

# **UNIVERSIDAD DE CHILE**

**FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS**

**ESCUELA DE POST GRADO Y POST TITULO**



## **CALRETICULINA (CRT) EN EL LÍQUIDO SINOVIAL DE LA ARTICULACION RADIO CARPAL EQUINA**

**CRISTÓBAL ANTONIO DÖRNER SANTA MARÍA**

**Tesis para optar al  
Grado de Magister en  
Ciencias Animales y Veterinarias**

**Santiago – Chile**

**2016**

# UNIVERSIDAD DE CHILE

FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS

ESCUELA DE POST GRADO Y POST TITULO



## CALRETICULINA (CRT) EN EL LÍQUIDO SINOVIAL DE LA ARTICULACION RADIO CARPAL EQUINA

CRISTÓBAL ANTONIO DÖRNER SANTA MARÍA

Tesis para optar al  
Grado de Magister en  
Ciencias Animales y Veterinarias

Director de Tesis:  
Dr. Héctor Adarmes Ahumada, Mg BQ.,

Santiago – Chile

2016

## **INFORME APROBACIÓN TESIS DE MAGISTER**

Se informa a la Dirección de Posgrado y Postítulo de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias que la Tesis de Magíster presentada por el candidato,

**Cristóbal Antonio Dörner Santa María**

**Calreticulina (CRT) en el líquido sinovial de la articulación radio carpal equina.**

Ha sido aprobada por la Comisión Evaluadora como requisito para optar al grado de Magíster en Ciencias Animales y Veterinarias, con Mención en Patología Animal en Examen de Defensa de tesis rendido el día 02 del mes de Noviembre del año 2015.

Director de Tesis: Héctor Adarmes Ahumada

Comisión Evaluadora: Adolfo Godoy Pinto  
Gustavo Farías Roldán

Informante de Tesis: Andrónico Neira-Carrillo

***Este trabajo se realizó en el Laboratorio de Química y Bioquímica, Departamento de Ciencias Biológicas, Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile, con el financiamiento interno del laboratorio y financiamiento aportado por la Escuela de Postgrado de FAVET para el apoyo de tesis de postgrado. Adicionalmente, existió la cooperación del Laboratorio Disciplinario de Inmunología, Instituto de Ciencias Biomédicas, Facultad de Medicina de la Universidad de Chile, quienes apoyaron con equipos y reactivos biológicos.***

## BIOGRAFÍA

Nacido el 10 de abril del año 1985 en la ciudad de Santiago. Cursó toda su etapa escolar en el colegio de los Sagrados Corazones de Manquehue, egresando de 4<sup>to</sup> medio el año 2003. El año 2004 ingresa como alumno de pregrado a la carrera de Medicina Veterinaria de la Universidad de Chile en donde demostró desde el comienzo, gran entusiasmo y compromiso por sus estudios, destacándose dentro de sus pares. Junto a los logros académicos alcanzados durante su vida como estudiante en la Facultad de Veterinaria, demostró un gran compromiso por el desarrollo de actividades extracurriculares, participando en la selección de fútbol de la Facultad, siendo capitán del equipo y participando también como voluntario y organizador en los Trabajos de Verano Veterinarios (TVV). Adicionalmente, fue ayudante alumno en los cursos de Química, Bioquímica, Semiología y Medicina Interna Equina.

El año 2008, luego de completar su quinto año, egresa de la Carrera de Medicina Veterinaria, ocupando el segundo lugar de su promoción. Luego, el año 2009 mientras realizaba su memoria de pregrado, completa el Diplomado en Medicina del Equino, destacándose por finalizar el curso de postítulo en el primer puesto. A fines de ese mismo año, obtiene su título profesional de Médico Veterinario con distinción máxima luego de haber alcanzado la máxima calificación en su examen de grado y defensa de memoria.

Luego, de ejercer 2 años como médico veterinario en el área de los caballos y de realizar cursos y pasantías tanto en Chile como en el extranjero, toma la decisión de continuar especializándose, por lo cual, postula al Magister en Ciencias Animales y Veterinarias de la Universidad de Chile en la mención de patología, ingresando al programa en Marzo del año 2012.

*Esta tesis va dedicada a toda mi familia y a Valentina que me han apoyado en todo momento y son sin duda, un pilar fundamental en mi vida.*

## AGRADECIMIENTOS

Durante este estudio, hubo grandes personas que contribuyeron con su realización por lo que estoy profundamente agradecido.

Al Dr. Héctor Adarmes, por confiar en mí y arriesgarse a construir este proyecto desde la nada. Por ser un gran consejero y por todo lo que han significado sus enseñanzas durante mi carrera profesional.

Al Dr. Marco Galleguillos, quien me instruyó en el área experimental y contribuyó cercanamente al desarrollo de los experimentos realizados.

Al Dr. Adolfo Godoy, mi mentor, responsable en gran parte por mi formación como profesional, por su incondicional apoyo, consejos y conocimientos entregados, horas dedicadas en forma desinteresada y más que todo, por su amistad.

Al Dr. Gustavo Farías, por sus ideas y contribuciones a este estudio.

Al Dr. Arturo Ferreira, porque sin conocerme, me abrió las puertas de su laboratorio, lo que permitió comenzar a hacer realidad un proyecto que se transformó en mi tesis de Magister.

Al Dr. Ismael Maldonado, por su cooperación desinteresada durante el transcurso de este trabajo.

Al Dr. Pablo Fueyo, por sus aportes y contribuciones a este estudio.

Finalmente, quiero agradecer al Dr. Sergio Bucarey, Dr. Andrónico Neira y al Sr. Víctor Molina, quienes en forma abnegada participaron y de alguna manera contribuyeron a la realización de esta investigación.

A todas las personas que de alguna u otra manera participaron y/o apoyaron la elaboración de esta Tesis de Magister.

## INDICE DE CONTENIDOS

|                                                            | Páginas |
|------------------------------------------------------------|---------|
| Informe de aprobación tesis de Magíster                    | i       |
| Fuentes de Financiamiento                                  | ii      |
| Biografía                                                  | iii     |
| Dedicatoria                                                | iv      |
| Agradecimientos                                            | v       |
| Índice de Contenidos                                       | vi      |
| Abreviaturas                                               | viii    |
| Resumen                                                    | xi      |
| Summary                                                    | xiii    |
| <br>                                                       |         |
| 1. Introducción                                            | 1       |
| 2. Revisión Bibliográfica                                  | 3       |
| 2.1. Calreticulina (CRT)                                   | 3       |
| 2.2. Líquido sinovial                                      | 11      |
| 2.2.1. Moléculas solubles presentes en el líquido sinovial | 12      |
| 3. Hipótesis                                               | 17      |
| 3.1. Objetivo general                                      | 17      |
| 3.2. Objetivos específicos                                 | 17      |
| 4. Material y Métodos                                      | 18      |
| 4.1. Selección de ejemplares clínicamente sanos            | 18      |
| 4.2. Obtención de las muestras                             | 19      |
| 4.3. Reactivos biológicos                                  | 19      |
| 4.4. Lista de reactivos                                    | 20      |
| 4.5. Preparaciones                                         | 20      |
| 4.6. Procesamiento y determinación de CRT                  | 24      |
| 4.6.1. SDS-PAGE                                            | 24      |



|        |                                                                                         |    |
|--------|-----------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 4.6.2. | Caracterización antigénica de la CRT del LS equino                                      | 25 |
| 4.6.3. | Unión de la CRT del LS equino a C1q del Complemento                                     | 27 |
| 4.6.4. | Preparación de muestras para espectrometría de masas                                    | 29 |
| 4.6.5. | Obtención de cromatogramas y espectros                                                  | 29 |
| 4.6.6. | Análisis de cromatogramas e identificación de proteínas                                 | 30 |
| 4.6.7. | Preparación de la muestra y Espectroscopía de Raman                                     | 31 |
| 4.6.8. | Preparación de la muestra para la modificación<br>del patrón electroforético            | 32 |
| 5.     | Resultados y Discusión                                                                  | 34 |
| 5.1.   | SDS-PAGE del líquido sinovial del equino                                                | 34 |
| 5.2.   | Inmuno western blot del líquido sinovial del equino                                     | 36 |
| 5.3.   | Espectrometría de masas del líquido sinovial del equino                                 | 40 |
| 5.4.   | Espectroscopía del líquido sinovial del equino                                          | 45 |
| 5.5.   | Modificación del patrón electroforético de las proteínas del<br>líquido sinovial equino | 46 |
| 6.     | Conclusiones                                                                            | 50 |
| 7.     | Bibliografía                                                                            | 51 |

## ABREVIATURAS

|                                   |                                              |
|-----------------------------------|----------------------------------------------|
| <b>AP</b>                         | Artritis psoriásica                          |
| <b>AR</b>                         | Artritis reumatoidea                         |
| <b>BCIP</b>                       | 5-bromo-4-cloro-3-inolil fosfato             |
| <b>bFGF</b>                       | Factor de crecimiento básico de fibroblastos |
| <b>Ca<sup>+2</sup></b>            | Calcio                                       |
| <b>cDNA</b>                       | DNA complementario                           |
| <b>Cnx</b>                        | Calnexina                                    |
| <b>COX</b>                        | Ciclooxigenasa                               |
| <b>CPT</b>                        | Carga proteica total                         |
| <b>CRT</b>                        | Calreticulina                                |
| <b>Csp</b>                        | Cantidad suficiente para                     |
| <b>CVT</b>                        | Carga de volumen total                       |
| <b>Cys</b>                        | Cisteína                                     |
| <b>°C</b>                         | Celsius                                      |
| <b>D</b>                          | Aspartato, Asp.                              |
| <b>DTT</b>                        | Ditiotreitol                                 |
| <b>DNA</b>                        | Ácido desoxirribonucleico                    |
| <b>E</b>                          | Glutamato, Glu                               |
| <b><i>E.coli</i></b>              | <i>Escherichia coli</i>                      |
| <b>EDTA</b>                       | Ácido etilendiaminotetraacético              |
| <b>ELISA</b>                      | Ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas     |
| <b>EqCRT</b>                      | Calreticulina equina                         |
| <b>ES</b>                         | Células madres embrionarias                  |
| <b>FAK</b>                        | Kinasa de adhesión focal                     |
| <b>FASL</b>                       | Ligando de FAS                               |
| <b>FC</b>                         | Frecuencia cardiaca                          |
| <b>G</b>                          | Calibre                                      |
| <b>g</b>                          | Gramos                                       |
| <b>GAGs</b>                       | Glicosaminoglicanos                          |
| <b>GF</b>                         | Factores de crecimiento                      |
| <b>Glc</b>                        | Glucosa                                      |
| <b>GlcNAc</b>                     | N-acetilglucosamina                          |
| <b>GMPc</b>                       | Guanosín monofosfato cíclico                 |
| <b>GLUT</b>                       | Transportador de glucosa                     |
| <b>hr.</b>                        | Hora                                         |
| <b>Hsp</b>                        | Heat shock protein                           |
| <b>HuCRT</b>                      | Calreticulina humana                         |
| <b>HUVEC</b>                      | Células de cordón umbilical humano           |
| <b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b> | Peróxido de hidrógeno                        |
| <b>ICBM</b>                       | Instituto de ciencias biomédicas             |
| <b>IGF</b>                        | Factor de crecimiento insulínico             |

