



Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas
Facultad de Medicina
Instituto de Ciencias Biomédicas
Laboratorio de Inmunología de la Agresión Microbiana
Universidad de Chile



Purificación de L-Ficolina del Sistema del Complemento Humano

Memoria para la obtención de Título de Bioquímico

Gerardo Raúl Vallejos Silva

Directores de Memoria:
Dr. Arturo Ferreira Vigouroux
Dra. Carolina Valck Calderón

Santiago, Chile
2016

Esta Memoria de Título fue realizada en el Laboratorio de Inmunología de la Agresión Microbiana, Programa Disciplinario de Inmunología, Instituto de Ciencias Biomédicas, Facultad de Medicina, Universidad de Chile, con financiamiento de CONICYT, a través del Proyecto de Investigación Asociativa ACT-112 y de FONDECYT Regular 1095095.

*A mi familia
que me apoyo incondicionalmente
todos estos años*

AGRADECIMIENTOS

Fueron muchos años de esfuerzo poder terminar esta Memoria de Título, en ellos tuve penas y alegrías, orgullos y frustraciones, todo esto me ha permitido crecer enormemente como científico. Especialmente importante fue el apoyo, conocimiento y sabiduría que me entrego mi Tutor, el Dr. Arturo Ferreira. Es la clase de personas necesarias para que las nuevas generaciones puedan mejorar este mundo. Mi otra Tutora, la Dra. Carolina Valck, fue primordial para que los experimentos salieran adelante, sin ella no estaría escribiendo esta Memoria.

En el laboratorio tuve la dicha de poder conocer personas que me han marcado para el resto de la vida, ellos fueron mis amigos en las buenas y las malas, siempre apoyando y compartiendo mi crecimiento científico. Por suerte ya no son solo colegas, ahora forman parte importante de mi vida.

En el último año Melisa se convirtió en mi pilar para poder terminar esta Memoria, no fue un buen año, por lo que el ímpetu que se necesita para finalizar algo tan importante lo obtuve de ella. Por supuesto esta mi familia, gracias a ellos puedo decir que ahora soy Bioquímico. Familia muchas gracias por su incondicional apoyo en todos los altos y bajos de mi vida.

A todas y todos, Muchas Gracias

ÍNDICE

RESUMEN.....	7
SUMMARY.....	8
INTRODUCCIÓN.....	9
Sistema del Complemento.....	9
Vía Clásica.....	10
Vía Alterna.....	11
Vía de las Lectinas.....	12
Ficolinas.....	15
HIPÓTESIS DE TRABAJO.....	18
OBJETIVO GENERAL.....	18
OBJETIVOS ESPECIFICOS.....	18
MATERIALES Y MÉTODOS.....	19
Producción y purificación de L-Ficolina humana recombinante.....	19
Cultivo Celular.....	19
Cromatografía.....	20
Cuantificación de L-Ficolina recombinante.....	21
Bradford.....	21
SDS-PAGE.....	22
Validación antigénica del producto purificado.....	22
<i>Dot Blot</i>	22
<i>Western Blot</i>	23
RESULTADOS.....	24
Purificación de L-Ficolina.....	24
Obtención de L-Ficolina.....	24
Cuantificación de L-Ficolina.....	26
Validación antigénica de L-Ficolina purificada.....	29
<i>Dot Blot</i>	29
<i>Western Blot</i>	30
CONCLUSIÓN.....	32
DISCUSIÓN.....	33
REFERENCIAS.....	36

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Activación del Sistema del Complemento.....	15
Figura 2. Esquema de L-Ficolina.....	16
Figura 3. Presencia de proteína posterior a cromatografía de afinidad.....	25
Figura 4. Cuantificación de L-Ficolina.....	27
Figura 5. Estimación de la concentración de L-Ficolina purificada, en SDS-PAGE...	28
Figura 6. <i>Dot Blot</i> para detectar L-Ficolina.....	29
Figura 7. <i>Western Blot</i> de L-Ficolina.....	30

INDICE DE ABREVIATURAS

PRM (Moléculas Reconocedoras de Patrones).....	10
PAMP (Patrones Moleculares Asociados a Patógenos).....	10
DAMP (Patrones Moleculares Asociados a Daño).....	10
MAC (Complejo de Ataque a Membrana).....	10
CRP (Proteína C Reactiva).....	11
MBL (<i>Mannose-Binding Lectin</i>).....	12
3MC (Malpuech-Michels-Mingarelli-Carnevale).....	14
TcCRT (Calreticulina de <i>Trypanosoma cruzi</i>).....	15
LTA (Ácido Lipoteicoico).....	16
CHO (<i>Células de Ovario de Hámster Chino</i>).....	19
SFB (Suero Fetal Bovino).....	19
P/S (Penicilina/estreptomicina).....	19
BSA (Albumina Sérica Bovina).....	21
WB (<i>Western Blot</i>).....	23

RESUMEN

En esta Memoria de Título se purificó L-Ficolina humana. A nivel nacional, no hay esfuerzos reportados en este sentido. Esta purificación se realiza en el contexto de los intereses de una de las líneas centrales de investigación del Laboratorio de Inmunología de la Agresión Microbiana (ICBM, Facultad de Medicina, Universidad de Chile), relacionada con el rol del Sistema del Complemento humano en la infectividad de *Trypanosoma cruzi*, agente protozario de la enfermedad de Chagas. Aunque con un rendimiento moderado, se logró la purificación de L-Ficolina recombinante, a través de cromatografía. Se sienta así la estandarización del protocolo en las condiciones locales, el que deberá ser escalado para cubrir las necesidades de futuros experimentos de infectividad parasitaria, a realizarse ya fuera del contexto de esta Memoria.

SUMMARY

L-Ficolin purification of human complement system

In this dissertation, we describe the purification of human Complement L-Ficolin. At the national level, there are no reported efforts in this regard. This purification was performed within the context of the interests of one of the central lines of research in our laboratory, related to the role of the Complement System in *Trypanosome cruzi* (the agent of Chagas disease) infectivity. Although with a modest yield, chromatographic purification of L-Ficolin was achieved. Thus, we established the experimental basic conditions for the purification of this rather elusive molecule. Outside the context of this dissertation, this procedure, adequately scaled, may meet the needs of future experiments on parasite infectivity, mediated by this molecule.

INTRODUCCIÓN

L-Ficolina, descubierta durante los últimos años, análoga a C1q y MBL del Sistema del Complemento, ha sido tradicionalmente difícil de purificar^{1,2,3}, debido entre otros factores, a su baja concentración sérica (3,0 µg/mL). Dado que C1q participa en la infectividad de *Trypanosoma cruzi*^{4,5,6,7,8,9,10}, creemos que esa función es compartida con Ficolinas. Por ello, en esta Memoria de Título se intentó purificar L-Ficolina humana. A nivel Nacional y Regional, no hay esfuerzos reportados en este sentido.

Se purificó L-Ficolina humana recombinante, a partir de células eucarióticas. Esta Memoria de Título representa entonces un ejercicio académico de exposición al método científico, a través de un enfoque experimental de purificación de una proteína, de descubrimiento relativamente reciente^{11,12}, de importancia aún emergente en el Sistema del Complemento.

Sistema de Complemento

El Sistema del Complemento es una de las primeras líneas de defensa que poseen muchos organismos, incluido el humano, frente a injurias externas o internas¹³, estando presente en una gran diversidad de organismos multicelulares¹³. En los últimos años, numerosas investigaciones han dado cuenta de que este Sistema orchestra una respuesta inflamatoria e inmunológica más allá de solo ser una barrera innata. También se le han asignado a las proteínas que

conforman este Sistema, diversas otras propiedades, fuera del contexto inmunológico¹⁴.

El Sistema está formado por alrededor de 40 proteínas¹⁵ que se van activando principalmente por proteólisis en cascada. Actualmente se considera como una red que genera numerosas respuestas interconectadas entre sí para favorecer una rápida acción de defensa¹⁴. Se divide en tres ramas que se diferencian principalmente en las moléculas reconocedoras de patrones (**PRMs**)¹⁶, que identifican los patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs) y los patrones moleculares asociados a daño (DAMPs)^{17,18}. Estas tres vías confluyen en el denominado complejo de ataque a membrana (**MAC**), el cual forma poros en los patógenos provocando su muerte por lisis¹⁵. Sin embargo, muchos organismos han desarrollado mecanismos de defensa contra la formación de este complejo, por lo que la lisis no ocurre¹⁴. A pesar de esto, no solo el MAC es importante para la eliminación de patógenos, ya que también moléculas intermedias que se generan en las proteólisis median una potente respuesta inmunológica. Estas moléculas son las anafilotoxinas, las cuales median las respuestas inflamatorias, y opsoninas que facilitan el reconocimiento y activación del sistema inmune¹⁹.

