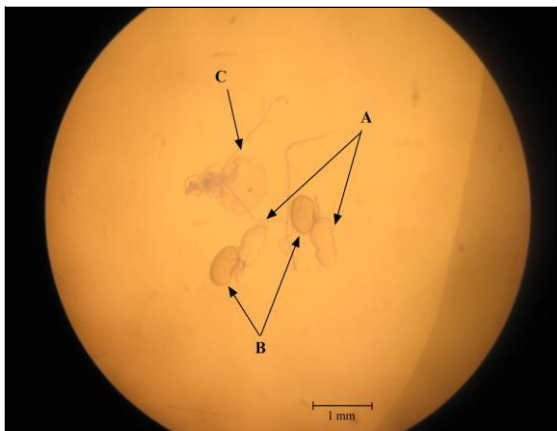
Las vinchucas fueron anestesiadas con cloroformo (Merck) y, bajo lupa (Baush & Lomb) con aumento de 10,5X, se traccionó la cabeza del insecto con una aguja hipodérmica,

con lo cual se desprendió el par de glándulas salivales (Fig. 1). Cada insecto adulto posee un par de glándulas salivales, cada uno compuesto por 3 unidades: la principal o D1, elongada, blanquecina, de 1 mm de longitud (Figs. 1A y 2A); la suplementaria o D2, de tamaño más pequeño y forma más redondeada, amarillenta, de 0,5 mm de longitud (Figs. 1B y 2B) y, la accesoria o D3, redondeada, trasluciente y de 1 mm aproximado de longitud (Figs. 1C y 2C). La unidad principal y la suplementaria se encuentran situadas una al lado de la otra en el protórax, mientras que la unidad accesoria se encuentra alejada de éstas en el mesotórax (Reis *et al.*, 2003). 5 pares de glándulas fueron suspendidas en 20 µl de tampón fosfato salino (PBS) 1x en un tubo Eppendorf, mantenido en hielo durante todo el procedimiento. Al extracto utilizado para realizar los experimentos de determinación de la presencia de CRT en extracto de glándula salival de *T. infestans* se agregó un cóctel de inhibidores de proteasas libre de ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) contra serino proteasas, cisteíno proteasas y proteínas tipo tripsina, conteniendo AEBSF, apronitina, E-64 y leupeptina (Calbiochem). Para determinar la inhibición del sistema del complemento se utilizó extracto de glándula salival fresco. Este procedimiento se repitió cuantas veces fue necesario para proporcionar la cantidad de extracto de glándula salival requerida (modificado de Cavalcante *et al.*, 2003).





**Figura 1:** Glándulas salivales de *T. infestans* observadas a través de lupa con aumento 10,5X. (A) Unidad principal o D1; (B) Unidad suplementaria o D2 y (C) Unidad accesoria o D3.



**Figura 2:** Unidades de glándulas salivales de *T. infestans* aisladas y observadas bajo lupa con aumento de 10,5X. (A) Unidad principal o D1; (B) Unidad suplementaria o D2 y (C) Unidad accesoria o D3.

#### *Preparación de extracto de glándula salival de T. infestans*

Lo obtenido en el procedimiento anterior se sometió a sonicación en hielo durante 10 segundos (sonicador Microson, Misonix), se centrifugó a 10.000 g durante 2 minutos en

centrifuga Centra MP4R, IEC y se extrajo el sobrenadante, el que fue depositado en un tubo Eppendorf, separado en alícuotas, y posteriormente congelado a  $-80^{\circ}\text{C}$ , (Cavalcante *et al.*, 2003).

#### *Determinación de CRT en extracto de glándula salival de T. infestans mediante SDS-PAGE y transferencia electroforética*

Se realizó una electroforesis en gel de poliacrilamida al 10% p/v, en presencia de dodecilsulfato de sodio (SDS-PAGE) (Sigma), según el procedimiento descrito por Laemmli (1970). Pevio a cargar las muestras en el gel, las proteínas fueron denaturadas con  $\beta$ 2-mercaptoetanol al 5% v/v (Sigma) y calentadas a  $100^{\circ}\text{C}$  durante 5 minutos. La electroforesis se realizó en una cámara Bio-Rad a 100 V y temperatura ambiente. En los pocillos se cargaron 4  $\mu\text{l}$  de marcador preteñido de proteínas BM-1110, rango 20-118 kDa (Winkler), según indicaciones del fabricante, 10  $\mu\text{l}$  de extracto de glándula salival de *T. infestans* (correspondiente a 50  $\mu\text{g}$  de proteína total, según procedimiento de Bradford, 1976), y 10  $\mu\text{l}$  de rTcCRT (correspondiente a 10  $\mu\text{g}$  de proteína), como control de posición. El gel fue teñido con azul de Coomasie (Sigma) y su réplica fue sometida a transferencia electroforética (Towbin *et al.*, 1979). En este caso, se utilizó un marcador preteñido de proteínas Color Plus de rango 7-175 kDa (BioLabs, New England) y se cargaron 10  $\mu\text{g}$