|                        |                                                       |
|------------------------|-------------------------------------------------------|
| <b>IFN</b>             | Interferón                                            |
| <b>IL</b>              | Interleuquina                                         |
| <b>IL-1R</b>           | Receptor de interleuquina 1                           |
| <b>IL-1ra</b>          | Antagonista del receptor de interleuquina 1           |
| <b>iNOS</b>            | Óxido nítrico sintasa inducible                       |
| <b>IWB</b>             | Inmuno western blot                                   |
| <b>K</b>               | Lisina, Lys                                           |
| <b>kDa</b>             | Kilo Daltons                                          |
| <b>kg</b>              | Kilogramos                                            |
| <b>L</b>               | Leucina, Leu                                          |
| <b>L.</b>              | Litro                                                 |
| <b>LES</b>             | Lupus eritematoso sistémico                           |
| <b>LIAM</b>            | Laboratorio de inmunología de la agresión microbiana. |
| <b>LRP</b>             | Proteína relacionada con el receptor de LDL           |
| <b>LS</b>              | Líquido sinovial                                      |
| <b>LTB4</b>            | Leucotrieno B4                                        |
| <b>M</b>               | Molar                                                 |
| <b>MALDI</b>           | Matrix-assisted laser desorption/ionization           |
| <b>Man</b>             | Manosa                                                |
| <b>MEC</b>             | Matriz extracelular                                   |
| <b>mg</b>              | Miligramos                                            |
| <b>mL</b>              | Mililitro                                             |
| <b>mM</b>              | Milimolar                                             |
| <b>MMPs</b>            | Metaloproteasas de matriz                             |
| <b>mV</b>              | Milivolts                                             |
| <b>NBT</b>             | Azul de nitrotetrazolio                               |
| <b>ng</b>              | Nanogramos                                            |
| <b>nm</b>              | Nanometros                                            |
| <b>NO·</b>             | Óxido nítrico                                         |
| <b>OA</b>              | Osteoartritis                                         |
| <b>PG</b>              | Proteoglicanos                                        |
| <b>PGE<sub>2</sub></b> | Prostaglandina E2                                     |
| <b>PBS</b>             | <i>Buffer</i> fosfato salino                          |
| <b>PAGE</b>            | Electroforesis en gel de poliacrilamida               |
| <b>PVDF</b>            | Polifluoruro de vinilideno                            |
| <b>RE</b>              | Retículo endoplásmico                                 |
| <b>SDS</b>             | Dodecil sulfato de sodio                              |
| <b>SPT</b>             | Solubilizados post tratamiento                        |
| <b>T°</b>              | Temperatura                                           |
| <b>TBS</b>             | <i>Buffer</i> Tris salinos                            |
| <b>Tc</b>              | <i>Trypanosoma cruzi</i>                              |
| <b>TcCRT</b>           | Calreticulina de <i>Trypanosoma cruzi</i>             |
| <b>TEMED</b>           | N,N,N',N'- tetrametiletildiamina                      |
| <b>TGF</b>             | Factor de crecimiento transformante                   |

|                          |                                           |
|--------------------------|-------------------------------------------|
| <b>TIMPs</b>             | Inhibidores tisulares de MMPs             |
| <b>TNF</b>               | Factor de necrosis tumoral                |
| <b>TOF</b>               | Time-of-flight (tiempo de vuelo)          |
| <b>Tween</b>             | Polisorbato                               |
| <b><i>T. carassi</i></b> | <i>Trypanosoma carassi</i>                |
| <b>VEGF</b>              | Factor de crecimiento vascular endotelial |
| <b>Zn<sup>+2</sup></b>   | Zinc                                      |

## RESUMEN

El objetivo planteado para esta tesis fue investigar la presencia de la proteína Calreticulina en el líquido sinovial de la articulación radio carpal de equinos Fina Sangre Inglés, mediante métodos moleculares y de esta manera describir una proteína que hasta la fecha no se ha identificado en la especie equina.

Para lo anterior, se utilizaron 5 equinos clínicamente sanos, desde los cuales se obtuvo una muestra de líquido sinovial para su posterior estudio. Se realizó una electroforesis en gel de poliacrilamida que se analizó mediante inmuno electro transferencia (IWB) utilizando anticuerpos anti Calreticulina humana (HuCRT) y anti Calreticulina de *Trypanosoma cruzi* (TcCRT), permitiendo un reconocimiento antigénico de la proteína. Se utilizó HuCRT y TcCRT como control (+). Adicionalmente, se estudió la capacidad *in vitro* de la Calreticulina presente en el líquido sinovial para unirse a C1q del sistema de complemento, lo cual fue estudiado mediante inmuno electro transferencia. También, se efectuaron ensayos con el objetivo de modificar el patrón electroforético de las proteínas del líquido sinovial equino para disminuir la concentración de las proteínas más abundantes, y con ello aumentar relativamente las proteínas que se encuentran en menor concentración. Finalmente, se realizó una espectrometría de masas (MALDI-TOF) y una espectroscopia de Raman con el objeto de identificar y confirmar que la proteína inmuno reactiva fuese CRT.

En la IWB se evidenció una reacción positiva por la aparición de una banda de aproximadamente 50 kDa la cual fue evidenciada con el anticuerpo anti HuCRT. El desafío a C1q no generó una reacción positiva, no pudiendo

evidenciarse la unión de CRT del líquido sinovial equino al componente C1q del complemento. La presencia de la proteína CRT en el líquido sinovial equino, utilizando el diseño experimental planteado, no pudo ser confirmada por espectrometría de masas como por espectroscopía de Raman, necesitándose diseñar otros experimentos para separar y aislar más específicamente la proteína en estudio.

La Calreticulina equina (EqCRT) fue reconocida principalmente por el anticuerpo anti HuCRT y no así por el anticuerpo anti TcCRT, lo que se debe probablemente a una mayor homología entre ambas proteínas a diferencia de la proteína del equino con la proteína de *Trypanosoma cruzi*. Por otro lado, el que no hubiese reacción al realizar el desafío frente a C1q, no quiere decir que la “EqCRT” no se una a C1q y puede haber sido más que nada un problema de diseño experimental en donde se utilizaron concentraciones muy bajas de proteína, no logrando producir una reacción identificable mediante el IWB. Para lograr una correcta identificación de la CRT mediante espectrometría de masas, se requiere obtener una muestra más purificada y de esta manera evitar el reconocimiento de otras proteínas contaminantes. Por otro lado, la espectroscopía de Raman, con la longitud de onda utilizada (785 nm), no fue posible identificar un espectro específico que pudiese confirmar la presencia de CRT en el líquido sinovial equino de animales clínicamente sanos. Con la información obtenida en este estudio, es posible suponer que la CRT puede estar cumpliendo algún rol en la homeostasis articular, sin embargo, otros experimentos son necesarios para lograr su completa identificación.

## SUMMARY

The goal for this research was to investigate the presence of Calreticulin in the equine synovial fluid obtained from the radio carpal joint of Thoroughbred horses and thus describe a protein that has not been identified in this specie so far.

Five clinically healthy horses were selected and a synovial fluid sample was obtained from each one. Synovial fluid samples obtained were analyzed by a polyacrylamide gel electrophoresis and western blotting using anti *Trypanosoma cruzi* Calreticulin (TcCRT) and anti Human Calreticulin (HuCRT) antibodies, allowing an antigenic recognition of the protein. TcCRT and HuCRT served as positive controls. Additionally, challenge between the equine synovial fluid and C1q of the human complement system was studied by western blot. Also, a combinatorial peptide ligand library technology assay was performed to deplete high concentration proteins, like albumin, which can mask and difficult the access to low concentration proteins. The aforementioned assay changed the synovial fluid electrophoretic pattern. Finally, the immunoreactive protein was studied by MALDI-TOF mass spectrometry and Raman spectroscopy.

The western blot demonstrated a positive reaction that allowed detection of a band of 50 kDa when anti HuCRT antibody was used. The challenge to C1q did not generate a positive reaction evidencing a failed binding between EqCRT from synovial fluid with human C1q. The presence of CRT in the equine synovial fluid could not be confirmed by both mass spectrometry and Raman spectroscopy using the experimental design proposed for this study thus further investigation is required to fully identify the protein in the equine synovial fluid.

The EqCRT was only recognized by anti HuCRT antibody, which was probably due to higher homology between the human and equine proteins.

On the other hand, no reaction was evidenced when the EqCRT was challenged against C1q, nevertheless, that is attributable to an experimental design problem in which very low concentrations of protein were used so the western blot was not able to generate a detectable signal.

Due to experimental design, it was not possible to fully confirm the presence of the protein in the equine synovial fluid from clinically healthy animals using Mass spectrometry and Raman spectroscopy. However, the information gathered in this study imply that CRT may be present in the synovial fluid of horses and it might be a protein involved in the homeostasis of joints but further investigation is required.



# 1. INTRODUCCIÓN

El retículo endoplásmico (RE) es considerado uno de los organelos más importantes ya que metabólicamente es un gran reservorio de  $\text{Ca}^{+2}$ . Este organelo se caracteriza por ser uno de los más grandes en las células eucariontes, contiene una gran cantidad de chaperonas y posee un ambiente óptimo para el plegamiento, modificación y ensamblaje de proteínas. El RE contiene proteínas residentes que se encuentran ampliamente involucradas con las funciones del RE, siendo una de ellas, la Calreticulina (CRT), chaperona ligadora de  $\text{Ca}^{2+}$  implicada en muchas funciones celulares como: almacenamiento de  $\text{Ca}^{+2}$ , regulación en la expresión de genes, adhesividad celular, autoinmunidad, entre otras.