Vía Clásica

La vía o ruta Clásica del Complemento utiliza un PRM conocido como C1, que reconoce principalmente anticuerpos, por ello es que es una señalización posterior a una activación de la defensa inmune adaptativa, aunque también

puede reconocer proteínas que se acoplen a la membrana del microorganismo agresor, en ausencia de anticuerpos, como la proteína C reactiva (CRP)¹⁵. Los anticuerpos que reconoce C1 son dos IgG acercadas por el antígeno a una distancia crítica de 30-40 nm, o una IgM que, unida al antígeno, expone dominios Fc que unen las porciones globulares de C1. Se generan así señales de peligro sobre la superficie del microorganismo agresor²⁰. C1 está formado por C1q que reconoce la señal de peligro, y por C1r y C1s, serinoproteasas que al ser activadas secuencialmente, median la proteólisis / activación de C2 y C4^{21,22}. En esta proteólisis se generan los fragmentos C2b y C4b que, unidos a la membrana donde se detectó la señal de peligro, forman un complejo dimérico conocido como C3 convertasa (C4b,2b). C4b debe estar unido covalentemente a la membrana del microorganismo para que la C3 convertasa sea activada²³. Esta C3 convertasa a su vez proteolisa a C3 lo que genera un complejo heterotrimérico, llamado C5 convertasa (C4b, 2b, 3b). La C5 convertasa proteolisa a C5, cuya subunidad b se une a la membrana del patógeno, favoreciendo la unión de C6, C7, C8 y C9, generando finalmente el MAC²⁴.

Vía Alternativa

Esta ruta que funciona por defecto en el organismo, se encuentra activa constantemente por lo que es necesario inactivarla para que no ataque membranas propias²⁵. Una fracción pequeña de C3 del plasma se activa constante y espontáneamente, lo que genera moléculas similares a C3b (C3b(H₂O) o C3-agua), con su cadena α intacta, el que une Factor B, que a su vez es activado por

la serinoproteasa D. Se genera así una C3 convertasa de fase fluida, única convertasa del Complemento que actúa independientemente de membranas. C3-*agua* actúa sobre el abundante C3 del plasma generando C3b (ahora sin su anafilotoxina C3a), el que se deposita covalentemente sobre cualquier membrana vecina, propia o de patógenos, que desplieguen grupos aceptores, como grupos aminos y carboxilo. En el caso de las membranas propias, la subsiguiente activación del sistema es impedida por la presencia de ácido siálico, lo que permite la degradación de C3b, mediada por el factor I y su cofactor H, ambos presentes en el plasma. En las membranas de patógenos, sin ácido siálico, el C3b une al factor B, el cual es activado por la serinoproteasa D, generándose así la C3 convertasa de la vía alterna (C3bBb)^{26,27}. La adición a esta convertasa de moléculas extra de C3b, genera la C5 convertasa alterna (C3b)_nBb, la que activa a C5. La vía terminal es común a todas las rutas de activación.

Vía de las Lectinas

La ruta de las Lectinas es muy parecida a la vía Clásica pero, filogenéticamente más antigua²⁸. Esta ruta se activa por reconocimiento de señales de peligro distintas a las que operan en las rutas Clásica y Alterna. En esta vía cambian los patrones de reconocimiento los que se activan directamente por moléculas presentes en las membranas de los microbios. Estos PRM son: MBL (*Mannose-Binding Lectin*) y Ficolinas²⁹. MBL reconoce principalmente manosa y azúcares relacionados. Ficolinas, con una estructura similar a MBL, reconoce estructuras derivadas de Ácido Lipoteicoico³⁰. MBL y Ficolinas también

están asociadas a serinoproteasas conocidas como MASP-1 y MASP-2³¹. Como sus contrapartes de la vía clásica, C1r y C1s, MASP-1 y MASP-2 también participan en la generación de C2b y C4b, promoviendo las cascadas proteolíticas subsiguientes³².

MBL y Ficolinas también forman complejos con MASP-3 y dos proteínas no enzimáticas llamadas sMAP (MAp19) y MAP-1 (MAp44)³³. MASP-1, MASP-3 y MAP-1 son todos variantes por *splicing* del gen *MASP1*, mientras que MASP-2 y sMAP son variantes por *splicing* del gen *MASP2*. MASP-2 hidroliza a C4 y C2, generando C4b,2b³⁴. Por otra parte, MASP-1 hidroliza C2 pero no a C4, aumentando así la activación del Complemento mediada por el complejo MBL/Ficolina-MASP-2, aunque no puede inducir la formación de C3 convertasa por sí misma³⁵. Alrededor del 75% de todo el C2 que se activa mediante la ruta de las Lectinas está dado por MASP-1, por lo que esta proteína es crucial para una activación eficiente de la vía³¹. MASP-3 se ha visto involucrado, junto a MASP-1, en la activación de la vía Alternativa del Sistema del Complemento, por lo menos en roedores³⁶. A sMAP no se le conocen funciones. Resultados *in vitro*, muestran que MAP-1(MAp44) es un potente regulador de la vía de las Lectinas^{37,38}.

Otra proteína que funciona como PRM en esta vía es colectina-11³⁹, descubierta recientemente, la cual es detectada en el plasma (0,3 µg/mL)⁴⁰. Se ha demostrado que colectina-11 se une a un amplio espectro microbiano, de manera calcio-dependiente, con una particular especificidad por carbohidratos como L-fucosa y D-manosa^{41,42}. Colectina-11 también se ha encontrado asociada a MASPs⁴³. Mutaciones en los genes que codifican colectina-11 (*COLEC11*) y el de

MASP-3 (*MASP1*) causan un síndrome de desarrollo en humanos llamado 3MC (Malpuech-Michels-Mingarelli-Carnevale)⁴⁴. Estas evidencias sugieren un rol importante de colectina-11 y MASP-3 no solo en la defensa inmune innata, sino también en el proceso de desarrollo embrionario.

Cada paso en el Sistema del Complemento está rigurosamente regulado por el organismo, ya que es fundamental mantener el control de dónde y cuándo se activan estas señales, regulación que, entre otras moléculas, es ejercida por C4BP, Factor I, Factor H y DAF²⁴. Aunque este control es estricto, existen diferentes patologías asociadas a la deficiencia de algunas de estas moléculas, tal es el caso del mal funcionamiento del Factor H, el cual es crítico para que C3 unido a membranas propias, sea prontamente inactivado por el factor I²⁴.

Las principales etapas de la vía de activación, mencionadas anteriormente, se sintetizan en la Figura 1.