de extracto de glándula salival y 10 ng de rTcCRT como control positivo. Con este método fueron transferidas las proteínas a una membrana de nitrocelulosa (GE Healthcare) en un sistema húmedo a 4°C, durante 1 hora a 100 V, en cámara Bio-Rad. Posteriormente, se bloqueó con PBS-leche descremada al 5%, durante toda la noche a 4°C y, al día siguiente, la membrana fue incubada con AcPo de conejo anti-TcCRT y luego con un AcPo de cabra anti-Ig de conejo, conjugado a fosfatasa alcalina (Sigma). Como control negativo se utilizó suero pre-inmune de conejo, el que se incubó con Ac secundario de cabra anti-Ig de conejo, conjugado a fosfatasa alcalina. En un segundo paso, la membrana fue incubada con un AcPo de llama anti-TcCRT, luego con AcPo de conejo anti-Ig de llama, y con un AcPo de cabra anti-Ig de conejo conjugado a fosfatasa alcalina (Sigma). En este caso se realizaron 2 controles negativos: el primero con suero pre-inmune de llama, seguido por un AcPo secundario de conejo anti-Ig de llama, y con un AcPo terciario de cabra anti-Ig de conejo conjugado a fosfatasa alcalina. El segundo control se realizó con AcPo de llama anti-TcCRT y suero pre-inmune de conejo, ocupando como Ac terciario el de cabra anti-Ig de conejo conjugado a fosfatasa alcalina. Todos los anticuerpos utilizados en este procedimiento se diluyeron 1:1.000 en PBS-leche descremada 3% p/v, y las incubaciones se realizaron durante 90 minutos a temperatura ambiente. Entre cada incubación se realizaron

4 lavados, de 5 minutos cada uno, con PBS-Tween 20 al 0,05% v/v. Finalmente, en ambos casos, la membrana fue revelada con sustrato para fosfatasa alcalina preparada con solución Nitro Blue Tetrazolium (NBT) (Sigma), fosfato 5-bromo 4-cloro-indol (BCIP) (Sigma) y buffer fosfatasa alcalina.

#### *Determinación de la unión de CRT putativa de T. infestans a C1q inmovilizado*

Se realizó un SDS-PAGE donde se corrieron 15 µg de C1q puro (Sigma), el que posteriormente se sometió a electrotransferencia. Ambos procedimientos se llevaron a cabo bajo las mismas condiciones indicadas en el punto anterior. Una vez transferida, dicha proteína fue incubada con 100 µg de extracto de glándula salival de *T. infestans* durante 3 horas, lo que fue luego incubado con un AcPo de conejo anti-TcCRT en dilución 1:1.500, también durante 3 horas, y éste fue reconocido por un AcPo de cabra anti-Ig de conejo, conjugado a fosfatasa alcalina en dilución 1:3.000 (Sigma), incubado esta vez por 1 hora. Todas las incubaciones se realizaron a temperatura ambiente. Como controles positivos, en primer lugar, se corrieron 300 ng de C1q humano que se incubaron con un Ac de conejo anti-C1q humano 1:1.500 durante 90 minutos, y después con un AcPo de cabra anti-Ig de conejo conjugado a fosfatasa alcalina 1:1.000, también durante 90 minutos; en segundo lugar,

se corrieron 15 µg de C1q humano que fueron incubados con 200 µg de rTcCRT durante 3 horas, lo que fue incubado luego con un AcPo de conejo anti-TcCRT 1:1.500 por 3 horas, y posteriormente con un AcPo de cabra anti-Ig de conejo, conjugado a fosfatasa alcalina 1:3.000 por 1 hora. Como control negativo, en primer lugar, se corrió C1q (15 µg) que fue incubado con PBS- leche durante 3 horas, luego con un AcPo de conejo anti-TcCRT 1:500, también durante 3 horas, y con un AcPo de cabra anti-Ig de conejo conjugado a fosfatasa alcalina 1:3.000, durante 1 hora. Como segundo control negativo se incubó la misma cantidad de C1q con 100 µg de extracto de glándula salival durante 3 horas, lo que fue luego incubado con PBS-leche también por 3 horas, y finalmente, con AcPo de cabra anti-Ig de conejo conjugado a fosfatasa alcalina 1:3.000, durante 1 hora. La membrana fue revelada con el mismo sistema indicado en el punto anterior (modificado de Oladiran y Belosevic, 2009).

*Determinación del efecto inhibitor del extracto de glándula salival de T. infestans sobre la vía clásica del sistema del complemento humano*

Se realizó un ELISA (Engvall y Perlmann, 1971), en el que se sensibilizó una placa de microtitulación de policloruro de vinilo (Nunc) con 100 µl de IgG (4 µg/ml) por pocillo, durante 16 horas a 4°C. Los sitios remanentes

de la fase sólida fueron bloqueados con 250 µl de PBS-albúmina de suero bovino (BSA) al 3% p/v, 2 horas a 37°C (en incubadora Abbot, Commander). Entre cada paso se lavó la placa con PBS-Tween 20 al 0,05% v/v. Luego, la placa se incubó con diluciones seriadas (1:40 a 1:1.280) de suero normal humano como fuente de C1 y de C4, en presencia de buffer Veronal (“5,5-diethylbarbituric acid sodium salt 5 mM”, NaCl 140 mM, MgCl<sub>2</sub> 0,5 mM, CaCl<sub>2</sub> 0,15 mM), durante 1 hora a 37°C. En un ensayo posterior, ya determinada la dilución de suero normal humano a utilizar (aquella que resultó en el depósito de una cantidad subsaturante de C1, juzgado esto por su capacidad de activar a C4), se siguió el mismo procedimiento anterior en cuanto a sensibilización, bloqueo y lavado de la placa, y se preincubó el suero normal humano con distintas concentraciones de extracto de glándula salival de *T. infestans*, durante 30 minutos a 37°C, en presencia de buffer Veronal conteniendo MgCl<sub>2</sub> y CaCl<sub>2</sub>, ambos necesarios para activar la ruta clásica del complemento. Como controles positivos de inhibición se usó EDTA 10 µM, molécula quelante de calcio (con lo cual se inhibe la activación del sistema del complemento), rTcCRT y rHuCRT, las que se unen al componente C1 impidiendo que éste se active y se desarrolle así la cascada de reacciones del complemento. Además se incluyó BSA, como control negativo de inhibición. Las proteínas mencionadas fueron utilizadas en