En la última década, varios grupos de investigación, han puesto énfasis al estudio de la Calreticulina, glicoproteína que participa en una serie de procesos orgánicos. Esta molécula es una proteína de aproximadamente 46-60 kDa con una secuencia señal N-terminal, la cual es degradada por una proteasa específica y una señal C-terminal KDEL (Lys, Asp, Glu, Leu) de retención en el retículo endoplásmico. Por mucho tiempo se pensó que su ubicación se encontraba restringida al retículo endoplásmico; sin embargo, hoy se sabe que se distribuye de manera ubicua y se ha encontrado en el núcleo, citoplasma, gránulos citotóxicos en linfocitos T, suero sanguíneo, en la superficie de la mayoría de las células mamíferas y en el espacio extracelular de diversos tejidos como útero, hígado, cerebro, pulmón, páncreas, entre otros. Recientemente, se ha identificado su presencia en el líquido sinovial humano, presentando aparentemente un papel en la fisiopatología de la artritis reumatoidea.

El DNA complementario (cDNA) y los genes que codifican para esta glicoproteína, han sido descritos y aislados en muchas especies de vertebrados (humanos, bovinos, perros, roedores) invertebrados (*Trypanosoma spp*) y plantas

superiores (maíz, cebada, espinaca, entre otros.), no obstante, hasta la fecha esta molécula no ha sido descrita en la especie equina.

El líquido sinovial (LS), es un fluido de gran importancia al momento de asegurar la homeostasis articular. La mantención de una articulación sana, depende de la mantención del equilibrio entre los procesos catabólicos y anabólicos presentes en la articulación. Este equilibrio está dado por la interacción de la adecuada expresión de factores de crecimiento, citoquinas y enzimas remodeladoras de la matriz extracelular (MEC). Al romperse este equilibrio se producen los cambios degenerativos en la articulación, particularmente en el cartílago articular, el cual es un tejido que al carecer de irrigación sanguínea y linfática, depende estrechamente del líquido sinovial para su nutrición y eliminación de desechos metabólicos.

De acuerdo a lo anteriormente descrito y basado en la información existente en relación a la CRT, en esta tesis se planteó evaluar la presencia de la glicoproteína CRT en el líquido sinovial de equinos normales, siendo éste un estudio preliminar, con el objeto de obtener información relevante que permita plantear otros estudios de investigación para dilucidar y evaluar el papel que cumple la CRT en la homeostasis articular y en el desarrollo de la enfermedad degenerativa articular en los equinos.

## 2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

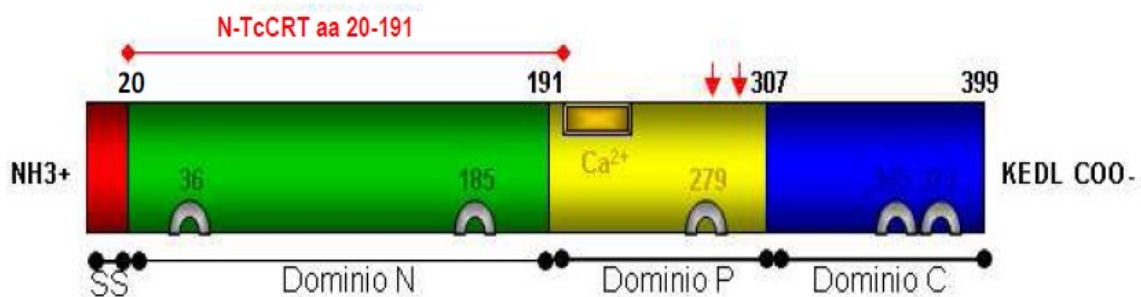
### 2.1 Calreticulina (CRT)

El Retículo Endoplásmico (RE), es un organelo esencial para la síntesis y maduración proteica. Es un reservorio y fuente de señales de  $\text{Ca}^{+2}$ . Cualquier perturbación de sus funciones puede resultar en la acumulación de proteínas mal plegadas y posterior falla de su funcionamiento (Serrano, 2009). El RE contiene proteínas chaperonas que están fisiológicamente involucradas en modificaciones post-traduccionales, formación de enlaces disulfuro, plegamiento y control de las nuevas proteínas sintetizadas para preservar la homeostasis celular (Gatica, 2009). Estas pueden organizarse en tres grupos: (a) chaperonas de la familia de las proteínas “heat-shock” (Hsp), que incluye a GRP78, GRP94 y co-chaperonas; (b) chaperonas tipo lectinas como Calnexina (Cnx), Calreticulina (CRT); y (c) chaperonas substrato- específicas como Hsp47 (Gatica, 2009).

CRT es una proteína de aproximadamente 46 kDa, deducido desde su secuencia aminoacídica, sin embargo, cuando es analizada con SDS-PAGE, esta proteína migra a una masa molecular aparente de 60-63 kDa, mientras que su masa estimada a pH neutro es de 55 kDa. Esta proteína tiene un punto isoeléctrico aproximado de 4,65 (Michalak *et al.*, 1992). La CRT posee una secuencia señal N-terminal que es degradada por una proteasa específica y una señal C-terminal KDEL de retención en el retículo endoplásmico (López, 2008; Gatica, 2009; Vera, 2011). Es una proteína ampliamente conservada, con una homología aminoacídica por sobre un 90% entre humanos, conejos, ratas y ratones (Serrano, 2009). Esta proteína ha sido estudiada y descrita en distintas especies animales y vegetales, describiéndose por ejemplo en humanos (Arosa *et al.*, 1999), en bovinos (Liu *et al.*, 1993), en conejos (Fliegel *et al.*, 1989) en el maíz (Dresselhaus *et al.*, 1996), en la cebada (Chen *et al.*, 1994), en *Trypanosoma cruzi* y *T. carassi* (Ferreira *et al.*, 2005; Oladiran y Belosevic, 2010), entre otros. Al comparar la secuencia aminoacídica de

la CRT de *Trypanosoma cruzi* con la CRT de humano, se ha descrito solamente un 40% de identidad y un 64% de similitud (Labriola *et al.*, 1999). Hawn *et al.*, (1993), encontró en sus estudios del parásito *Shistosoma mansoni* que al clonar y expresar el gen SmlrV1, éste presenta más del 40% de similitud con la CRT, presentando también similitud en algunas funciones (afinidad por el ión  $\text{Ca}^{+2}$ ). Adicionalmente, se ha detectado en humanos y ratones (Persson *et al.*, 2002), una segunda isoforma de la molécula CRT (CRT2), con un 53% y un 49% de identidad con la CRT previamente identificada para humanos y ratón respectivamente. Por otro lado, esta segunda isoforma también ha sido identificada en bovinos (Liu *et al.*, 1993), la cual comparte una alta similitud con la CRT de ratón en sus aminoácidos C-terminal (318 aminoácidos), mientras que su extremo N-terminal es completamente divergente (Liu *et al.*, 1993).

El análisis estructural de CRT predice que la proteína contiene al menos tres dominios (Fig. N° 1), con propiedades funcionales específicas. La secuencia aminoacídica del dominio N-terminal (residuos 1-170), es extremadamente conservada en todas las CRTs. Este dominio une  $\text{Zn}^{2+}$  con una baja afinidad, pero con una gran capacidad (Michalak *et al.*, 1992; Michalak *et al.*, 1999). Además, contiene tres Cys, que es una secuencia conservada desde plantas superiores hasta humanos. El dominio P (residuos 171 a 285), comprende una región rica en prolina, que une  $\text{Ca}^{2+}$  con alta afinidad, pero con baja capacidad. El dominio C-terminal (residuos 286 a 400), es el menos conservado, une  $\text{Ca}^{2+}$  con alta capacidad, pero con baja afinidad; es altamente ácido y termina con la señal de retención en el retículo endoplásmico KDEL (Michalak *et al.*, 1992; Michalak *et al.*, 1999; López, 2008; Gatica, 2009). Es importante destacar que existe un dominio S (aác. 159-281), el cual está incluido en los dominios N y P, y está involucrado en la unión de componentes del Sistema de Complemento (Aguilar *et al.*, 2005). El dominio N o amino terminal, es denominado con el nombre de vasostatina debido a su gran actividad antiangiogénica (Gatica, 2009; Vera, 2011).



**Fig. 1. Representación lineal de los dominios de CRT de *Trypanosoma cruzi*. La proteína contiene una secuencia señal N-terminal (caja roja) y una señal KDEL de RE C-terminal (López, 2008).**

La localización subcelular de CRT es amplia y no está completamente clara. Debido a su señal de retención en el RE, CRT originalmente era reconocida como una chaperona tipo lectina que residía únicamente en el lumen del RE (López, 2008). Al localizarse en el retículo endoplasmático, tiene la función de dirigir el correcto plegamiento de proteínas y glicoproteínas. El plegamiento de las proteínas ocurre gracias a la interacción entre Calnexina (Cnx) y CRT. Esta interacción entre las proteínas y las chaperonas antes mencionadas, ocurre gracias a la *N*-glicosilación con  $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$  que sufren las nuevas cadenas polipeptídicas que van a ser plegadas. Luego estos glicanos son procesados mediante la acción de las enzimas glucosidasa I y glucosidasa II, permitiendo la entrada de la nueva proteína al ciclo de la Cnx/CRT y con ello, su plegamiento (Kozlov *et al.*, 2010).

Por otro lado, la CRT controla la homeostasis del citosol y los niveles de  $\text{Ca}^{+2}$  a nivel del RE (Gold *et al.*, 2010). No obstante, hoy en día existe información disponible que avala la distribución de la CRT de manera ubicua en el organismo. Estudios confirman la presencia de CRT en el núcleo de las células (Burns *et al.*, 1994), en el citoplasma (Holaska *et al.*, 2001), en la membrana celular de las células de la matriz extracelular (Gold *et al.*, 2010), en los gránulos citotóxicos de linfocitos T (Dupuis *et al.*, 1993), suero sanguíneo (Sueyoshi *et al.*, 1991), en el espacio extracelular de varios tipos celulares (Both y Koch, 1989; Eggleton *et al.*, 1994), en la superficie de la mayoría de las células mamíferas (White *et al.*, 1995; Arosa *et al.*,

1999; Basu y Srivastava, 1999; Ferreira *et al.*, 2004a; Johnson *et al.*, 2012) y recientemente en un estudio se ha identificado su presencia en el líquido sinovial humano (Tarr *et al.*, 2010). CRT también puede ser secretada o liberada por muerte celular, mediando varias funciones. Estas localizaciones subcelulares son posibles gracias a una retrotranslocación de CRT desde el RE al citosol. Se ha descrito que CRT es primero insertada completamente en el RE y luego, su señal de destinación es procesada por una peptidasa y posteriormente se retrotransloca al citosol, en un proceso independiente de ubiquitinación o actividad proteosomal (López, 2008).