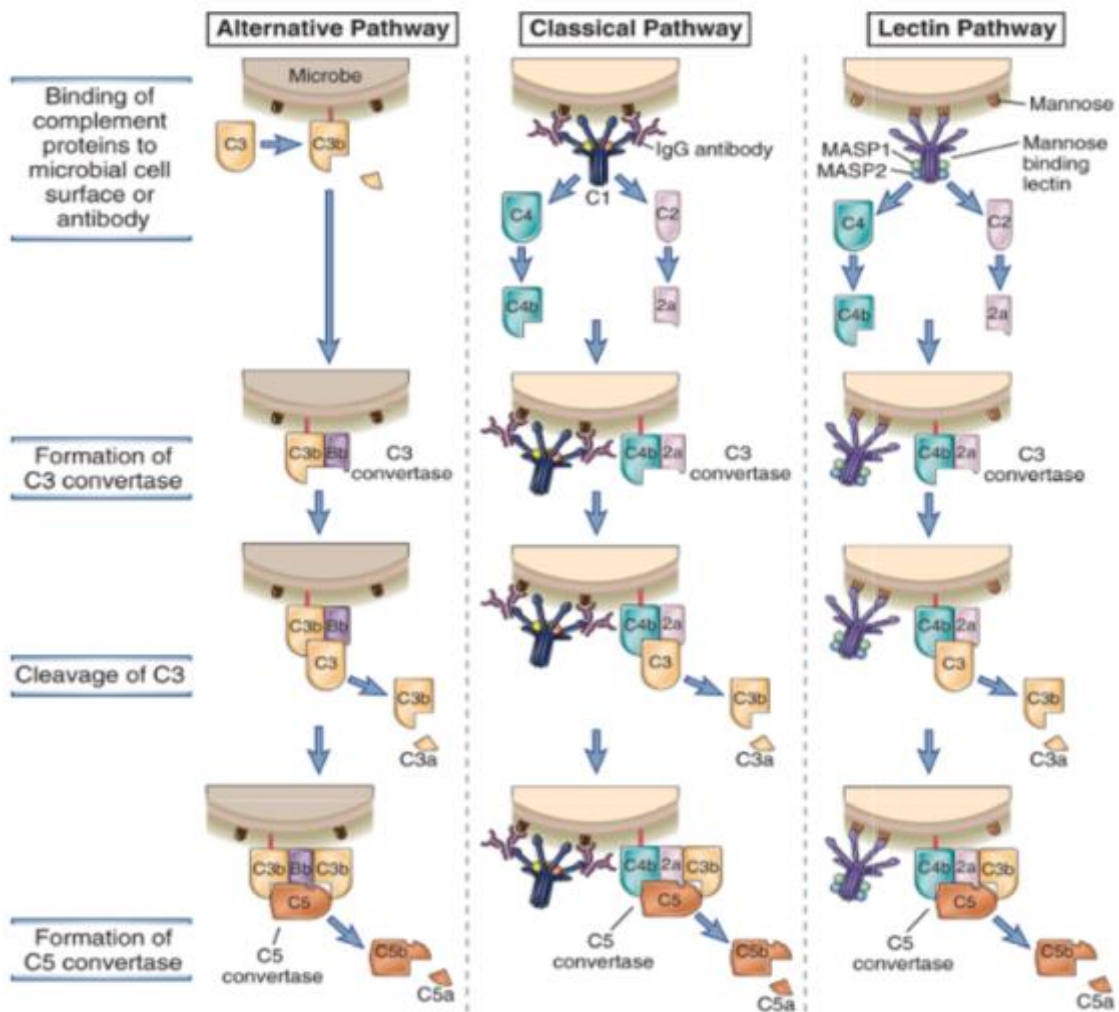


Figura 1. Activación del Sistema del Complemento. Inicio de las tres vías del Sistema del Complemento, hasta la formación de la C5 convertasa (Tomado de Abbas *et al*, 2012, Cellular and Molecular Immunology, 7ma edición, 277).

Ficolinas

Existen 3 tipos de Ficolinas en humanos; L, M, y H⁴⁵. H-Ficolina no interactúa con Calreticulina de *T. cruzi* (TcCRT), a diferencia de L-Ficolina la que, al interactuar con TcCRT, se inactiva, con consecuencias similares al efecto de TcCRT en la vía Clásica del Complemento⁴⁶. L-Ficolina, o Ficolina-2 es una

proteína homopolimérica formada por 12 subunidades de 35 kDa cada una, las que a su vez forman un tetrámero, de tres unidades cada uno, todo esto codificado en un solo gen (*FCN2*) (Figura 2) ubicado en el cromosoma 9q34^{2,47}. Ha sido identificada en muchos vertebrados y en algunos invertebrados⁴⁸. Es producida principalmente en el hígado y se puede encontrar en el suero, en cantidades que varían entre cada individuo, encontrándose estas diferencias en un polimorfismo del promotor del gen *FCN2*⁴⁷. Esta molécula posee una porción colagenosa y otra globular, al igual que C1q, pero que difiere de éste en que no necesita de un anticuerpo para unirse al organismo extraño. Además, la estructura molecular de esta proteína es muy similar a la de C1q, en su estructura secundaria, terciaria y ultraestructura⁴⁹. Esto otorga una base racional para proponer que la interacción de L-Ficolina con TcCRT debiera favorecer la infectividad parasitaria.

Las Ficolinas se unen a carbohidratos presentes en una gran variedad de bacterias Gram negativas y Gram positivas, entre estos azúcares tenemos; N-acetilglucosamina, N-acetilcisteína y Ácido Lipoteicoico (LTA)^{30,50,51}.

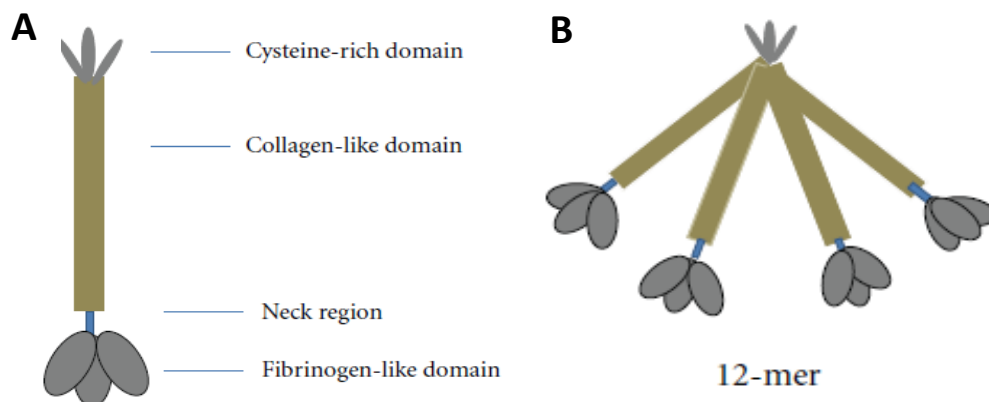


Figura 2. Esquema de L-Ficolina. A. Se señalan dominios de una subunidad. B. Esquema de las 12 subunidades agrupadas formando la proteína completa. (Kilpatrick y Chalmers, 2012, Journal of Biomedicine and Biotechnology, 1-10).

El estudio de estas proteínas es emergente. Lo más común es el análisis de correlaciones entre casos patológicos y variaciones en los niveles plasmáticos de la proteína⁵². Esto puede deberse, entre otras explicaciones, a que no existen Ficolinas nativas ni recombinantes comercialmente disponibles. *Por ello, en esta Memoria de Título se intenta purificar L-Ficolina recombinante, a partir de células eucarióticas, para explorar su potencial importancia en la infectividad de T. cruzi.*

En síntesis, dada la similitud estructural y funcional entre las Ficolinas y C1q, y la relevancia de éste en la infectividad parasitaria, nos planteamos purificar L-Ficolina, para su uso posterior en ensayos de infectividad. Por lo tanto, la Hipótesis y Objetivos a proponer serán de naturaleza exclusivamente metodológica.

HIPÓTESIS DE TRABAJO

L-Ficolina humana es purificable a través de ensayos cromatográficos.

OBJETIVO GENERAL

Contribuir a la estandarización de un protocolo de purificación de L-Ficolina, de utilidad local.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Purificar L-Ficolina humana recombinante.
2. Validar antigénicamente el producto purificado.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Producción y purificación de L-Ficolina humana recombinante

1.1. Cultivo celular.

Para la obtención de L-Ficolina se utilizaron células de Ovario de Hámster Chino (**CHO**), a las cuales se le agregaron dos plasmidios, (pSV₂neo y pEDdC-FCN2), el primero confiriendo resistencia a G418. Como segunda selección las CHO tienen eliminado el gen *DHFR* el que se incluye en el plasmidio pEDdC². El gen de L-Ficolina, FCN2, fue introducido en el plasmidio pEDdC a través de sitios de restricción Xba1 en el extremo 5' y EcoR1 en el 3', por lo que el gen es unidireccional. Se obtuvo este gen por PCR, obteniendo el cDNA del hígado². Estas células fueron donadas por la Dra. Nicole Thielens del *Institute for Structural Biology*, Francia. Las CHO son producidas en medio de cultivo DMEM-F12 con 10% de suero fetal bovino (**SFB**) descomplementado, 1% de penicilina/estreptomicina (**P/S**), ácido ascórbico (50 µg/mL) y antibiótico G418 (50 mg/mL), ajustando el pH a 7.2.

A partir de 4 frascos de cultivo de 150 cm² confluentes al 100% (alrededor de 1,5 x 10⁷ células por placa) se prepararon 24 frascos de 175 cm² conteniendo 35 mL de medio de cultivo cada uno. Luego de seis días de cultivo (sin cambiar medio) se recuperaron alrededor de 700 mL de sobrenadante de 20 frascos. Los 4 restantes sirvieron para cambiar de pasaje y repetir el proceso, hasta un máximo

de 2 pasajes. Cada sobrenadante obtenido se centrifugó a 4600 g por 10 min a 4°C y se almacenó a -20°C.