concentraciones de 0, 4,8 y 9,6  $\mu\text{M}$ . Luego, la placa fue incubada con 100  $\mu\text{l}$  por pocillo de AcPo de cabra anti-C4 humano (Calbiochem), en dilución 1:4.000 durante 1 hora a 37°C, y posteriormente con 100  $\mu\text{l}$  de AcPo de conejo anti-Ig de cabra conjugado a peroxidasa (Calbiochem), en dilución 1:10.000, durante 1 hora a 37°C. Como control negativo, no se agregó anticuerpo primario en determinados pocillos. Finalmente, se reveló con 100  $\mu\text{l}$  por pocillo de una solución que contenía 11  $\mu\text{l}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$  al 30% y 11 ml de ABTS (“2,2’-azino-bis 3-ethylbenzothiazoline 6-sulfonic acid diammonium salt”) (Sigma), lo que fue leído en espectrofotómetro (Microplate Reader, Bio-Rad) a 405 nm, a 0, 5, 10, 15, 20 y 25 minutos (modificado de Ferreira *et al.*, 2004).

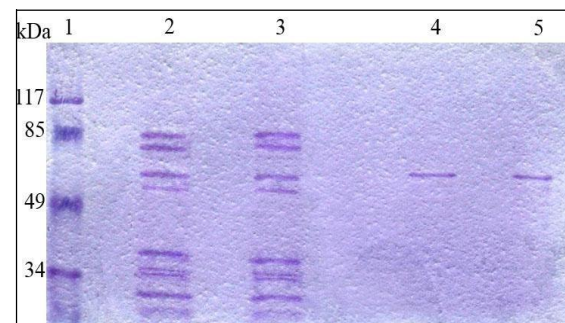
#### *Análisis estadístico*

Se determinaron las medias y las desviaciones estándar de las densidades ópticas en triplicado obtenidas en el ensayo de ELISA. Se realizó un análisis de varianza (ANDEVA) de dos colas, para comparar las densidades ópticas del grupo control negativo de inhibición con el extracto de glándula salival de *T. infestans* y se calculó el valor de *p* con el programa GraphPad Prism® versión 5.01.

## **RESULTADOS**

### *Presencia de CRT putativa en extracto de glándula salival de T. infestans*

En la Figura 3 se observa el perfil electroforético proteico, teñido con Azul de Coomassie, del extracto de glándula salival de *T. infestans* y de rTcCRT, como control de posición. Se observaron diversas bandas, cuyos pesos moleculares aparentes se estimaron mediante interpolación en un gráfico que consideró la movilidad electroforética relativa (Rf) y el logaritmo de peso molecular (resultados no mostrados). rTcCRT mostró un peso molecular aparente de 60 kDa, según lo esperado. Los resultados son representativos de tres experimentos independientes.

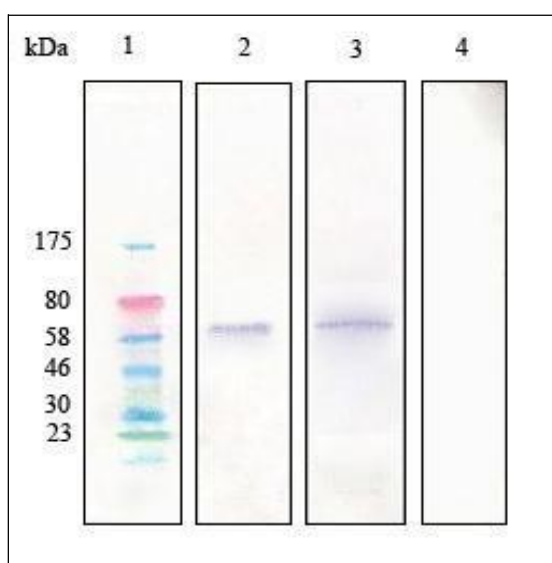


**Figura 3:** SDS-PAGE de extracto de glándula salival de *T. infestans*. (1) Marcador preteñido de proteínas (kDa); (2 y 3) Extracto de glándula salival de *T. infestans*; (4 y 5) rTcCRT.

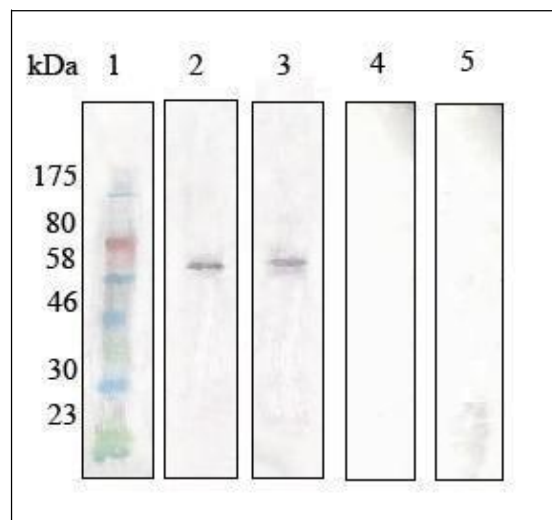
### *Anticuerpos heterólogos reconocen CRT putativa de T. infestans en extracto de glándula salival*