En humanos, se ha utilizado el ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA), para el estudio de las concentraciones de CRT en el suero en pacientes con artritis reumatoidea, lupus eritematoso sistémico (LES), osteoartritis (OA) y controles sanos, encontrándose una concentración significativamente superior ( $4,817 \pm 2,425$  ng/ml), en los pacientes afectados por artritis reumatoidea en relación a los valores encontrados en los pacientes con LES, OA y controles sanos (Ni *et al.*, 2013). Otro grupo de investigadores (Tarr *et al.*, 2010), encontró al estudiar pacientes con artritis reumatoidea (AR), artritis psoriásica (AP) y controles sanos, que las concentraciones de CRT en suero y líquido sinovial de pacientes con AR (10,3 ng/ml), son significativamente mayores que las concentraciones halladas en los pacientes con AP y controles sanos (3,1 ng/ml y 2,9 ng/ml respectivamente), al ser cuantificadas mediante ELISA.

Hoy en día, se sabe que CRT se encuentra implicada en muchas funciones celulares asociadas a los distintos dominios de esta proteína. CRT participa en la modulación de la expresión génica, inducción de la fagocitosis de células apoptóticas, procesos autoinmunes, es antiangiogénica, inhibe el crecimiento tumoral, y participa en la actividad lítica de perforinas de células T y células NK (Ferreira *et al.*, 2004b). Las funciones principales y más conocidas que se le atribuyen a la CRT, es la unión a  $Ca^{2+}$  y el actuar como chaperona en el lumen del RE (Michalak *et al.*, 1992; Michalak *et al.*, 1999). Adicionalmente, CRT funciona como una molécula chaperona tipo lectina para muchas proteínas, de forma similar

a Calnexina. En cuanto a la unión de  $\text{Ca}^{2+}$ , CRT aumenta la capacidad de almacenamiento de este ión en el RE. La concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  en el lumen del RE afecta varios procesos, incluyendo las interacciones proteína-proteína y chaperona-sustrato. La sensibilidad a la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  está confinada al dominio C-terminal de CRT, sugiriendo que podría actuar como un sensor en el lumen del RE (Michalak *et al.*, 1992; Michalak *et al.*, 1999).

El efecto antiangiogénico descrito en el extremo N-terminal de la CRT, se demostró por su capacidad de inhibir la proliferación celular endotelial *in vitro*, de suprimir la neovascularización *in vivo*, y de prevenir o reducir el crecimiento de tumores experimentales (Pike *et al.*, 1998; López, 2008; Gatica, 2009). En otro estudio, se determinó la capacidad del dominio N-terminal (vasostatina), de inhibir la proliferación de células endoteliales de la vena de cordón umbilical humano (HUVEC) y de endotelio del corazón bovino, inducida ya sea por bFGF o por VEGF (Pike *et al.*, 1999). Este efecto antiangiogénico del dominio N-terminal se encuentra específicamente entre los aminoácidos 20-191 (López, 2008).

Por otro lado, se han descrito funciones específicas de la CRT, fuera del RE, como por ejemplo, la modulación de la transcripción por receptores nucleares de hormonas. La CRT inhibe la unión del receptor de andrógenos a su elemento de respuesta en el DNA y la actividad transcripcional del receptor de andrógenos (Michalak *et al.*, 1999) y del receptor de ácido retinoico *in vivo*, así como la diferenciación neuronal inducida por ácido retinoico (Dedhar *et al.*, 1994).

La CRT también modula la adhesividad celular. Woochul *et al.*, (2006) mediante la modificación genética de células madres mesenquimáticas, aumentó la expresión de CRT, logrando mejorar la adhesión celular gracias al aumento de la unión a fibronectina en relación a células madres mesenquimáticas no modificadas genéticamente. Adicionalmente, también se ha demostrado *in vitro*, que CRT une un péptido sintético en forma  $\text{Ca}^{2+}$  dependiente, que corresponde a una secuencia

aminoacídica conservada de una región C-terminal de la subunidad  $\alpha$  de integrinas (López, 2008; Gold *et al.*, 2010). Por lo tanto, se presume que estabiliza la unión de integrina con su ligando y posiblemente activa la kinasa de adhesión focal (FAK) (Gold *et al.*, 2010). También, se demostró en células PC-3 de carcinoma prostático, que la CRT interactúa momentáneamente con integrinas, mientras las células se adhieren y expanden sobre proteínas de la matriz extracelular. Esta unión es sensible al ácido okadaico, un inhibidor de fosfatasa de serina-treonina. Además de su acción directa sobre integrinas, CRT podría modular la adhesividad celular modificando la expresión génica de moléculas relacionadas con la adhesión. Por ejemplo, la proteína vinculina y N-caderina están aumentados en células que sobreexpresan CRT (Opas *et al.*, 1996). Células ES (embryonic stem cells) deficientes de CRT, desarrolladas en ratones “knock out”, han mostrado una deficiente adhesión mediada por integrina, evaluado mediante ensayos de adhesión celular en fibronectina y laminina, lo que corrobora las observaciones en donde se ha sugerido que cambios en la expresión de CRT afecta la adhesividad celular (Michalak *et al.*, 1999).

Otra función asociada a la CRT dice relación con la apoptosis. Se encontró que la expresión de CRT en la superficie celular aumenta y es redistribuida durante la apoptosis, aumentando probablemente la estimulación de la proteína relacionada con el receptor LDL (LRP) en el fagocito (Gardai *et al.*, 2005). Así mismo, la delección del gen que codifica para LRP o CRT en ratones, interrumpe el desarrollo y es fatal (Gardai *et al.*, 2005). CRT genera una señal apoptótica o “eat me signal” (Vera, 2011), ya sea directamente o, entre otras posibilidades, reclutando C1 del sistema del complemento. Se ha descrito que las antraciclinas o inhibidores de la fosfatasa 1/GADD34 (involucrada en la desfosforilación de eIF2 $\alpha$ , proteína hiperfosforilada durante estrés en el retículo endoplásmico), inducen una rápida translocación de CRT hacia la superficie celular en células pro-apoptóticas, favoreciendo la eliminación por parte de las células dendríticas. Asimismo, el bloqueo de CRT suprime la fagocitosis de células tumorales por parte de las células dendríticas



(López, 2008; Gold *et al.*, 2010). Contrariamente, se ha descrito que la CRT es capaz de unirse al ligando de Fas (FasL) inhibiendo con ello, la interacción entre Fas/FasL, lo que se traduce en la inhibición del mecanismo apoptótico comandado por Fas (Tarr *et al.*, 2010), atribuyendo funciones anti apoptóticas cuando la CRT se encuentra en el compartimento extracelular, al mismo tiempo que se le atribuyen funciones pro apoptóticas cuando es expresada en la superficie celular frente a daño tisular o estrés oxidativo (Gold *et al.*, 2010). El fenómeno pro-apoptótico comandado por el receptor de Fas y su ligando, ha sido ampliamente descrito y la articulación no es la excepción. Es así como se ha estudiado el efecto apoptótico en condrocitos y su susceptibilidad a la vía apoptótica Fas/FasL (Hashimoto *et al.*, 1997), la cual contribuye al proceso de degradación del cartílago en los casos de OA. Adicionalmente, se ha descrito *in vitro* que la molécula de ácido hialurónico a una concentración de 1.000 µg/ml reduce significativamente la apoptosis de condrocitos inducidos por la vía Fas/FasL gracias a la unión a receptores específicos (CD44 e ICAM-1), y no así la apoptosis espontánea de condrocitos como mecanismo fisiológico en donde células alteradas o dañadas son eliminadas (Lisignoli *et al.*, 2001), contribuyendo de esta forma, a la mantención de la homeostasis articular.

Por otro lado, se han descrito los potenciales roles de la CRT en la cicatrización de heridas, demostrándose en modelo murino y porcino el aumento de la migración epitelial y formación de tejido de granulación (Gold *et al.*, 2006). Adicionalmente, este mismo grupo de investigadores en estudios *in vitro*, demostraron que esta molécula induce migración celular, cierre de la herida por parte de queratinocitos y fibroblastos, y además estimula la proliferación celular de queratinocitos, fibroblastos, células endoteliales vasculares y una buena disposición y cantidad de fibras de colágeno en humanos (Gold *et al.*, 2006). Se ha visto que la CRT también estimula la migración de monocitos y macrófagos en heridas, al comparar heridas en un modelo porcino en relación al control (Gold *et al.*, 2010). Estos resultados demuestran que la CRT, cumple un rol importante en el reclutamiento de células esenciales para la reparación de heridas, estimula el

crecimiento celular y aumenta la producción de matriz extracelular. No obstante, contradictoriamente a la capacidad antiangiogénica descrita para esta molécula y su capacidad antitumoral, se ha descrito que la CRT es esencial para la reparación de heridas por su capacidad de estimular el crecimiento de nuevos vasos sanguíneos (Gold *et al.*, 2010). La relación entre la CRT y la matriz extracelular, ha sido estudiada en células deficientes en CRT en donde se producen alteraciones cardíacas y formación de onfalocele en embriones, atribuyéndose a cambios en la composición de la matriz extracelular. Las Metaloproteasas 2 y 9 son esenciales para el desarrollo y remodelación cardiovascular, detectándose alteraciones en la actividad de estas enzimas en embriones deficientes de CRT (Wu *et al.*, 2007).

Se ha estudiado la relación entre la CRT de *Trypanosoma cruzi* (Tc) y el sistema del complemento y se ha demostrado que la CRT de *Trypanosoma cruzi* y la de *Trypanosoma carassi* se une a la porción colagenosa de C1q inhibiendo funcionalmente la vía clásica del complemento (Ferreira *et al.*, 2004a; Ferreira *et al.*, 2004b; Ferreira *et al.*, 2005; Oladiran y Belosevic, 2010), situación también observada con CRT humana (Ghiran *et al.*, 2002). Adicionalmente, se ha determinado que el desafío de la molécula de TcCRT y el anticuerpo anti-TcCRT, resulta en la inhibición de la interacción de ésta con el primer componente del complemento en humanos (Aguilar *et al.*, 2005).

Recientemente, se patentó el uso de CRT con fines terapéuticos (reparación de heridas) y cosméticos (Calregen, Inc). Se ha planteado dentro de los usos terapéuticos, la reparación de heridas corneales, crecimiento de folículos pilosos, regeneración de nervios periféricos y del sistema nervioso central, reparación ósea y de cartílago, entre otras (Gold y Michalak, 2013).

## 2.2 El Líquido Sinovial

Las articulaciones diartrodiales están compuestas por estructuras altamente diferenciadas como el hueso, cartílago articular, cápsula articular y líquido sinovial. Estas estructuras anatómicas son las encargadas de proveer a las articulaciones sinoviales de su resistencia, ausencia de fricción en el movimiento y capacidad de soportar las fuerzas de compresión, tensión y cizallamiento (San Román, 2000).