1.2. Cromatografía

El sistema cromatográfico usado se basa en la afinidad preferencial de L-Ficolina por N-acetilcisteína. La columna de purificación se preparó manualmente, siguiendo un protocolo gentilmente proporcionado por la Dra. Thielens. 50 mL de Sefarosa 4B-CL se colocaron en 50 mL de agua, lavando con 100 mL de agua por tres veces, a través de un embudo con filtro de vidrio sinterizado. Luego se lavó el gel con Na₂CO₃ (0,5 M, pH 11) en este mismo embudo, tres veces. El gel seco (previamente hidratado) se colocó con 50 mL de Na₂CO₃ (0,5 M, pH 11) en un matraz de vidrio y se agregó 10 mL de divinil sulfona. Esta mezcla se incubó por 90 min a temperatura ambiente para luego lavar tres veces en el embudo con filtro con 100 mL de Na₂CO₃ (0,25 M, pH 11), con lo cual se consiguió la activación de la Sefarosa 4B-CL. Posteriormente, se colocaron 50 mL de Na₂CO₃ (0,25 M, pH 11, ajustándolo con tabletas de NaOH) y se añadió 10 g de N-acetilcisteína. Esto se mezcló con la Sefarosa 4B-CL y se dejó a temperatura ambiente por toda la noche. Al día siguiente se lavó con 50 mL de agua por tres veces en el embudo, se agregó 50 mL de etanolamina (pH 9) y se incubó por dos horas a temperatura ambiente en agitación. Finalmente, se realizaron una serie de lavados con 500 mL de 20 mM Tris, 1M NaCl, 10 mM EDTA, pH 7,4, por tres veces y 500 mL de 20 mM Tris, 145 mM NaCl, 5 mM CaCl₂, pH 7,4 por tres veces, todo esto en el

embudo sinterizado. Esta Sefarosa se empaquetó en una columna de purificación, conteniendo el último buffer para mantenerla húmeda.

La columna de Sefarosa 4B-CL, previamente tratada como se describe anteriormente, se la colocó en una bomba de gradiente (*econo gradient pump*, Bio-Rad). Primero se pasaron 700 mL de sobrenadante del cultivo de células CHO, que había sido previamente filtrado (poro de 0,2 μm), por la columna a una velocidad de 0,5 mL por minuto (usada en los siguientes pasos). Luego se lavó la columna con 10 volúmenes de 20 mM Tris, 145 mM NaCl, 5 mM CaCl_2 , pH 7.4. Para eluir la proteína de la columna se pasó el mismo buffer de lavado pero con N-acetilglucosamina 0,3 M y se recolectaron las fracciones cada 1 mL (*2110 fraction collector*, Bio-Rad). Se midió la absorbancia de los eluidos a 280 nm. Los eluidos elegidos se dializaron en 2 L de buffer de lavado por tres días. Finalmente se centrifugó la muestra a 3000 g por 5 min a 4°C y se almacenó a -20°C y luego a -80°C.

1.3. Cuantificación de L-Ficolina recombinante

1.3.1. Bradford

Se utilizó el método de Bradford⁵³ para la cuantificación de L-Ficolinas obtenidas en la purificación. Se construyó una curva estándar en base a PBS/albumina bovina sérica (**BSA**) en triplicado y se procedió a medir a 595 nm en cubeta de plástico.

1.3.2. SDS-PAGE

Se realizó SDS-PAGE para comparar cantidades conocidas de BSA, con la proteína obtenida en el eluido. Brevemente, se realizó un gel de poliacrilamida al 10% y el gel de *stacking* al 15%. Se resolvió con buffer de corrida (SDS 0,5% v/v, Tris-Glicina 10% v/v) a 80 volt. Se agregaron 7, 5, 3 y 1 µg de BSA en cada pocillo, además de volúmenes decrecientes de eluido, en distintos pocillos (30, 21, 13 y 4,5 µL).

2. Validación antigénica del producto purificado

2.1. Dot Blot

En una membrana de nitrocelulosa se colocó el eluido dializado y concentrado (6 µL, 0,5 µg por *dot*). Usando como control positivo L-Ficolina nativa (2 µL, 0,07 µg por *dot*), obtenida de suero humano y donada por el Dr. Teizo Fujita, *Fukushima Prefectural General Hygiene Institute*, Japón. En ellos se analizó la presencia de L-Ficolina con anticuerpo policlonal (1:1000) de ratón. Luego se utilizó un anticuerpo secundario conjugado a fosfatasa alcalina, el cual fue revelado por NBT/BCIP.

2.2. Western Blot (WB)

Se siguió el protocolo para la técnica WB, como indica Towbin *et al*⁶⁴. Brevemente, el gel de poliacrilamida de corrida fue al 10% y el *stacking* al 15%, resolviendo el gel a 100 volt. Luego de transferir se utilizó el anticuerpo monoclonal para L-Ficolina (1:1000) y el anticuerpo secundario (1:1000) conjugado a fosfatasa alcalina. Su revelado fue por NBT/BCIP.

RESULTADOS

1. Purificación de L-Ficolina

1.1. Obtención de L-Ficolina

Se obtuvieron 2 sobrenadantes, pertenecientes a 2 pasajes distintos de células CHO y se consiguieron 700 mL en cada uno. En estos sobrenadantes se encontraba la proteína recombinante. Estos fueron filtrados y centrifugados para luego ser pasados por la columna de Sefarosa 4B-CI unida a N-acetilcisteína. En la primera purificación por columna se obtuvieron eluidos que arrojaron una absorbancia negativa, la cual pasa a ser positiva en el tubo 22, pero con niveles muy bajos de absorbancia (Figura 3A).

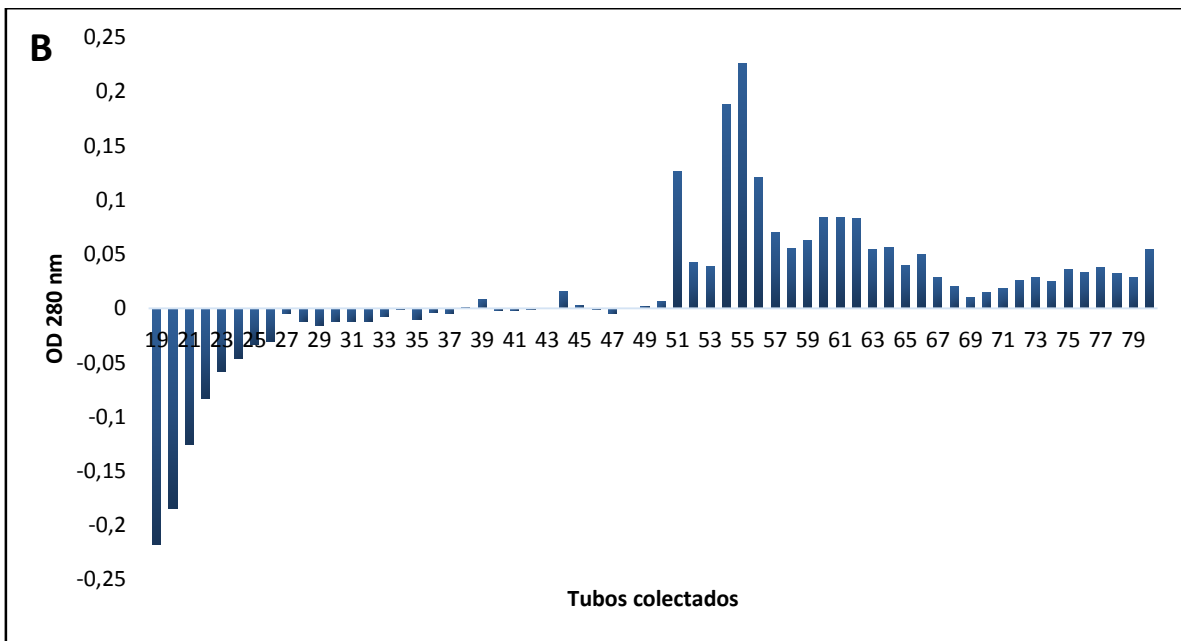
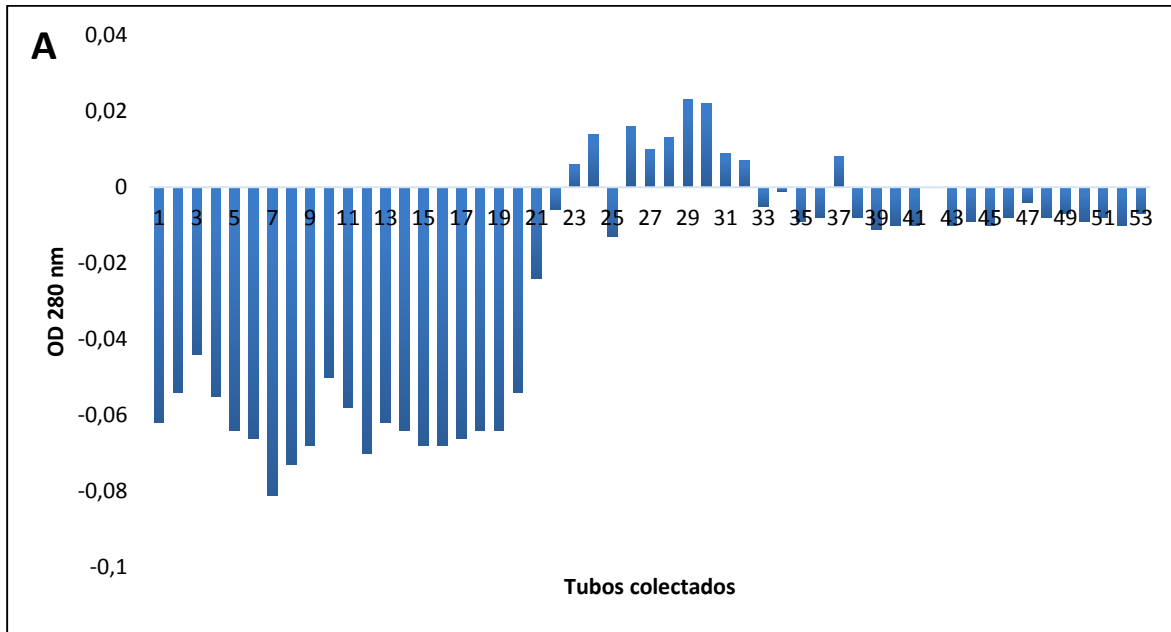