Se observó una banda con un peso molecular aparente de 60 kDa al incubar el extracto glandular con un AcPo de conejo anti-TcCRT (Fig. 4.2). Una situación similar ocurrió al

utilizar un AcPo de llama anti-TcCRT (Fig. 5.2). Esto indicaría que existe una proteína que posee epítomos comunes con TcCRT, la que correspondería a TiCRT. Como control positivo se corrió rTcCRT, cuya banda presentó un peso molecular aparente de 60 kDa, según lo esperado (Figs. 4.3 y 5.3). Los resultados son representativos de tres experimentos independientes.



**Figura 4:** Anticuerpos lapinos contra TcCRT reconocen CRT putativa en extracto de glándula salival de *T. infestans* (TiCRT). (1) Marcador preteñido de proteínas; (2) Extracto de glándula salival de *T. infestans* incubado con AcPo de conejo anti-TcCRT; (3) rTcCRT incubada con AcPo de conejo anti-TcCRT; (4) Extracto de glándula salival de *T. infestans* incubado con suero pre-inmune de conejo.

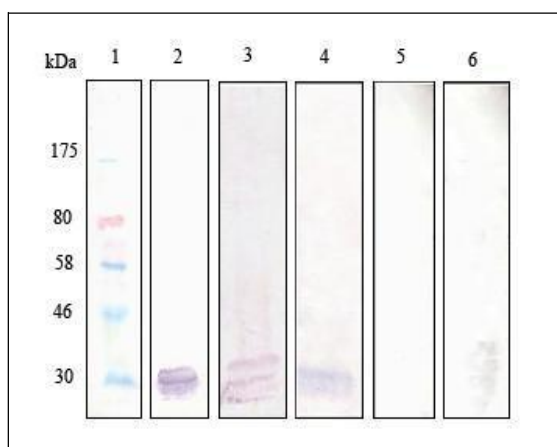


**Figura 5:** Anticuerpos de llama anti-TcCRT reconocen TiCRT. (1) Marcador preteñido de proteínas; (2) Extracto de glándula salival de *T. infestans* incubado con AcPo de llama anti-TcCRT; (3) rTcCRT incubada con AcPo de llama anti-TcCRT; (4) Extracto de glándula salival de *T. infestans* incubado con suero pre-inmune de llama; (5) Extracto de glándula salival de *T. infestans* incubado con AcPo de llama anti-TcCRT y suero pre-inmune de conejo.

#### *CRT putativa de T. infestans se une a C1q inmovilizado*

Diversos laboratorios han demostrado que CRT, de diversos orígenes, se une a C1q, interfiriendo con la función de esta molécula (Malhotra *et al.*, 1990; Kasper *et al.*, 2001; Ferreira *et al.*, 2004; Suchitra *et al.*, 2008; Naresha *et al.*, 2009; Oladiran y Belosevic, 2009; Ramírez *et al.*, 2010). Por ello, se investigó si TiCRT putativa manifiesta esa propiedad funcional. De acuerdo a lo esperado, cuando C1q se analizó electroforéticamente y se incubó con anticuerpos anti-C1q, se detectaron tres bandas en el rango de los 30

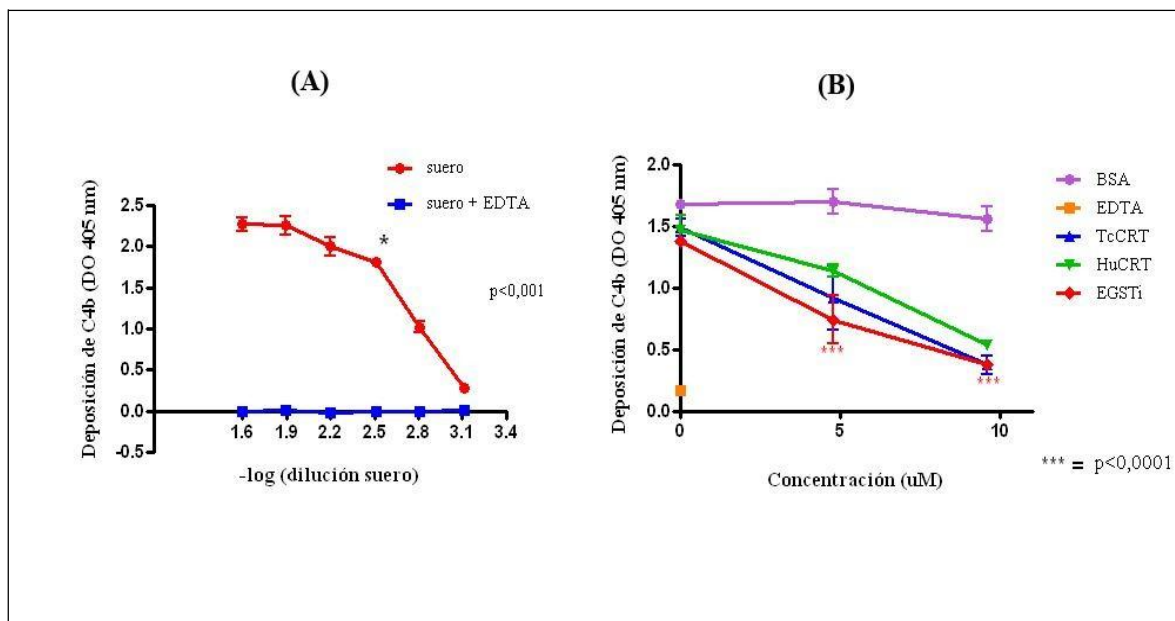
kDa, en la membrana de nitrocelulosa, las que corresponderían a las cadenas polipeptídicas A, B y C de C1q (Fig. 6.2). C1q humano, analizado de esta forma, fue luego incubado con rTcCRT, seguido de anticuerpos contra esta molécula. Se observaron, nuevamente, 3 bandas en el rango de los 30 kDa, que corresponderían a las cadenas polipeptídicas de C1q (Fig. 6.3). Cuando C1q analizado electroforéticamente, fue revelado con el extracto glandular de *T. infestans*, seguido de anticuerpos anti-TcCRT, de comprobada capacidad para reconocer TiCRT, se reveló un patrón de bandeo similar al observado en los casos anteriores (Fig. 6.4).