El líquido sinovial (LS) es un ultrafiltrado del plasma sanguíneo, modificado por las células tipo B (sinoviocitos B), de la membrana sinovial. Durante la historia, se han propuesto varios postulados relacionados con el origen del líquido sinovial (secreción glandular, transudación de capilares sanguíneos y linfáticos, productos de destrucción del cartílago articular, destrucción de la membrana sinovial). Sin embargo, hoy se acepta que su producción está dada por un proceso de filtración plasmática (Lasta, 1998). En normalidad, el líquido sinovial tiene un aspecto límpido y transparente, una coloración amarillo clara, consistencia viscosa e inodoro. El líquido sinovial contiene una gran cantidad de ácido hialurónico, glicosaminoglicano no sulfatado que produce una excepcional elevación de la presión coloidal osmótica y de los niveles de  $Ca^{+2}$ , debido a su naturaleza poli-aniónica. El LS posee menor cantidad de proteínas que el plasma y además no contiene fibrinógeno, por lo tanto no coagula espontáneamente. Es de naturaleza tixotrópica, propiedad física dada por el ácido hialurónico (Lasta, 1998). La membrana sinovial posee tres tipos de células: las células del tipo "A" son las más numerosas, se encuentran localizadas adyacentes a la cavidad articular y tienen muchas prolongaciones citoplasmáticas (filopodios o lamelipodios). Presentan aparato de Golgi, grandes mitocondrias y se le atribuyen funciones fibroblásticas o macrofágicas. Las células del tipo "B" son alargadas u ovoides y contienen un retículo endoplásmico rugoso muy prominente y mitocondrias más grandes que las presentes en las células tipo "A". Se consideran células secretoras de colágeno y hialuronato (Bertone *et al.*, 2001). El tercer tipo

celular “C” o “AB” sería un intermedio entre la “A” y la “B”, teniendo características estructurales de ambas células (Lasta, 1998; Leach *et al.*, 1998; Caron, 2011).

La región sub sinovial (profundo al revestimiento sinovial) posee un rico aporte sanguíneo que es esencial para generar el líquido sinovial, facilitar el intercambio de nutrientes y desechos metabólicos. El flujo sanguíneo sinovial se encuentra envuelto en un complejo sistema regulatorio extrínseco, además de la producción de factores locales como la angiotensina II, endotelina-1 y el óxido nítrico (Caron, 2011). Los nutrientes migran desde los vasos sinoviales hacia el LS y subsecuentemente, penetran por difusión simple y/o ciclos de compresión-relajación a la matriz cartilaginosa, mientras que los desechos metabólicos son eliminados simultáneamente en la dirección contraria (Caron, 2011). El ingreso de glucosa a los condrocitos es independiente de insulina y es realizado por los transportadores de glucosa GLUT 1, 3 y 10, siendo el GLUT 1 el más importante, el que también cumple el rol de ingresar la glucosamina y la vitamina C al condrocito (Mobasheri *et al.*, 2002). Se ha descrito que el recambio de varios componentes de la matriz no es uniforme, es así que una porción de proteoglicanos (PG) es renovada relativamente rápido mientras que el recambio del colágeno es mínimo, por lo tanto, la mantención de la matriz del cartílago involucra un proceso de síntesis y degradación mediado por los condrocitos.

### **2.2.3 Moléculas solubles presentes en el líquido sinovial**

La mantención de una articulación sana, depende de la mantención del equilibrio entre los procesos catabólicos y anabólicos presentes en la articulación (Sánchez y López, 2011). Este equilibrio está dado por la interacción, entre otras cosas, de la adecuada expresión de factores de crecimiento, citoquinas y enzimas remodeladoras de la MEC (Carmona y Giraldo-Murillo, 2007). Al romperse este equilibrio es cuando se presentan los cambios degenerativos en la articulación.

El proceso catabólico en la articulación está relacionado con la exagerada expresión de la citoquina interleuquina-1 (IL-1), la que a su vez activa varios metabolitos catabólicos, entre ellos, las metaloproteasas de matriz (MMPs) (Carmona y Giraldo-Murillo, 2007; López-Armada *et al.*, 2007). La IL-1 se une a receptores específicos para ella: IL-1R tipo I y tipo II. El IL-1R tipo I se encuentra aumentado en condrocitos y sinoviocitos OA, haciendo a las células más sensibles a la IL-1 $\beta$  (López-Armada *et al.*, 2007). La producción de prostaglandina E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>), es también inducida por la IL-1 y el TNF $\alpha$  vía COX-2 (Bertone *et al.*, 2001; López-Armada *et al.*, 2007). La PGE<sub>2</sub> es producida por leucocitos, condrocitos y sinoviocitos. Su efecto radica en vasodilatación, potencia la percepción del dolor, favorece la expresión del factor activador del plasminógeno y la degradación de proteoglicanos (Bertone *et al.*, 2001). No obstante, la PGE<sub>2</sub> puede tener efectos opuestos a la IL-1 ya que inhibe la expresión de genes que codifican para la producción de IL-1 y MMPs (p.e. disminución de MMP-1 mediada por el factor de transcripción ERK), a la vez que estimula la expresión de citoquinas anti inflamatorias (Carmona y Giraldo-Murillo, 2007; López-Armada *et al.*, 2007) y favorece la síntesis de matriz extracelular del cartílago, al estimular la síntesis de colágeno tipo II (López-Armada *et al.*, 2007).

Otras moléculas involucradas en el proceso catabólico son los leucotrienos (LTB<sub>4</sub>), óxido nítrico (NO $\cdot$ ) y el TNF $\alpha$  (Bertone *et al.*, 2001; Kim *et al.*, 2003; Rasera *et al.*, 2006; Carmona y Giraldo-Murillo, 2007; López-Armada *et al.*, 2007). El primero desencadena vasodilatación y quimiotaxis, y se encuentra directamente relacionado con el número de leucocitos presentes en la articulación. Las articulaciones sanas contienen muy poco NO $\cdot$ , el cual es producido por la óxido nítrico sintasa constitutiva (NOS) (Leach *et al.*, 1998). Bajo estas circunstancias, el NO $\cdot$  inhibe a las MMPs y estimula la síntesis de proteoglicanos (PG), debido a la activación de la guanilato ciclasa provocando el aumento del GMPc, el cual activa la cascada de señalización (PKG), que culmina en la formación de MEC y protección celular (Sánchez y López, 2011). Sin embargo, en articulaciones que cursan con

OA, aumenta la expresión de la iNOS (inducible), enzima responsable de la producción exacerbada de NO<sup>•</sup>, situación directamente relacionada con el grado de lesión del cartílago articular (López-Armada *et al.*, 2007). El NO<sup>•</sup> actúa como mediador de la destrucción de la MEC (aumenta actividad de MMPs), mediador de la apoptosis de condrocitos, disminuye el depósito de sulfatos en los GAGs, en la producción de colágeno y en la expresión de IL-1ra (antagonista de IL-1), (efectos catabólicos y anti anabólicos) (Bertone *et al.*, 2001; López-Armada *et al.*, 2007). También se ha descrito que el NO<sup>•</sup> inhibe la síntesis de agregcan, incrementa la susceptibilidad del condrocito a oxidantes como el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y contribuye a la resistencia a los efectos anabólicos del IGF-1 (López-Armada *et al.*, 2007).

El TNF también ha sido descrito en el líquido sinovial equino como molécula implicada en el proceso inflamatorio. Es producido por condrocitos, sinoviocitos, macrófagos, linfocitos y fibroblastos y al igual que otras moléculas, su producción es estimulada por la IL-1 y viceversa. Su acción es similar al de la IL-1, y estimula el aumento de PGE<sub>2</sub>, NO<sup>•</sup>, IL-1 y disminuye la síntesis de TIMPs (inhibidores tisulares de MMPs) y MEC (Carmona y Giraldo-Murillo, 2007; López-Armada *et al.*, 2007). Se ha descrito que la IL-1 es unas 100-1000 veces más potente que el TNF $\alpha$  y este último, estaría implicado en dirigir la inflamación aguda mientras que la IL-1 tendría un papel más preponderante en la mantención de la inflamación y erosión del cartílago (López-Armada *et al.*, 2007). La IL-6 es otra molécula que ha sido investigada tanto en el equino como humanos. Su aumento es estimulado por la IL-1 y produce el aumento de proteínas de fase aguda, linfocitos T, linfocitos B e inhibidores de serinproteasas (Carmona y Giraldo-Murillo, 2007).

El proceso anabólico está comandado por la producción de factores de crecimiento (GF) y citoquinas anti inflamatorias que inhiben parcialmente el efecto de metabolitos catabólicos (Vega *et al.*, 2002; Carmona y Giraldo-Murillo, 2007). Las moléculas más descritas en el caballo son el IGF-1. IGF-II y TGF- $\beta$  (Frisbie *et al.*, 2000; Fortier *et al.*, 2004; Sánchez y López, 2011). Los IGFs estimulan la síntesis

de PG, colágeno II e integrinas, a la vez que inhiben la destrucción de la MEC (Vega *et al.*, 2002). El TGF- $\beta$  es un potente mitógeno para los condrocitos y potencia la síntesis de PG, algunas integrinas y de los TIMPs, no obstante, se ha descrito que tiene un efecto deletéreo al inhibir la producción de colágeno tipo II (Vega *et al.*, 2002). Por otro lado, se han estudiado varias citoquinas anti inflamatorias que regulan el proceso inflamatorio instaurado en la OA, algunas de ellas son IL-1 $\alpha$  (equinos y humanos), IL-4, IL-10, IL-11, IL-13, IFN- $\gamma$  y leptina (adipocina) (humanos) (Carmona y Giraldo-Murillo, 2007; López-Armada *et al.*, 2007; Sánchez y López, 2011).