Figura 3. Presencia de proteína posterior a cromatografía de afinidad. A. Primer sobrenadante. **B.** Segundo sobrenadante. Los tubos positivos se combinaron para diálisis y medición de concentración proteica.

En el segundo sobrenadante se observó que los eluidos en que se encontraba la proteína, aparecía mucho después comparado al anterior (Figura 3B). Además, el rango es más amplio y se produce una actividad mayor, teniendo como máximo 0.226 de absorbancia. En este caso se sacaron los primeros tubos colectados ya que presentaban una absorbancia de -1, lo que nos da cuenta de la diferencia entre buffers empleados, ya que al principio pasa el buffer de lavado sin presencia de N-acetilglucosamina, el cual se ocupa como blanco para las pruebas de absorbancia.

1.2. Cuantificación de L-Ficolina

Los tubos colectados con absorbancia positiva, se dializaron y concentraron. (En el caso del segundo sobrenadante, el colector automático permite una recolección de máximo 80 tubos). Luego de alcanzado este número, se decidió no continuar la recolección de eluido ya que las absorbancias presentadas eran marginales y se privilegió el no diluir aún más la muestra.

En el concentrado final, mediante Bradford (Figura 4A), se detectó 0,10 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ de proteína. Para validar este resultado, se realizó un segundo Bradford, con mayor volumen de eluido (Figura 4B), obteniendo 0,085 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$. Todo esto mezclando los sobrenadantes del primer y segundo pasaje de células CHO. En total se obtuvieron 1,6 mL de concentrado de proteína, equivalente a 148 μg totales. De este volumen se ocuparon 400 μL en los ensayos de cuantificación y

validación antigénica, quedando entonces 111 µg totales, si se promedia lo medido entre los dos Bradford realizados.

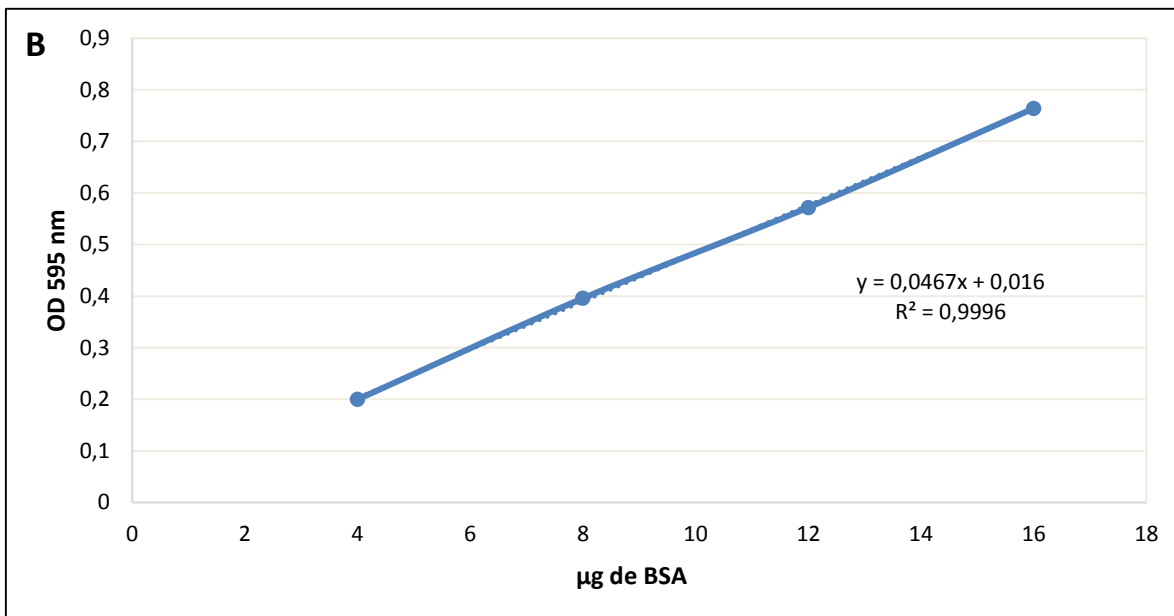
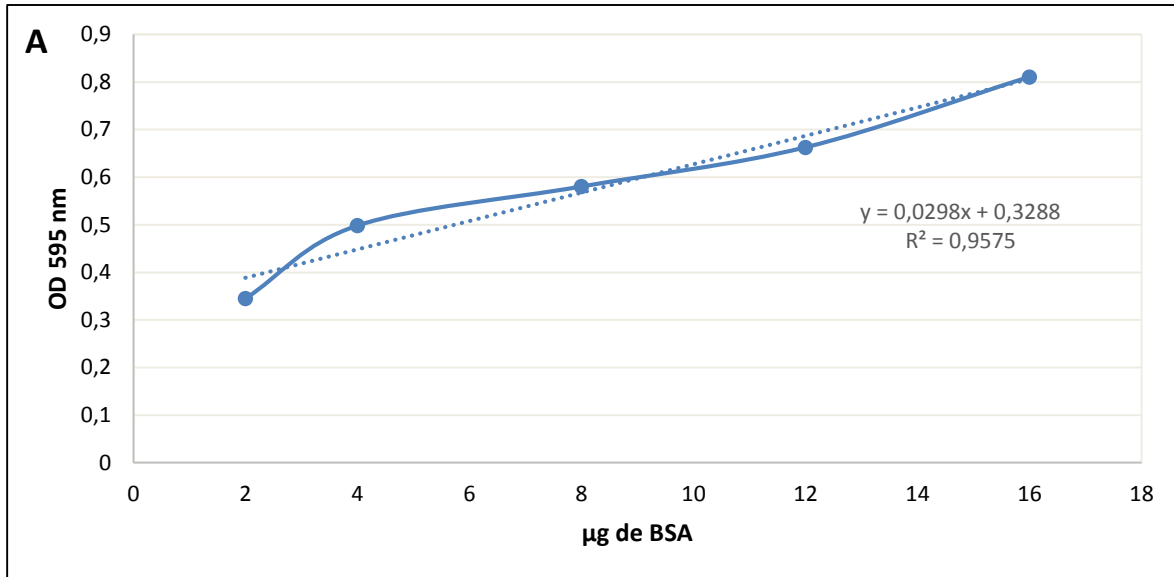


Figura 4. Cuantificación de L-Ficolina. A. Bradford 1. B. Bradford 2. Concentración de L-Ficolina obtenida en la purificación y mezcla del 1^{er} y 2^{do} sobrenadante de células CHO. A. 0.10 µg/µL. B. 0.085 µg/µL.

Luego se realizó un SDS-PAGE, en el cual se comparó cantidades conocidas de BSA con volúmenes decrecientes de eluido (Figura 5). Este acercamiento experimental no solo nos permitió calcular indirectamente la cantidad de proteína, si no también conocer el peso relativo de la proteína purificada. La banda de la muestra se sitúa alrededor de los 37 kDa, lo cual es concordante con el peso de L-Ficolina recombinante. Los carriles 9 y 10 tienen la menor cantidad de proteína (1 μg de BSA y 4,5 μL de muestra), razón por la cual es casi imperceptible la banda en ambos casos. La banda del carril 2 contiene 30 μL de muestra lo que, comparado con BSA, nos arroja una concentración compatible con la determinada mediante Bradford.