**Figura 6:** TiCRT se une a C1q inmovilizado. (1) Marcador preteñido de proteínas. C1q humano electrotransferido fue incubado con: (2) Ac anti-C1q humano; (3) rTcCRT; (4) Extracto de glándula salival de *T. infestans*; (5) PBS-leche; (6) Extracto de glándula salival de *T. infestans* y PBS-leche.

### *El extracto de glándula salival de T. infestans inhibe la vía clásica del sistema del complemento humano*

Ferreira *et al.* en 2004 describieron que TcCRT se une a las colas colagenosas de C1q, inhibiendo la activación de la vía clásica del sistema del complemento, mediado por la activación de C4 *in vitro*. Dado que CRT de diversos orígenes se une a C1q, interfiere con la función de las serino proteasas y las inactiva, si CRT está presente en el extracto de glándula salival del hematófago, debiera también interferir. Por ello, se realizó un ensayo de activación de C4, de acuerdo a lo descrito en la sección Métodos, eligiéndose la dilución 1:320 que activó en un 70% a esta proteína. El C1, contenido en el suero normal, al unirse a las inmunoglobulinas de la placa de microtitulación, medió la generación de C4b que se unió covalentemente a las proteínas adsorbidas a la fase sólida y fue detectado por un Ac de cabra anti-C4 humano (Fig. 7A). De acuerdo a lo esperado, cuando se pre-incubó el suero normal humano con el extracto de glándula salival de *T. infestans*, que contenía la CRT putativa, se observó una disminución en la generación de C4b. En la Figura 7B se muestran los resultados de las mediciones en triplicado de las densidades ópticas obtenidas de cada proteína en estudio. La densidad óptica representa, en este caso, el depósito de C4b. El valor de *p* para este ensayo fue menor a 0,0001.



**Figura 7.** El extracto de glándula salival de *T. infestans* (EGSTi) inhibe la vía clásica del sistema del complemento humano. **(A)** Titulación de la activación de C4 humano sérico por C1 unido a una fase sólida. El asterisco indica la dilución 1:320 que activó en un 70% a C4. **(B)** Inhibición de la generación de C4b humano por EGSTi. Los resultados son representativos de tres experimentos independientes, y los datos mostrados corresponden al promedio de las observaciones en triplicado. La concentración de CRT en EGSTi es sólo estimativa y se calculó en base a la intensidad de banda obtenida en el IWB, en comparación con la banda obtenida para TcCRT, infiriendo que existe aproximadamente un 1% de CRT en extracto de glándula salival de *T. infestans*.

## DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

El sistema del complemento de los mamíferos es un importante brazo efector de la inmunidad innata y adaptativa. Los agresores microbianos y parásitos en general han desarrollado una variedad de mecanismos celulares y moleculares para enfrentar a este sistema defensivo. La saliva de varias especies de ectoparásitos hematófagos artrópodos manifiesta propiedades anticomplemento, posiblemente como un mecanismo defensivo contra la acción de este sistema presente en la

sangre ingerida, que podría dañar la extensa estructura epitelial del tubo digestivo del insecto. La definición molecular de los componentes de la saliva en general, y de insectos hematófagos en particular, que poseen propiedades anticomplemento, es emergente en la literatura (Valenzuela *et al.*, 2000; Cavalcante *et al.*, 2003; Barros *et al.*, 2009).

En este trabajo, usando criterios antigénicos y funcionales, se ha detectado en extracto de glándula salival de *T. infestans* una proteína con un peso molecular aparente de 60 kDa, que se propone designar como

calreticulina de *T. infestans* (TiCRT). Esta proteína es reconocida por anticuerpos heterólogos contra TcCRT, generados en conejos y llamas (Fig. 4.2 y 5.2). TiCRT tendría la capacidad de inhibir la vía clásica del sistema del complemento, lo que se evidenció al detectar una disminución significativa en la generación de C4b *in vitro*, en presencia de la proteína contenida en el extracto de glándula salival (Fig. 7B). El mecanismo de acción de TiCRT sería similar al descrito para TcCRT, la que se une a C1, específicamente a sus serino proteasas C1s y C1r, impidiendo que la primera active a C4 (y, presumiblemente, a C2), bloqueando así las primeras etapas de la cascada de reacciones del sistema (Ferreira *et al.*, 2004; Valck *et al.*, 2010). La posibilidad que CRT, presente en la glándula salival de *T. infestans*, inhiba el complemento se sustenta en su capacidad de interactuar con C1q inmovilizado (Fig. 6.4). Esta capacidad de interacción entre CRT y C1q ha sido documentada previamente en parásitos helmintos de vertebrados por distintos autores (Kasper *et al.*, 2001; Suchitra *et al.*, 2008; Naresha *et al.*, 2009) y, más recientemente, en un parásito de peces como es *Trypanosoma carassii* (Oladiran y Belosevic, 2009).