Otro grupo importante de moléculas presentes en el líquido sinovial son la metaloproteasas (MMPs). Estas enzimas pertenecen a un grupo de endopeptidasas dependientes de zinc (Carmona y Giraldo-Murillo, 2007; González-Ávila *et al.*, 2009) y calcio (González-Ávila *et al.*, 2009) y son producidas en exceso por sinoviocitos, condrocitos, macrófagos y neutrófilos (Carmona y Giraldo-Murillo, 2007). Son secretadas como zimógenos inactivos (pro-MMPs), y son activadas por desdoblamiento enzimático. En el año 1993, sólo se tenía conocimiento de 9 metaloproteinasas de matriz (Birkedal-Hansen *et al.*, 1993), situación que para el año 2010 cambia radicalmente conociéndose hasta esa fecha, 26 metaloproteinasas distintas (Sekhon, 2010). Se han clasificado en grupos de acuerdo al sustrato que degradan y a la organización de sus dominios en colagenasas, gelatinasas, estromelisininas, matrilisininas, MMPs asociadas a membranas y otras MMPs (Birkedal-Hansen *et al.*, 1993; López-Armada *et al.*, 2007; González-Ávila *et al.*, 2009; Angosto y Álvarez-Gómez, 2010; Sekhon, 2010). Resulta importante mencionar que la actividad enzimática de estos mediadores, se encuentra íntimamente controlada por ciertas moléculas específicas inhibitoras, denominadas “inhibidores tisulares de las MMPs” o TIMPs (López-Armada *et al.*, 2007). En casos patológicos, como por ejemplo OA o AR, existe un aumento significativo de ciertas MMPs activadas, produciendo un desbalance entre

MMPs/TIMPs, favoreciendo la degradación tisular del cartílago articular (Yoshihara *et al.*, 2000).

De acuerdo a la información existente de la CRT y su presencia en el líquido sinovial en humanos, se planteó en esta tesis, detectar la presencia de ésta glicoproteína en el líquido sinovial de equinos sanos, con el objeto de contribuir al conocimiento de la CRT además de obtener información relevante que permita plantear otros estudios de investigación, para dilucidar y evaluar el papel que cumple la CRT en la homeostasis articular y en el desarrollo de la enfermedad degenerativa articular en los equinos.



### **3. HIPOTESIS**

La proteína CRT se encuentra presente en el líquido sinovial del equino en articulaciones clínicamente sanas.

#### **3.1 Objetivo general**

Detectar y caracterizar la molécula CRT en el líquido sinovial de la especie equina.

#### **3.2 Objetivos específicos**

Determinar la presencia de CRT equina en ensayos *in vitro*, a partir de muestras de líquido sinovial del equino de articulaciones clínicamente sanas.

Estudiar la capacidad funcional de la CRT del líquido sinovial del equino, mediante el desafío frente a C1q del complemento *in vitro*.

## 4. MATERIAL Y MÉTODO

El presente estudio se realizó con un pool de muestras de líquido sinovial obtenidas desde la articulación radio carpal de 5 equinos Fina Sangre Inglés, de edad entre 5-10 años, clínicamente sanos, ubicados en el centro ecuestre de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile. No se consideró sexo. Los equinos presentaron un peso aproximado entre 450 a 600 kilos.

### 4.1 Selección de los ejemplares clínicamente sanos

Los ejemplares debieron cumplir con los siguientes requisitos:

- Ausencia de alguna afección sistémica o inflamatoria local al momento de la toma de muestra.
- Examen clínico:
  - Frecuencia cardíaca (FC): Valores entre 25 y 54 latido por minuto.
  - Temperatura (T°) rectal: 37,5 +/- 0,5.
  - Mucosas: color rosado pálido y ausencia de ingurgitación de venas periféricas.
  - Auscultación cardiopulmonar normal.
- Examen musculo esquelético: Ausencia de claudicación. Ninguna articulación debió presentar aumento de volumen, o signos de dolor a la manipulación y palpación.
- Examen radiográfico: Ausencia de signos radiológicos de daño articular de la articulación radio carpal seleccionada, tales como: remodelación ósea, osteofitos, enteseofitos, esclerosis, disminución del espacio articular. Ausencia de cualquier tipo de fractura.

El no cumplimiento de alguno de estos requisitos, fue causal de exclusión de la muestra.

## 4.2 Obtención de la muestra

Para la obtención de líquido sinovial, los ejemplares fueron sedados con xilazina (0,5 mg/kg) y en los casos de ser necesario, se utilizó un torcedor en el morro del animal. La zona de artrocéntesis, articulación radio carpal, fue preparada de manera aséptica como sigue:

- a) Se depiló la zona con una maquina depiladora (Oster Gold A5) y peine N° 40
- b) Se desinfectó la zona con clorhexidina 4% seguido de alcohol al 70%.
- c) El procedimiento de desinfección fue repetido 4 veces con un intervalo de 5 min. entre cada uno.

Se utilizó una aguja de 21 G x 1" para la obtención de la muestra y el miembro del animal debió encontrarse levantado con la articulación en flexión, para tener un mejor acceso a la articulación. Se recolectó una cantidad entre 2 a 4 mL por articulación en tubos con EDTA, para su posterior procesamiento.

## 4.3 Reactivos biológicos

**Suero policlonal de conejo anti-HuCRT y anti-TcCRT.** Producidos en el Laboratorio de Inmunología de la Agresión Microbiana (LIAM), Programa de Inmunología, Facultad de Medicina, Universidad de Chile.

**TcCRT recombinante.** Clonada y purificada en LIAM

**HuCRT recombinante.** Expresada y purificada en LIAM.

**Segundo Anticuerpo de cabra anti-IgG de conejo conjugado con fosfatasa alcalina.** Sigma-Aldrich ® y Dako ®.

#### 4.4 Lista de Reactivos (ordenados por compañía de origen)

**BioRad:** (USA) acrilamida, Bio-Rad Protein Assay, bis-acrilamida, persulfato de amonio, TEMED, membrana de PVDF, membrana de nitrocelulosa, PBS, TBS.

**MERCK:** (Alemania) ácido acético, ácido clorhídrico, azul de bromofenol, cloruro de magnesio, cloruro de sodio, EDTA, etanol, metanol, Tris-acetato,

**Sigma-Aldrich:** (USA) Azul de Coomasie R250, 2-mercaptoetanol, glicerol, glicina, NBT-BCIP, SDS, Tris-base, Tween 20 (Polisorbato).

#### 4.5 Preparaciones

##### Stock de acrilamida 30% p/v

|                       |       |
|-----------------------|-------|
| Acrilamida            | 29,2g |
| Bis-acrilamida        | 0,8g  |
| Agua desionizada csp. | 100mL |

*Disolver. Enrasar. Filtrar. Guardar en envase ámbar a 4°C*

##### Gel de acrilamida al 12% (separador)

|                      |       |
|----------------------|-------|
| Acrilamida           | 4mL   |
| Buffer gel pH 8,8    | 3mL   |
| SDS 10%              | 100µL |
| Persulfato de amonio | 100µL |
| TEMED                | 6µL   |
| Agua desionizada     | 3mL   |

##### Gel de acrilamida al 4,5% (concentrador)

|                   |       |
|-------------------|-------|
| Acrilamida        | 1,5mL |
| Buffer gel pH 6,8 | 2,5mL |

|                      |             |
|----------------------|-------------|
| SDS 10%              | 100 $\mu$ L |
| Persulfato de amonio | 200 $\mu$ L |
| TEMED                | 12 $\mu$ l  |
| Agua desionizada     | 6mL         |

**Buffer Gel (pH 6,8) 0,5 M (concentrador)**

|                       |      |
|-----------------------|------|
| Trizma base           | 6g   |
| Agua desionizada csp. | 60mL |

*Ajustar pH con ácido clorhídrico p.a. Enrasar. Guardar en envase ámbar a 4°C*

**Buffer Gel (pH 8,8) 1,5 M (separador)**

|                       |       |
|-----------------------|-------|
| Trizma base           | 45,5g |
| Agua desionizada csp. | 250mL |

*Ajustar pH con ácido clorhídrico p.a. Enrasar. Guardar en envase ámbar a 4°C*

**Persulfato de amonio 10%**

|                      |       |
|----------------------|-------|
| Persulfato de amonio | 0,05g |
| Agua desionizada     | 0,5mL |

*Mantener a -20°C el polvo e hidratar con el agua al momento de utilizarlo o se puede dejar preparado en alícuotas para un solo uso (de 0,5mL) y dejar a -20°*

**Solvente de muestra 3x (para proteínas)**

|                          |         |
|--------------------------|---------|
| Tris 1M pH 6,8           | 1,9mL   |
| Glicerol                 | 3mL     |
| $\beta$ -mercapto etanol | 1,5mL   |
| SDS al 20%               | 3mL     |
| Azul de Bromofenol       | un poco |

|      |             |
|------|-------------|
| Agua | 600 $\mu$ l |
|------|-------------|

*Disolver, alicuotar de a 0,5mL y almacenar a -20°C*

**Tris 250mM/Glicina 2M (pH 8,15) (Buffer corrida y transferencia)**

|                       |        |      |
|-----------------------|--------|------|
| Tris base             | 30,3g  | (T2) |
| Glicina               | 150,1g | (T4) |
| Agua desionizada csp. | 1 L.   |      |

*Disolver. Ajustar a pH. Enrasar. Mantener a temperatura ambiente*

**Buffer corrida**

|                       |       |
|-----------------------|-------|
| Tris 250mM/Glicina 2M | 100mL |
| SDS 20%               | 5mL   |
| Agua desionizada csp. | 1 L.  |

*Agitar. Enrasar. Mantener a 4°C*

**Buffer transferencia**

|                       |       |
|-----------------------|-------|
| Tris 250mM/Glicina 2M | 100mL |
| Metanol técnico       | 200mL |
| Agua desionizada csp. | 1 L.  |

*Agitar. Enrasar. Mantener a 4°C*

**Solución de tinción Azul de Coomassie**

|                                   |       |
|-----------------------------------|-------|
| Azul de Coomassie brillante R-250 | 1g    |
| Metanol p.a.                      | 500mL |
| Agua desionizada                  | 400mL |

*Mantener en envase ámbar a temperatura ambiente. Al momento de utilizar agregar 4mL de ácido acético glacial por cada 36mL de esta solución. Una vez utilizada se recupera y se reutiliza.*

#### **Solución de destinción de Azul de Coomassie**

|                  |       |
|------------------|-------|
| Metanol p.a.     | 100mL |
| Agua desionizada | 800mL |

*Mantener en envase ámbar a temperatura ambiente. Al momento de utilizar agregar 4mL de ácido acético glacial por cada 36mL de esta solución.*

#### **PBS-Leche 3%**

|                  |       |
|------------------|-------|
| Leche descremada | 3g    |
| PBS 1x csp.      | 100mL |

*Agitar. Enrasar. Mantener a 4°C*

#### **PBS-Leche 5%**

|                  |       |
|------------------|-------|
| Leche descremada | 5g    |
| PBS 1x csp.      | 100mL |

*Agitar. Enrasar. Mantener a 4°C*

#### **Buffer para fosfatasa alcalina (pH 9,5)**

|                       |        |       |
|-----------------------|--------|-------|
| NaCl                  | 5,84g  | 100mM |
| MgCl <sub>2</sub>     | 1,02g  | 5mM   |
| Trizma base           | 12,11g | 100mM |
| Agua desionizada csp. | 1 L.   |       |

*Agitar. Enrasar. Mantener en envase ámbar a 4°C*

## 4.6 Procesamiento y determinación de CRT

Las muestras de LS fueron mantenidas en baño de hielo y procesadas dentro de un plazo de 15-30 min. Luego de obtenidas, se centrifugaron a 5.000 xg durante 10 min. y posteriormente, el sobrenadante se alicuotó en volúmenes de 100  $\mu$ L (tubos eppendorf) que se mantuvieron a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta la determinación y caracterización de la molécula mediante métodos inmunológicos.