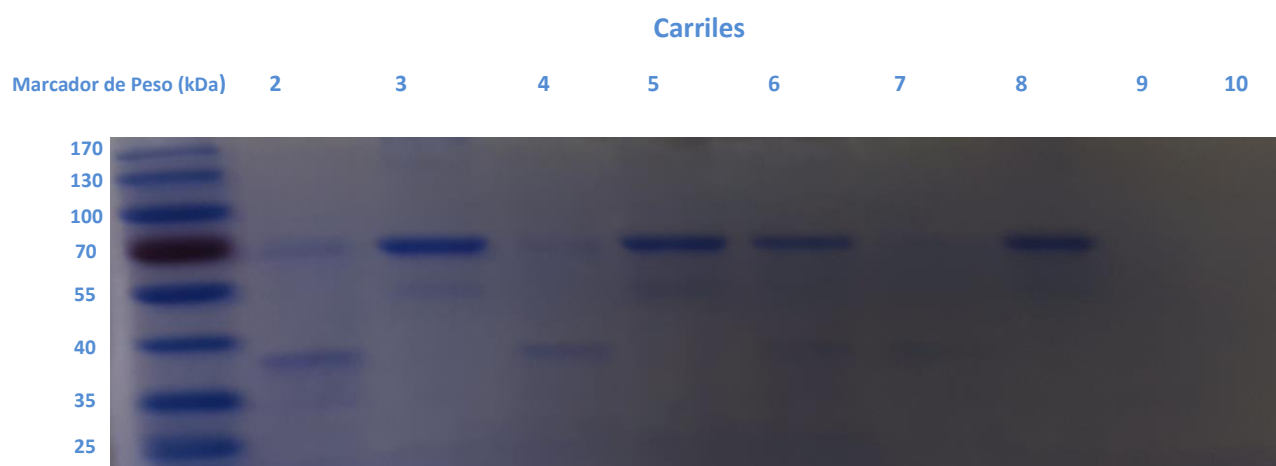


Figura 5. Estimación de la concentración de L-Ficolina purificada, en SDS-PAGE comparativo con BSA. Carriles 2, 4, 6, 7 y 9 contienen eluido concentrado (30, 21, 13, 13, 4,5 μL). Carriles 3, 5, 6, 8 y 10 contienen BSA (7, 5, 3, 3 y 1 μg).

2. Validación antigénica de L-Ficolina purificada

2.1. *Dot Blot*

Se utilizó L-Ficolina nativa como control positivo y se agregó el eluido concentrado en duplicado. El control negativo es el buffer de elusión más BSA. El anticuerpo utilizado es un policlonal anti L-Ficolina que fue donado por el Dr. Fujita. La siguiente imagen muestra un *Dot Blot* representativo de los experimentos realizados (Figura 6).

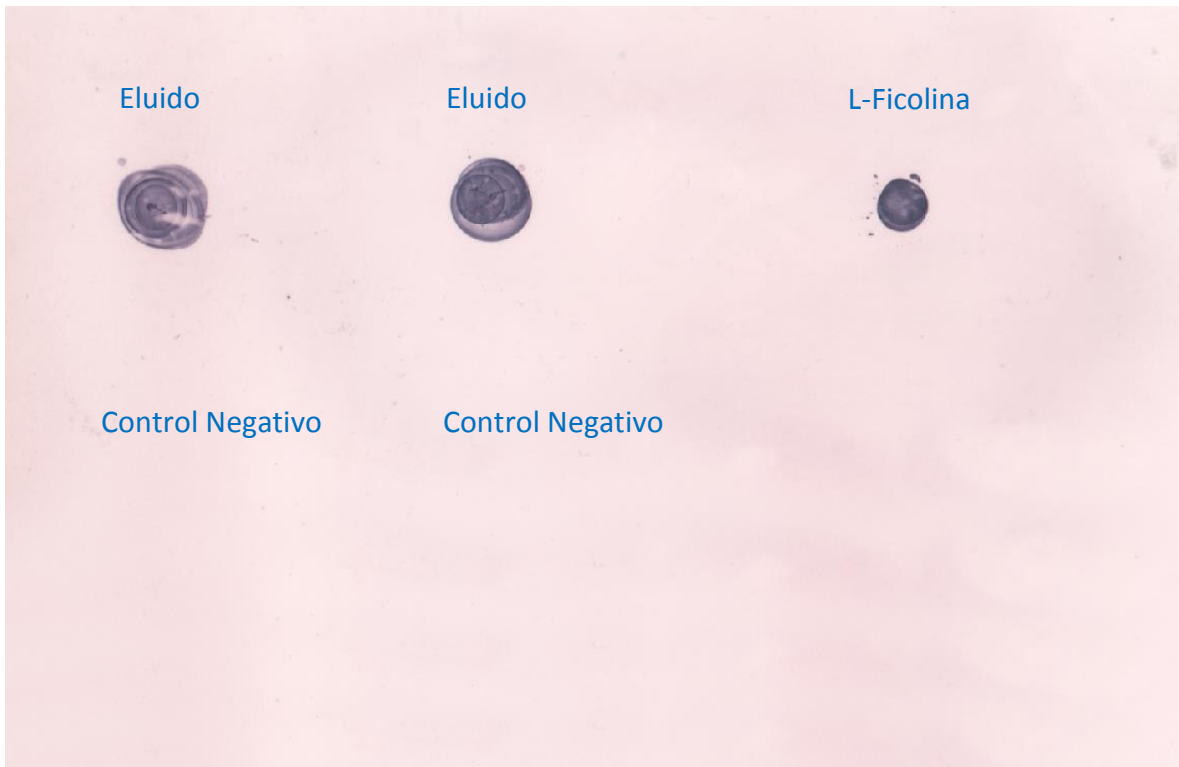


Figura 6. *Dot Blot* para detectar L-Ficolina. 6 μ L (0,5 μ g) de eluido purificado (derecha y centro superior) y 2 μ L (0,07 μ g) de L-Ficolina pura (izquierda superior). Controles negativos (izquierda y centro inferior).

2.2. Western Blot

Lo anterior nos da un acercamiento a lo que se encuentra en este purificado, aunque para determinar de una manera más precisa fue necesario realizar un WB, para medir por método inmunológico y peso relativo de la proteína purificada (Figura 7). Para los WBs, se utilizó el anticuerpo monoclonal anti L-Ficolina (Abcam, UK), de origen murino.