Los anticuerpos policlonales de conejo y de llama anti-TcCRT reconocieron una banda de aproximadamente 60 kDa en el extracto de glándula salival de *T. infestans*. Aunque la identidad de secuencias proteicas

entre TcCRT y la CRT de un insecto hematófago como *R. prolixus*, de la misma subfamilia que *T. infestans*, es de sólo un 42 % (EMBL-EBI Database, ©European Bioinformatics Institute, 2010), sería suficiente para que anticuerpos reconozcan en forma cruzada TiCRT.

Como se muestra en la Figura 7B, EGSTi, TcCRT y HuCRT inhiben la generación de C4b. Dado que se desconoce aún la concentración de CRT en EGSTi, no es posible comparar, en términos equimolares, su capacidad inhibidora con la de HuCRT ó de TcCRT. Tampoco se puede excluir la posibilidad que en el extracto de glándula salival, además de TiCRT, existan otras moléculas con actividad anticomplemento o que exista un efecto aditivo o incluso sinérgico entre TiCRT y otra(s) proteína(s) salivares.

Evidentemente, la identificación antigénica y funcional de TiCRT en extracto de glándula salival de *T. infestans* será complementada por su identificación en saliva, dependiente esto de la estandarización de un método confiable de extracción de este fluido biológico. También complementará esta propuesta el análisis de la banda correspondiente a TiCRT mediante espectrometría de masa, esperando que mantenga un grado de homología significativa con calreticulinas conocidas en otros triatomos.

Basados en los resultados de este trabajo, se podría proponer que la inhibición



de la vía clásica del sistema del complemento del hospedador, constituye un mecanismo de evasión de la respuesta inmune innata por parte del vector hematófago. Se estaría así frente a una adaptación evolutiva que permitiría al insecto hematófago disminuir la posibilidad que los módulos que permiten al complemento detectar señales de peligro, C1, MBL y ficolinas, que reconocen un amplio rango de patrones moleculares asociados a microorganismos (MAMPs), lo hagan en el tubo digestivo del vector. Quizás, en paralelo, se proteja también a eventuales *Trypanosomas* que pudieran estar presentes en el lumen de ese órgano, en distintas etapas de su ciclo de vida. En otras palabras, la presencia de actividad anticomplemento en la saliva de artrópodos hematófagos, filogenéticamente distintos, sugiere que los inhibidores del complemento pueden tener un rol fisiológico importante para estos organismos, protegiendo las células del hospedero contra el ataque del sistema del complemento después de la ingestión de volúmenes relativamente masivos de sangre (Barros *et al.*, 2009). Se propone a TiCRT como uno de estos posibles inhibidores.

El estudio de la relación parásito / vector artrópodo / hospedero, y más aún, la identificación de distintos factores presentes en la saliva de artrópodos, y específicamente inhibidores del complemento, puede llevar a describir potenciales componentes de subunidades de vacunas contra enfermedades

transmitidas por parásitos. Puede ser posible en el futuro usar bloqueadores de inhibidores del complemento como parte de vacunas para impedir el desarrollo de patógenos sensibles al complemento en sus vectores, como el caso de *T. cruzi* en *T. infestans*. Para este objetivo es fundamental secuenciar las proteínas presentes en la saliva, o en el extracto de glándula salival, de parásitos hematófagos, ya que pueden existir nuevas moléculas que medien actividades evasivas en el hospedero. En este sentido, se debe tener precaución ya que existe polimorfismo en las proteínas salivales de artrópodos, y moléculas de distintas regiones geográficas no se conservan 100%, por tanto, una vacuna contra una determinada molécula puede ser efectiva en una región geográfica limitada. Por esta razón se deben incluir al menos dos blancos salivares en cualquier vacuna anti-artrópodo.

En síntesis, se propone que en *T. infestans* se expresa calreticulina, en particular en sus glándulas salivales. Esta molécula sería responsable, al menos parcialmente, de la actividad anticomplemento desplegada por el extracto de esos órganos.

#### AGRADECIMIENTOS

A todos los miembros del Laboratorio de Inmunología de la Agresión Microbiana y del Programa Disciplinario de Inmunología, ICBM, Facultad de Medicina, Universidad de Chile y al Laboratorio de Parasitología, Programa Disciplinario de Biología Molecular y Celular, ICBM, Facultad de Medicina, Universidad de Chile.