Se evaluaron 3 características moleculares que contribuyeron a su caracterización: peso molecular relativo, características antigénicas y caracterización funcional mediante la unión a C1q del sistema de complemento.

La caracterización de la CRT equina se realizó en conjunto con el Instituto de Ciencias Biomédicas (ICBM), Laboratorio Disciplinario de Inmunología, Facultad de Medicina, Universidad de Chile, según el protocolo descrito a continuación (López, 2008):

### 4.6.1 SDS-PAGE

- Se prepararon geles de poliacrilamida al 12% con la finalidad de realizar un SDS-PAGE (dodecil sulfato de sodio - electroforesis en gel de poliacrilamida) en una cámara *Mini-Protean-2* (BioRad, USA).
- La concentración de proteínas en el líquido sinovial fue obtenida utilizando el *Bio-Rad Protein Assay*, según las especificaciones del fabricante. Brevemente, el ensayo se basa en el método de Bradford, en el que un reactivo ácido se agrega a la solución de proteínas, reaccionando principalmente a residuos básicos y aromáticos. El color del colorante varía en respuesta a las distintas concentraciones proteicas. La absorbancia se determinó a 595nm.



- Las muestras fueron previamente calentadas a 100°C por 5 min. en *buffer* de carga (solvente de muestra 3x y PBS 1x). El gel se cargó con líquido sinovial (LS) equino (10 µg), además de un marcador de peso molecular previamente estandarizado. Como control (+) se utilizó CRT recombinante humana (10 ng) y CRT recombinante parasitaria (*Trypanosoma cruzi*) (10 ng) las cuales fueron cargadas cada una en geles distintos. La CRT humana y parasitaria fue proporcionada por el laboratorio disciplinario de inmunología (ICBM), gracias a su expresión en *E.coli*.
- Posteriormente se realizó la electroforesis (Bio-Rad), manteniendo una potencia de 50 miliVolts durante un tiempo de 1,5 horas y luego una potencia de 100 miliVolts por un tiempo de 1,5 hrs.
- Posterior a la electroforesis, uno de los geles fue teñido con Azul de Coomassie por una noche a temperatura ambiente en una placa de petri para su posterior envío a espectrometría de masas. El Azul de Coomassie tiene la capacidad de unirse inespecíficamente a proteínas generando bandas de color azul en el gel de poliacrilamida. Los otros geles fueron transferidos a una membrana de PVDF.

#### **4.6.2 Caracterización antigénica de la CRT del líquido sinovial equino**

- Los geles realizados fueron transferidos a una membrana de PVDF para la posterior realización de una electro inmuno transferencia o *western blot* (IWB). Brevemente, para la transferencia se colocó en el siguiente orden (todo previamente mojado en *buffer* de transferencia x 10 minutos): 1 esponja, 2 papeles filtro grueso (cortados del mismo tamaño que el gel), 1 membrana de PVDF (hacia el polo positivo), gel ya corrido (hacia el polo negativo), 2 papeles filtro grueso y 1 esponja, de manera de formar un “*sandwich*”. El *sándwich* se colocó en la cámara de transferencia y luego se llenó con el *buffer* de transferencia (1,2 L. aproximadamente). La cámara de

transferencia se colocó dentro de otra caja con hielo y se sometió a 500 miliamperios por 75 minutos.

- Una vez realizada la transferencia a la membrana de PVDF, ésta se bloqueó en PBS - leche 5%, solución que fue preparada al momento de utilizarla. El bloqueo de la membrana de PVDF, se realizó en una placa de petri pequeña durante 1 hr. a temperatura ambiente y luego una noche a 4°C. Al día siguiente, la membrana se lavó con TBS - Tween 0,05% (1 L. TBS + 500 µL Tween).
- Se incubaron las membranas con el primer anticuerpo anti CRT humana para una membrana y anticuerpos anti CRT parasitaria para la otra por 1,5 hrs a 37°C. Para asegurar que las membranas estuviesen cubiertas completamente, se incubaron en una estufa con movimiento continuo. Los anticuerpos fueron obtenidos desde suero policlonal anti HuCRT o TcCRT (conejos), generados en el ICBM, diluidos 1:1000 en PBS leche 3%. Posterior a la incubación, las membranas se lavaron 5 veces con TBS - Tween 0,05% por 5 minutos cada vez.
- Se incubó cada membrana con un segundo Anticuerpo anti IgG de conejo conjugado con fosfatasa alcalina, con una dilución de 1:2000 en PBS-leche 3%.
- Finalmente, las membranas fueron nuevamente lavadas como se describió anteriormente, y la unión de los anticuerpos fue detectada con la reacción NBT – BCIP (NBT: Cloruro de nitroblue tetrazolium. BCIP: 5-bromo-4-chloro-3'-indolyphosphate). Para esta reacción y revelado de la membrana, se utilizó *buffer* fosfatasa alcalina (10 mL), NBT (66 µL) y BCIP (33 µL). La reacción fue detenida con PBS (49 mL) y EDTA 100 mM (1 mL).

Con lo anteriormente descrito, se determinó la molécula de acuerdo a sus características antigénicas.

Posteriormente a estos resultados, se procedió a caracterizar la CRT en el líquido sinovial del equino mediante el reconocimiento de su unión con el C1q del sistema del complemento (humano), lo que se determinó como sigue (Aguilar *et al.*, 2005; López, 2008):

#### **4.6.3 Unión de la CRT del líquido sinovial equino a C1q del sistema de complemento**

- Se preparó un gel de poliacrilamida al 12% con la finalidad de realizar un SDS-PAGE (dodecil sulfato sódico - electroforesis en gel de poliacrilamida) en cámara *Mini-Protean-2* (BioRad, USA).
- Se cargaron los carriles N° 1, 4 y 7 con un marcador de peso molecular previamente estandarizado, y los carriles N° 2, 5 y 8 con C1q comercial humano (15 µg). Los carriles 3, 6, 9 y 10 no fueron cargados.
- Luego, el gel de poliacrilamida fue transferido a una membrana de nitrocelulosa para la posterior realización de un IWB. La transferencia fue realizada de la misma manera a lo descrito anteriormente.
- Una vez realizada la transferencia a la membrana de nitrocelulosa, ésta se bloqueó con PBS - leche 5%, el que fue preparado al momento de utilizarlo. El bloqueo de la membrana de nitrocelulosa se realizó en una placa de petri pequeña durante 1 hr. a temperatura ambiente y luego una noche a 4°C. Al día siguiente, la membrana se lavó con PBS-Tween 0,05% (1 L. PBS + 500 µL Tween).
- La membrana se cortó en tres con el objeto de dejar tres membranas más pequeñas para poder ser trabajadas individualmente: la membrana 1 corresponde desde el carril 1 al 2, la membrana 2 desde el carril 4 al 5 y la membrana 3 desde el carril 7 al 8. De acuerdo a lo anterior, se incubó la membrana 1 con HuCRT recombinante (200 µg) (control (+) y las restantes 2 con líquido sinovial equino (300 µg) por 1,5 hrs. cada una. Para asegurar que las membranas estuviesen cubiertas completamente, se incubaron con

movimiento continuo a temperatura ambiente. Cada membrana fue lavada 5 veces durante 5 minutos por vez con PBS - Tween 0,05%.

- Luego, las membranas se incubaron con el primer Anticuerpo anti HuCRT para la membrana 2 y para el control (+), mientras que la tercera membrana fue incubada con el anticuerpo anti TcCRT por 1,5 hrs. Para asegurar que las membranas estén cubiertas completamente, se incubaron en una estufa con movimiento continuo a 37°C. Cada membrana fue lavada 5 veces durante 5 minutos por vez con PBS - Tween 0,05%.
- Posteriormente se ocuparon 2 mL de suero policlonal anti HuCRT o TcCRT (generados en el ICBM), diluidos 1:1000 en PBS - leche 3%. Cada membrana fue lavada 5 veces durante 5 minutos por vez con PBS - Tween 0,05%.
- Finalmente, se incubó cada membrana con un segundo Anticuerpo anti IgG de conejo conjugado con fosfatasa alcalina, diluido 1:1000 en PBS - leche 3%. Cada membrana fue lavada 5 veces durante 5 minutos por vez con PBS - Tween 0,05%.
- La unión de los anticuerpos (reacción positiva) fue detectada con la reacción NBT – BCIP (NBT: Cloruro de nitroblue tetrazolium. BCIP: 5-bromo-4-chloro-3'-indolyphosphate). Para esta reacción y revelado de la membrana se utilizará *buffer* fosfatasa alcalina (10 mL), NBT (66 µL) y BCIP (33 µL). La reacción será detenida con PBS (49 mL) y EDTA 100 mM (1 mL).

De esta manera, se estudió si la CRT del líquido sinovial del equino, es capaz de inhibir la cascada del complemento y con ello caracterizarla funcionalmente.

Conforme a lo anterior, se realizó la determinación de la proteína CRT mediante espectrometría de masas, obteniendo el sector del gel que concuerda con el peso molecular ya conocido y extrapolado desde la HuCRT y TcCRT (55 kD). Paralelamente, se buscó la proteína CRT en el líquido sinovial del equino mediante el estudio de sus características antigénica y funcional.

La espectrometría de masas (Facultad de Química y Farmacia, Universidad de Chile), fue realizada mediante la técnica MALDI-TOF (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization – Time Of Flight), para confirmar la presencia de la proteína en el líquido sinovial equino.