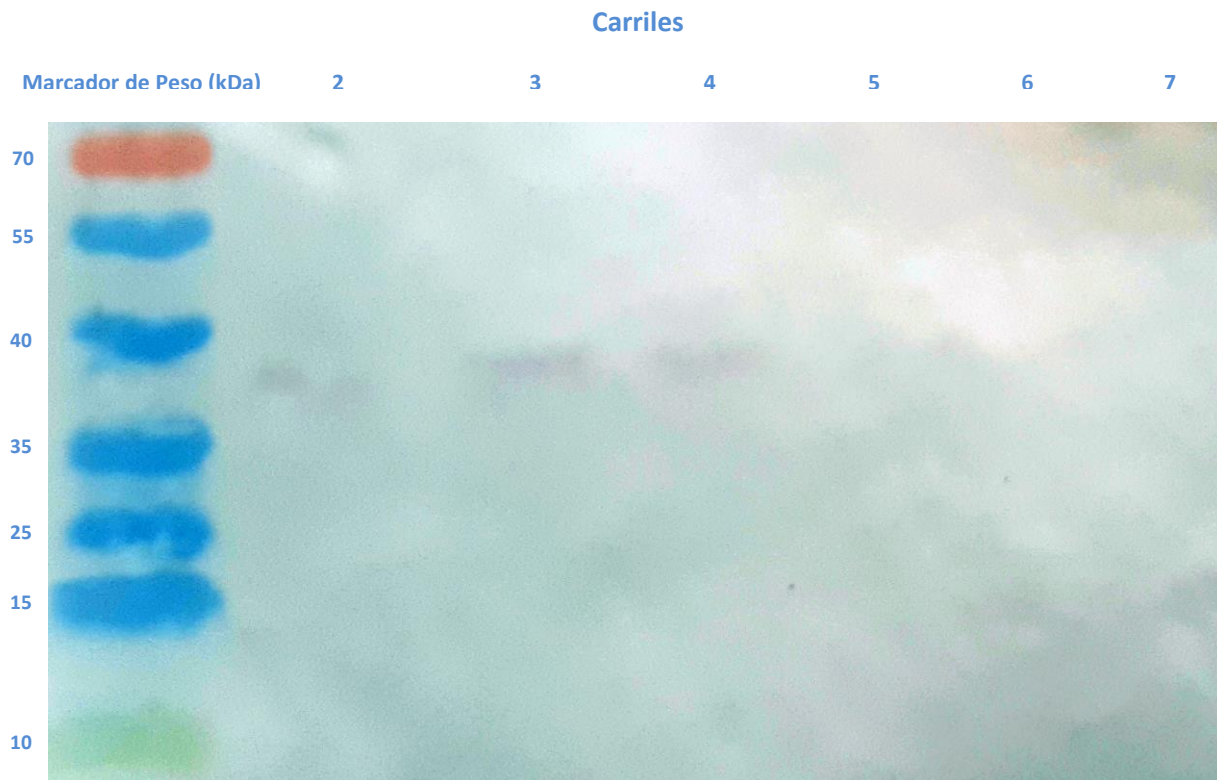


Figura 7. Western Blot de L-Ficolina. 30 μ L (carriles 2, 3 y 4) y 15 μ L (carriles 5, 6 y 7) de eluido purificado. Analizado con anticuerpo monoclonal anti L-Ficolina 1:1000.

En este WB denaturante representativo, se aprecia alrededor de los 37 kDa, una marca que correspondería a la subunidad que conforma el homopolímero que constituye L-Ficolina. En los primeros tres carriles la marca es relativamente notoria, siendo la cantidad de proteína compatible con aquella determinada cuantitativamente mediante Bradford. En los carriles 5, 6 y 7 es casi imperceptible el marcaje. Con este acercamiento experimental es posible proponer la presencia de L-Ficolina en las muestras purificadas.

CONCLUSIÓN

A pesar del rendimiento moderado de la purificación de L-Ficolina (148 μ g aproximados de proteína total), fue posible en esta Memoria de Título estandarizar la técnica en nuestro laboratorio y obtener L-Ficolina recombinante.

La técnica de Bradford, para la cuantificación de la proteína, es suficientemente sensible y reproducible, por lo que no es necesario utilizar otra técnica, como sería con BCA.

El uso de *Dot Blot*, nos permitió un acercamiento en la identificación de la proteína. Aunque es necesario utilizar un método más exacto como el WB, el cual nos arrojó que efectivamente la proteína purificada es L-Ficolina.

DISCUSIÓN

En ensayos previos realizados en el LIAM, se demuestra que existe una interacción directa entre L-Ficolina y TcCRT, al igual que ocurre con C1q⁵, e incluso sus consecuencias son similares, ya que inhibe la vía de las Lectinas del Sistema del Complemento⁴⁶. Una perspectiva importante es verificar si L-Ficolina participa en el proceso infeccioso parasitario. Por ello, en esta Memoria de Título se ha propuesto purificar L-Ficolina, a partir de células mamíferas, para su uso posterior, ya fuera del contexto de Memoria, en ensayos de infección *in vitro*. Este proceso, de rendimiento moderado (decenas de microgramos), se realizó sin necesidad de un inductor de expresión, siendo la proteína liberada al sobrenadante del medio de cultivo.

La recolección de sobrenadantes a partir de cultivos de células CHO recombinantes, requirió de filtración, proceso dificultado por agregación proteica, lo que pudo implicar pérdida no dimensionada de L-Ficolina recombinante. Esto explicaría, al menos parcialmente, el moderado rendimiento obtenido.

Experiencias previas indican que la cantidad de L-Ficolina obtenida en los sobrenadantes es mayor en el 2^{do} pasaje de las células CHO. Esto es compatible con los resultados presentados en la Figura 3.

Los Bradford realizados para la cuantificación de proteínas nos arroja dos posibles cantidades de L-Ficolina recombinante obtenida (160 ó 136 µg) (Figura 4). Además de esto, el resultado del SDS-PAGE (Figura 5), es compatible con

aquellos medidos por Bradford, siendo más confiable el segundo realizado ($R^2=0.9996$).

Como se puede observar, la cantidad de L-Ficolina obtenida en estas primeras purificaciones es baja, comparada con otros procesos de purificación proteica realizados en el laboratorio, como por ejemplo el de TcCRT⁵⁵.

En la primera parte de las confirmaciones de obtención de L-Ficolina se utilizaron dos anticuerpos policlonales. Estos anticuerpos sirven para una confirmación directa, es decir, para ser utilizados en técnicas que no denaturen la proteína. Por ello se utilizó solo en *Dot Blots* (Figura 6). Para observar por WBs se utilizó el anticuerpo monoclonal, el cual es apto para reconocer la molécula lineal (Figura 7). Aunque como se observa, la calidad de éste podría ser cuestionable, ya que en diluciones relativamente bajas (1:1000), no se aprecian las bandas notoriamente.

El reconocimiento de proteína por WB, luego de una purificación, es informativo para establecer de qué proteína se trata, ya que al purificar por afinidad con N-acetilcisteína, se esperaba que solo una proteína se acoplara y luego eluyera.

Si bien la cantidad de proteína recombinante obtenida a través del proceso de purificación fue moderada, ésta es superior en comparación a las obtenidas a través de purificación del suero (proteína nativa)¹². Además, es posible obtener L-Ficolina con un mayor grado de pureza. Por ello, la estandarización de esta

técnica nos permitirá contestar diferentes preguntas que surjan en nuestro laboratorio, entre otras, su rol en infectividad de *T. cruzi*.

REFERENCIAS

1. Cseh S, Vera L, Matsushita M, Fujita T, Arlaud GJ, Thielens NM. Characterization of the interaction between L-ficolin/p35 and mannan-binding lectin-associated serine proteases-1 and -2. *J Immunol.* 2002;169(10):5735-5743.
2. Hummelshoj T, Thielens NM, Madsen HO, Arlaud J, Sim RB, Garred P. Molecular organization of human Ficolin-2. *Cloning.* 2007;44:401-411.
3. Lacroix M, Dumestre-Pérard C, Schoehn G, et al. Residue Lys57 in the collagen-like region of human L-ficolin and its counterpart Lys47 in H-ficolin play a key role in the interaction with the mannan-binding lectin-associated serine proteases and the collectin receptor calreticulin. *J Immunol.* 2009;182(1):456-465.
4. Ramírez G, Valck C, Molina MC, et al. Trypanosoma cruzi calreticulin: a novel virulence factor that binds complement C1 on the parasite surface and promotes infectivity. *Immunobiology.* 2011;216(1-2):265-273.
5. Ferreira V, Valck C, Sánchez G, et al. The classical activation pathway of the human complement system is specifically inhibited by calreticulin from Trypanosoma cruzi. *J Immunol.* 2004;172(5):3042-3050.
6. Castillo C, Ramírez G, Valck C, et al. The interaction of classical complement component C1 with parasite and host calreticulin mediates Trypanosoma cruzi infection of human placenta. *PLoS Negl Trop Dis.* 2013;7(8):e2376.
7. Valck C, Ramírez G, López N, et al. Molecular mechanisms involved in the inactivation of the first component of human complement by Trypanosoma cruzi calreticulin. *Mol Immunol.* 2010;47(7-8):1516-1521.
8. Ferreira V, Molina MC, Schwaebler W, Lemus D, Ferreira A. Does Trypanosoma cruzi calreticulin modulate the complement system and angiogenesis? *Trends Parasitol.*

2005;21(4):169-174.