Financiamiento: Proyecto Bicentenario de Anillos de Investigación Asociativa ACT 112 y FONDECYT Regular 1095095, CONICYT, Chile.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ACUÑA, M. 2002. La vinchuca silvestre: ¿una amenaza latente? Tecno Vet: año 8 N° 2.
- AGUILAR, L., RAMÍREZ, G., VALCK, C., MOLINA, M.C., ROJAS, A., SCHWAEBLE, W., FERREIRA, V., FERREIRA, A. 2005. F(ab')<sub>2</sub> antibody fragments against *Trypanosoma cruzi* calreticulin inhibits its interaction with the first component of human complement. Biol Res 38: 187-195.
- ANDRIN, C., PINKOSKI, M.J., BURNS, K., ATKINSON, E.A., KRAHENBUHL, O., HUDIG, D., FRASER, S.A., WINKLER, U., TSCHOPP, J., OPAS, M. 1998. Interaction between a Ca<sup>2+</sup>-binding protein calreticulin and perforin, a component of the cytotoxic T-cell granules. Biochem 37: 10386-10394.
- APT, W., HEITMANN, I., JERICIC, M.I., JOFRÉ, L., MUÑOZ, P., NOEMÍ, I., SAN MARTÍN, A.M., SAPUNAR, J., TORRES, M., ZULANTAY, I. 2008. Guías clínicas de la Enfermedad de Chagas. Parte I. Introducción y epidemiología. Rev Chil Infectol 25: 190-193.
- 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.
- BARRINGTON, R., ZHANG, M., FISCHER, M., CARROLL, M. 2001. The role of complement in inflammation and adaptative immunity. Immunol Rev 180: 5-15.
- BARROS, V.C., ASSUMPÇÃO, J.G., CADETE, A.M., SANTOS, V.C., CAVALCANTE, R.R., ARAÚJO, R.N., PEREIRA, M.H., GONTIJO, N.F. 2009. The role of salivary and intestinal complement system inhibitors in the midgut protection of triatomines and mosquitoes. PloS One 4: e6047.
- BIGLER, L., STRECKFUS, C. 2004. Unique protein screening analysis of stimulated whole saliva from healthy individuals and breast cancer patients. Preclínica 2: 52-56.
- BRADFORD, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem 72: 248-254.
- 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.
- CANALS, M., MILDRED, E., CATTAN, P. 2000. Situación de *Mepraia spinolai*, vector silvestre de la enfermedad de Chagas en Chile, en relación con otros vectores desde la perspectiva de sus fuentes de alimentación. Rev Méd Chile 128: 1108-1112.
- CARROLL, M.C. 2004. The complement system in regulation of adaptative immunity. Nat Immunol 5: 981-986.

- CAVALCANTE, R.R., PEREIRA, M.H., GONTIJO, N.F.** 2003. Anti-complement activity in the saliva of phlebotomine sand flies and other haematophagous insects. *Parasitol* 127: 87-93.
- DIAS, J.C.P., SILVEIRA, A.C., SCHOFIELD, C.J.** 2002. The impact of Chagas disease control in Latin America - A Review. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 97: 603-612.
- 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.
- ENGVALL, E., PERLMANN, P.** 1971. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Quantitative assay of immunoglobulin G. *Immunochem* 8: 871-874.
- FERREIRA, V., VALCK, C., SÁNCHEZ, G., GINGRAS, A., TZIMA, S., MOLINA, M.C., SIM, R., SCHWAEBLE, W., FERREIRA, A.** 2004. The classical activation pathway of the human complement system is specifically inhibited by calreticulin from *Trypanosoma cruzi*. *J Immunol* 172: 3042-3050.
- FUJITA, T., MATSUSHITA, M., ENDO, Y.** 2004. The lectin-complement pathway - its role in innate immunity and evolution. *Immunol Rev* 198: 185-202.
- HALL, L.R., TITUS, R.G.** 1995. Sand fly vector saliva selectively modulates macrophage functions that inhibit killing of *Leishmania major* and nitric oxide production. *J Immunol* 155: 3501-3506.
- HOLASKA, J.M., BLACK, B.E., LOVE, D.C., HANOVER, J.A., LESZYK, J., PASCHAL, B.M.** 2001. Calreticulin is a receptor for nuclear export. *J Cell Biol* 152: 127-140.
- HUGHES-JONES, N.C.** 1986. The Classical Pathway. In: ROSS GD (ed) *Immunobiology of the Complement System*. Orlando: Academic Press, Inc. pp 21-43.
- JAWORSKI, D.C., SIMMEN, F.A., LAMOREAUX, W., COONS, L.B., MULLER, M.T., NEEDHAM, G.R.** 1995. A secreted calreticulin protein in Ixodid tick (*Amblyomma americanum*) saliva. *J Insect Physiol* 41: 369-375.
- JAWORSKI, D.C., HIGGINS, J.A., RADULOVIC, S., VAUGHAN, J.A., AZAD, A.F.** 1996. Presence of calreticulin in vector fleas (Siphonaptera). *J Med Entomol* 33: 482-489.
- KASPER, G., BROWN, A., EBERL, M., VALLAR, L., KIEFFER, N., BERRY, C., GIRDWOOD, K., EGGLETON, P., QUINNELL, R., PRITCHARD, D.I.** 2001. A calreticulin-like molecule from the human hookworm *Necator americanus* interacts with C1q and the cytoplasmic signalling domains of some integrins. *Parasite Immunol* 23: 141-152.
- LAEMMLI, U.K.** 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature / London* 227: 680-685.
- LIMA, H.C., TITUS, R.G.** 1996. Effects of sand fly vector saliva on development of cutaneous lesions and the immune response to *Leishmania brasiliensis* in BALB/c mice. *Infect Immun* 64: 5442-5445.