9. Ferreira, Viviana; Molina M C; Valck, Carolina; Rojas, A; Ferreira A. Parasite calreticulin: possible roles in the parasite/host interface. *Inmunología*. 2002;21(3):156-168.
10. Ramírez G, Valck C, Ferreira VP, López N, Ferreira A. Extracellular Trypanosoma cruzi calreticulin in the host-parasite interplay. *Trends Parasitol*. 2011;27(3):115-122.
11. Harumiya S, Omori A, Sugiura T, Fukumoto Y, Tachikawa H, Fujimoto D. EBP-37, a new elastin-binding protein in human plasma: structural similarity to ficolins, transforming growth factor-beta 1-binding proteins. *J Biochem*. 1995;117(5):1029-1035.
12. Matsushita M, Endo Y, Sato Y, Fujita T, Chem JB. Protein Chemistry and Structure : A Novel Human Serum Lectin with Collagen- and Fibrinogen-like Domains That Functions as an Opsonin A Novel Human Serum Lectin with Collagen- and Fibrinogen-like Domains That Functions as an Opsonin *. *J Biol Chem*. 1996;271(5):2448-2454.
13. Smith LC, Azumi K, Nonaka M. Complement systems in invertebrates. The ancient alternative and lectin pathways. *Immunopharmacology*. 1999;42(1-3):107-120.
14. Ricklin D, Hajishengallis G, Yang K, Lambris JD. Complement: a key system for immune surveillance and homeostasis. *Nat Immunol*. 2010;11(9):785-797.
15. Sarma JV, Ward P a. The complement system. *Cell Tissue Res*. 2011;343(1):227-235.
16. Litvack ML, Palaniyar N. Review: Soluble innate immune pattern-recognition proteins for clearing dying cells and cellular components: implications on exacerbating or resolving inflammation. *Innate Immun*. 2010;16(3):191-200.
17. Gasque P. Complement: A unique innate immune sensor for danger signals. *Mol Immunol*. 2004;41(11 SPEC. ISS.):1089-1098.
18. Elward K, Gasque P. "Eat me" and "don't eat me" signals govern the innate immune response and tissue repair in the CNS: Emphasis on the critical role of the complement system. *Mol Immunol*. 2003;40(2-4):85-94.

19. Abul K. ABBAS AHL. *Celluar and Molecular Immunology*. 8th ed. Elsevier; 2012.
20. Kishore U, Reid KBM. C Iq : structure , function , and receptors. *Immunopharmacology*. 2000;49:159-170.
21. Gál P, Dobó J, Závodszky P, Sim RBM. Early complement proteases: C1r, C1s and MASPs. A structural insight into activation and functions. *Mol Immunol*. 2009;46(14):2745-2752.
22. Gaboriaud C, Ling WL, Thielens NM, Bally I, Rossi V. Deciphering the fine details of c1 assembly and activation mechanisms: “mission impossible”? *Front Immunol*. 2014;5(November):565.
23. Walport MJ. First of Two Parts. *N Engl J Med*. 2001;344(14):1058-1066.
24. Merle NS, Church SE, Fremeaux-Bacchi V, Roumenina LT. Complement System Part I- Molecular Mechanisms of Activation and Regulation. *Front Immunol*. 2015;6(June):1-30.
25. Ricklin D. Manipulating the mediator: Modulation of the alternative complement pathway C3 convertase in health, disease and therapy. *Immunobiology*. 2012;217(11):1057-1066.
26. Nilsson B, Nilsson Ekdahl K. The tick-over theory revisited: is C3 a contact-activated protein? *Immunobiology*. 2012;217(11):1106-1110.
27. Pangburn M, Schreiber R, Muller-Eberhard H. Formation of the Initial C3 Convertase of the Alternative Complement Pathway. *J Exp Med*. 1981;154(September):856-867.
28. Dodds AW, Matsushita M. The phylogeny of the complement system and the origins of the classical pathway. *Immunobiology*. 2007;212(4-5):233-243.
29. Matsushita M, Endo Y, Fujita T. Structural and functional overview of the lectin complement pathway: Its molecular basis and physiological implication. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*. 2013;61(4):273-283.
30. Faro J, Chen Y, Jhaveri P, et al. L-ficolin binding and lectin pathway activation by acetylated low-density lipoprotein. *Clin Exp Immunol*. 2008;151(2):275-283.

31. Heja D, Kocsis a., Dobo J, et al. Revised mechanism of complement lectin-pathway activation revealing the role of serine protease MASP-1 as the exclusive activator of MASP-2. *Proc Natl Acad Sci.* 2012;109(26):10498-10503.
32. Megyeri M, Harmat V, Major B, et al. Quantitative characterization of the activation steps of mannan-binding lectin (MBL)-associated serine proteases (MASPs) points to the central role of MASP-1 in the initiation of the complement lectin pathway. *J Biol Chem.* 2013;288(13):8922-8934.
33. Yongqing T, Drentin N, Duncan RC, Wijeyewickrema LC, Pike RN. Mannose-binding lectin serine proteases and associated proteins of the lectin pathway of complement: Two genes, five proteins and many functions? *Biochim Biophys Acta - Proteins Proteomics.* 2012;1824(1):253-262.
34. Thiel S, Vorup-Jensen T, Stover CM, et al. A second serine protease associated with mannan-binding lectin that activates complement. *Nature.* 1997;386(6624):506-510.
35. Takahashi M, Iwaki D, Kanno K, et al. Mannose-binding lectin (MBL)-associated serine protease (MASP)-1 contributes to activation of the lectin complement pathway. *J Immunol.* 2008;180:6132-6138.
36. Iwaki D, Kanno K, Takahashi M, Endo Y, Matsushita M, Fujita T. The role of mannan-binding lectin-associated serine protease-3 in activation of the alternative complement pathway. *J Immunol.* 2011;187(7):3751-3758.
37. Skjoedt MO, Hummelshoj T, Palarasah Y, et al. A novel mannan-binding lectin/ficolin-associated protein is highly expressed in heart and skeletal muscle tissues and inhibits complement activation. *J Biol Chem.* 2010;285(11):8234-8243.
38. Degn SE, Hansen AG, Steffensen R, Jacobsen C, Jensenius JC, Thiel S. MAp44, a human protein associated with pattern recognition molecules of the complement system and regulating the lectin pathway of complement activation. *J Immunol.* 2009;183(11):7371-7378.

39. Ma YJ, Skjoedt MO, Garred P. Collectin-11/MASP complex formation triggers activation of the lectin complement pathway - The fifth lectin pathway initiation complex. *J Innate Immun.* 2013;5(3):242-250.
40. Yoshizaki T, Ohtani K, Motomura W, et al. Comparison of human blood concentrations of collectin kidney 1 and mannan-binding lectin. *J Biochem.* 2012;151(1):57-64.
41. Keshi H, Sakamoto T, Kawai T, et al. Identification and characterization of a novel human collectin CL-K1. *Microbiol Immunol.* 2006;50(12):1001-1013.
42. Hansen S, Selman L, Palaniyar N, et al. Collectin 11 (CL-11, CL-K1) is a MASP-1/3-associated plasma collectin with microbial-binding activity. *J Immunol.* 2010;185(10):6096-6104.
43. Ali YM, Lynch NJ, Haleem KS, et al. The lectin pathway of complement activation is a critical component of the innate immune response to pneumococcal infection. *PLoS Pathog.* 2012;8(7): e1002793.
44. Rooryck C, Diaz-Font A, Osborn DPS, et al. Mutations in lectin complement pathway genes COLEC11 and MASP1 cause 3MC syndrome. *Nat Genet.* 2011;43(3):197-203.
45. Runza VL, Schwaeble W, Männel DN. Ficolins: novel pattern recognition molecules of the innate immune response. *Immunobiology.* 2008;213(3-4):297-306.
46. Sosoniuk E, Vallejos G, Kenawy H, et al. Trypanosoma cruzi calreticulin inhibits the complement lectin pathway activation by direct interaction with L-Ficolin. *Mol Immunol.* 2014;60(1):80-85.
47. Hummelshoj T, Munthe-Fog L, Madsen HO, Fujita T, Matsushita M, Garred P. Polymorphisms in the FCN2 gene determine serum variation and function of Ficolin-2. *Hum Mol Genet.* 2005;14(12):1651-1658.
48. Matsushita M. Ficolins in complement activation. *Mol Immunol.* 2013;55(1):22-26.
49. Garlatti V, Belloy N, Martin L, et al. Structural insights into the innate immune recognition

specificities of L- and H-ficolins. *EMBO J.* 2007;26(2):623-633.

50. Krarup A, Thiel S, Hansen A, Fujita T, Jensenius JC. L-ficolin is a pattern recognition molecule specific for acetyl groups. *J Biol Chem.* 2004;279(46):47513-47519.
51. Lynch NJ, Roscher S, Hartung T, et al. L-ficolin specifically binds to lipoteichoic acid, a cell wall constituent of Gram-positive bacteria, and activates the lectin pathway of complement. *J Immunol.* 2004;172(2):1198-1202.
52. Kilpatrick DC, Chalmers JD. Human L-Ficolin (Ficolin-2) and Its Clinical Significance. *J Biomed Biotechnol.* 2012;2012:1-10.
53. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 1976;72:248-254.
54. Towbin H, Staehelin T, Gordon J, Ross J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1979;76(9):4350-4354.
55. López NC, Valck C, Ramírez G, et al. Antiangiogenic and antitumor effects of *Trypanosoma cruzi* Calreticulin. *PLoS Negl Trop Dis.* 2010;4(7):e730.