- LÓPEZ, N.C., VALCK, C., RAMÍREZ, G., RODRÍGUEZ, M., RIBEIRO, C., ORELLANA, J., MALDONADO, I., ALBINI, A., ANACONA, D., LEMUS, D., AGUILAR, L., SCHWAEBLE, W., FERREIRA, A.** 2010. Antiangiogenic and antitumor effects of *Trypanosoma cruzi* calreticulin. *PloS Negl Trop Dis* 4: e730.
- MALHOTRA, R., THIEL, S., REID, K.B., SIM, R.B.** 1990. Human leukocyte C1q receptor binds other soluble proteins with collagen domains. *J Exp Med* 172: 955-959.
- MICHALAK, M., CORBETT, E.F., MESAELI, N., NAKAMURA, K., OPAS, M.** 1999. Calreticulin: one protein, one gene, many functions. *Biochem J* 344: 281-292.
- MILES, M.A., FELICIANGELI, M.D., ROJAS DE ARIAS, A.** 2003. American trypanosomiasis (Chagas' disease) and the role of molecular epidemiology in guiding control strategies. *BMJ* 326: 1444-1448.
- NAKAMURA, M., MORIYA, M., BABA, T., MICHIKAWA, Y., YAMANUBE, T., ARAI, K., OKINAGA, S., KOBAYASHI, T.** 1993. An endoplasmic reticulum protein, calreticulin, is transported into the acrosome of rat sperm. *Exp Cell Res* 205: 101-110.
- NARESHA, S., SURYAWANSHI, A., AGARWAL, M., SINGH, B.P., JOSHI, P.** 2009. Mapping the complement C1q binding site in *Haemonchus contortus* calreticulin. *Mol Biochem Parasitology* 166: 42-46.
- OLADIRAN, A., BELOSEVIC, M.** 2009. *Trypanosoma carassii* calreticulin binds host complement component C1q and inhibits classical complement pathway-mediated lysis. *Dev Comp Immunol* 34: 396-405.
- PAPATHEODOROU, V., BROSSARD, M.** 1987. C3 levels in the sera of rabbits infested and reinfested with *Ixodes ricinus* L. and in midguts of fed ticks. *Exp Appl Acarol* 3: 53-59.
- RAMÍREZ, G., VALCK, C., MOLINA, M.C., RIBEIRO, C.H., LÓPEZ, N., SÁNCHEZ, G., FERREIRA, V.P., BILLETTA, R., AGUILAR, L., MALDONADO, I., CATTÁN, P., SCHWAEBLE, W., FERREIRA, A.** 2010. *Trypanosoma cruzi* calreticulin: a novel virulence factor that binds complement C1 on the parasite surface and promotes infectivity. *Immunobiol* (In Press).
- RAMOS, R., JURI, M., RAMOS, A., HOECKER, G., LAVANDERO, S., PEÑA, P., MORELLO, A., REPETTO, Y., AGUILLÓN, J.C., FERREIRA, A.** 1991. An immunogenetically defined and immunodominant *Trypanosoma cruzi* antigen. *Am J Trop Med Hyg* 44: 314-322.
- REIS, M.M., MEIRELLES, R.M.S., SOARES, M.J.** 2003. Fine structure of the salivary glands of *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae). *Tissue Cell* 35: 393-400.
- RIBEIRO, C.H., LÓPEZ, N.C., RAMÍREZ, G.A., VALCK, C.E., MOLINA, M.C., AGUILAR, L., RODRÍGUEZ, M., MALDONADO, I., MARTÍNEZ, R., GONZÁLEZ, C., TRONCOSO, R., LAVANDERO, S., GINGRAS, A.R., SCHWAEBLE, W., FERREIRA, A.** 2009. *Trypanosoma cruzi* calreticulin: a possible role in Chagas' disease autoimmunity. *Mol Immunol* 46: 1092-1099.

- SCHOFIELD, C.J.** 1988. Biosystematics of the Triatominae. In: MW SERVICE (ed), Biosystematics of haematophagous insects, Systematics Association Special, Clarendon, Oxford 37: 284-312.
- SCHOFIELD, C.J., JANNIN, J., SALVATELLA, R.** 2006. The future of Chagas disease control. Trends Parasitol 22: 583-588.
- SOUTO-PADRÓN, T., LABRIOLA, C.A., DE SOUZA, W.** 2004. Immunocytochemical localisation of calreticulin in *Trypanosoma cruzi*. Histochem Cell Biol 122: 563-569.
- SUCHITRA, S., ANBU, K.A., RATHORE, D.K., MAHAWAR, M., SINGH, B.P., JOSHI, P.** 2008. *Haemonchus contortus* calreticulin binds to C-reactive protein of its host, a novel survival strategy of the parasite. Parasite Immunol 30: 371-374.
- THEODOS, C.M., TITUS, R.G.** 1993. Salivary gland material from the sand fly *Lutzomyia longipalpis* as an inhibitory effect on macrophage function *in vitro*. Parasite Immunol 15: 481-487.
- TOWBIN H., STAEHELIN, T., GORDON, J.** 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrilamide gels to nitrocelulose sheets: Procedure and some applications. Proc Natl Acad Sci 76: 4350-4354.
- TYLER, K.M., OLSON, C.L., 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.
- VALENZUELA, J.G., CHARLAB, R., MATHER, T.N., RIBEIRO, J.M.C.** 2000. Purification, cloning and expression of a novel salivary anticomplement protein from the tick, *Ixodes scapularis*. J Biol Chem 275: 18717-18723.
- ZER, R., YAROSLAVSKI, I., ROSEN, L., WARBURG, A.** 2001. Effect of sand fly saliva on *Leishmania* uptake by murine macrophages. Int J Parasitol 31: 810-814.