#### **4.6.4 Preparación de muestras para la espectrometría de masas**

Las bandas se lavaron dos veces con agua nanopura durante 30 min a temperatura ambiente, luego se removió el Azul de Coomassie con bicarbonato de amonio (200 mM) preparado en acetonitrilo 50% v/v durante 30 min a 37°C. A continuación las bandas se incubaron con ditiotretitol (10 mM) preparado en bicarbonato de amonio (200 mM) durante 30 min a 37°C. Luego se alquilaron con yodoacetamida (55 mM) preparada en bicarbonato de amonio (200 mM) durante 30 min a 37°C (en oscuridad). Las bandas se deshidrataron con acetonitrilo y se secaron a temperatura ambiente durante 10 min y luego se colocaron en hielo. Se agregó tampón de proteólisis bicarbonato de amonio (50 mM) /acetonitrilo 10% v/v que contenía 0.3 µg/µL de tripsina (Promega Corp., WI-USA) y se incubó en hielo durante 45 min. Luego, se adicionó tampón de proteólisis (sin tripsina) de modo de sumergir completamente la banda y se incubó durante toda la noche a 37°C. Se recuperó el sobrenadante, se realizaron dos extracciones con acetonitrilo 60% v/v/ácido fórmico 0.1% v/v y una extracción con acetonitrilo. Se combinaron el sobrenadante y las extracciones y se llevaron a sequedad en SpeedVac a temperatura ambiente. Las muestras concentradas se re-suspendieron en 12 µL de ácido fórmico 0.1% v/v y metanol 3% v/v.

#### **4.6.5 Obtención de cromatogramas y espectros**

Para la obtención de espectros se mezcló cada muestra re-suspendida con la matriz ácido α-ciano-4-hidroxicinámico en razón 1:1 (CHCA; preparada a una concentración de 10 mg/mL en acetonitrilo/ácido fórmico 0.1% v/v 1:1. Esta matriz se utiliza de preferencia para péptidos y/o proteínas de masa molecular menor a

10000 Da) y se depositaron 2  $\mu$ L de cada mezcla en una placa porta muestra micro scout (Bruker Daltonics Inc., MA-USA).

La adquisición de espectros de masas se realizó en un equipo MALDI-TOF Microflex (Bruker Daltonics Inc., MA-USA) en modo ion positivo mediante detección por reflexión. Previo a la obtención de los espectros se realizó una calibración del equipo con un estándar externo correspondiente a una mezcla de péptidos de masas 1000-3000 Da (Bruker Daltonics Inc., MA-USA). Para el control del espectrómetro se utilizó el programa flexControl 3.0 (Bruker Daltonik GmbH, Alemania).

Los espectros finales corresponden a la suma de 15 barridos de 30 impactos de láser (450 impactos de láser en total) aplicados en diferentes puntos tomados al azar de cada muestra depositada en la placa porta muestra.

#### **4.6.6 Análisis de cromatogramas e identificación de proteínas**

Para el análisis de los espectros se utilizó el programa flexAnalysis versión 2.2 (Bruker Daltonik GmbH, Alemania). Para la detección de las señales m/z monoisotópicas se utilizó el algoritmo SNAP (sophisticated numerical annotation procedure) utilizando una razón señal/ruido (S/N) mínima de 6. Una vez generadas las listas de señales m/z monoisotópicas se realizó una calibración interna utilizando las señales producto de la autoproteólisis de la tripsina, las que se removieron de las listas y las señales restantes se exportaron a Excel. Adicionalmente, las listas de masas exportadas de cada muestra se examinaron por medio del programa Peak Erazor 2.0.1 (Lighthouse data, Odense, Dinamarca) en búsqueda de señales provenientes de la contaminación de las muestras con queratina las que también se removieron de las listas. Para la identificación se utilizaron las listas procesadas de señales m/z (intervalo m/z 600-4000).

Las listas procesadas de señales m/z (intervalo m/z 600-4000) se utilizaron para la identificación en las bases de datos:

•Mascot ([http://www.matrixscience.com/cgi/search\\_form.pl?FORMVER=2&SEARCH=PMF](http://www.matrixscience.com/cgi/search_form.pl?FORMVER=2&SEARCH=PMF))

•MS-Fit (<http://prospector.ucsf.edu/prospector/cgi-bin/msform.cgi?form=msfitstandard>)

Se consideraron los siguientes parámetros: enzima de proteólisis, tripsina; pérdida de cortes, 1; modificación fija, carbamidometilación (alquilación con yodoacetamida); modificación variable, oxidación de metionina; masa, monoisotópica; tolerancia de masa, 0.1-0.2 Da. Se realizaron búsquedas sin restricción por taxonomía y considerando restricción por Other mammalia (Mascot) o *Equus caballus* (MS-Fit).

#### **4.6.7 Preparación de la muestra y espectroscopia de Raman**

Para la realización de la espectroscopia de Raman, la muestra fue obtenida directamente desde el gel de poliacrilamida previamente sometido a SDS-PAGE.

Se realizó el análisis de la siguiente forma: primero se calibró el equipo según las recomendaciones del fabricante, luego se midió el espectro del tubo de vidrio para la muestra vacío, luego se obtuvo el espectro del tubo con la muestra líquida de HuCRT pura. Posteriormente, se cambió el método de medición el cual fue realizado directamente en el gel sobre la platina del equipo. Se obtuvo los espectros del gel en un lugar conocido sin muestra, en el gel en el lugar donde se obtuvo la banda de HuCRT como control (+) y en el gel en el lugar donde eventualmente debiese encontrarse la CRT equina en la muestra de líquido sinovial (lugar ubicado según los resultados del IWB).

#### **4.6.8 Preparación de la muestra para la modificación del patrón electroforético**

Con el objetivo de modificar el patrón electroforético del líquido sinovial equino y disminuir la intensidad de la banda de albúmina, muestras de líquido sinovial (obtenidas desde la articulación radio-carpal en 10 piezas de matadero) fueron procesadas, para lo cual se procedió a desarrollar el método de ecualización proteica mediante el uso de bibliotecas de ligandos combinatoriales (Proteominer® *Bulk Beads* 163-3012), junto a la captura a distintos pH. El protocolo que se siguió

fue una variación del procedimiento original estipulado por el fabricante para adaptarlo al trabajo con el líquido sinovial.

El protocolo de trabajo fue realizado como sigue:

- Se resuspendieron 100 mg de *Bulk Beads* de Proteominer con 2mL de etanol al 20% v/v en un tubo eppendorf, que se mantuvieron por 12 horas a temperatura ambiente, en rotación constante. Luego, se centrifugó y se eliminó el sobrenadante. Al precipitado obtenido se le agregó 1mL de H<sub>2</sub>O desionizada y se repitió la centrifugación. Este lavado se repitió 3 veces obteniéndose finalmente 400µL de resina.
- Una fracción de la resina (100µL) se transfirió a 3 tubos estériles de 15 mL, los cuales fueron tamponados con 5mL de *buffer* 25mM acetato pH 4,0, *buffer* 25mM fosfato (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) pH 7,0 y *buffer* Tris-HCl 25mM pH 9,3. Los tubos se mantuvieron en agitación a 20°C por 2 horas.
- Luego, a partir de un *pool* de líquido sinovial previamente filtrado para disminuir la concentración de ácido hialurónico (20mL), se obtuvieron y agregaron 6,5mL para cada uno de los tubos que contenían 100µL de resina previamente tamponados a distintos pH, los cuales se dejaron en rotación lenta, en un agitador, por 2 horas a temperatura ambiente.
- Se centrifugó cada tubo a 1.000 g por un minuto, para luego descartar el sobrenadante. Se añadió 1mL de tampón de lavado, se rotó por 5 minutos para luego centrifugar a 1.000 g y descartar el sobrenadante. Este lavado se repitió 2 veces.
- Finalizado el lavado, se añadió 1mL de agua desionizada a cada tubo que contenía la resina con las proteínas, y se rotó por un minuto, y luego se centrifugó bajo las mismas condiciones anteriormente mencionadas. Se le añadió 1mL de una solución de resuspensión (500mL SDS 10% y DTT 50mM) que se mantuvo por 15 minutos, agitando suavemente en vórtex en forma esporádica.



- Finalmente se centrifugó a 1.000 g por 1 minuto quedando la fracción proteica en el sobrenadante. Este proceso se repitió tres veces para formar un *pool* con los sobrenadantes obtenidos, el que se fraccionó y almacenó a -20° C hasta su utilización.
- A la fracción proteica obtenida se le determinó la concentración de proteína mediante el método de Lowry. Luego, el sobrenadante se sometió a una electroforesis unidimensional usando un sistema de formato mini 1-D de electroforesis (*Mini-Protean-2®*), en gel de poliacrilamida, conforme al protocolo anteriormente descrito, en el que se incluyó líquido sinovial equino no tratado, para realizar la comparación y dilucidar el cambio del patrón electroforético.

## 5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 5.1 Electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)

El primer paso para la detección de la CRT en el líquido sinovial del equino, fue la separación de las proteínas mediante la realización de una electroforesis unidimensional en gel de poliacrilamida (sistema Laemmli). Con este ensayo se logró separar las proteínas presentes en el líquido sinovial (Fig. 2). Se pudo constatar que el control positivo con HuCRT y TcCRT migra en el gel a un peso molecular de 60 kDa aproximadamente, situación similar a lo descrito por otros autores (Michalak *et al.*, 1992). El Azul de Coomassie posee una sensibilidad de 8 ng de proteínas y por lo tanto, como para el control positivo se utilizó una concentración de 10 ng de CRT recombinante purificada, ésta fue visible en el gel de poliacrilamida. Por otro lado, si se extrapola la concentración encontrada en el líquido sinovial de humanos (2,9 ng/ml (Tarr *et al.*, 2010)), esta proteína no es posible visualizarla en el gel de poliacrilamida con la tinción de Azul de Coomassie en condiciones normales.

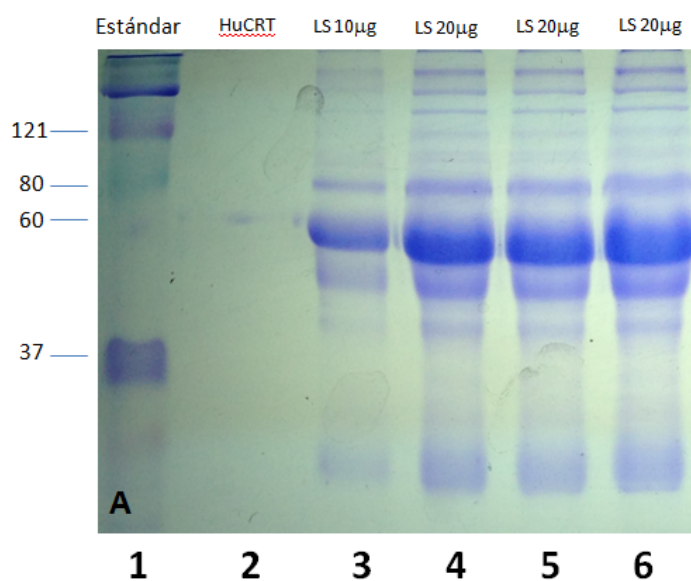
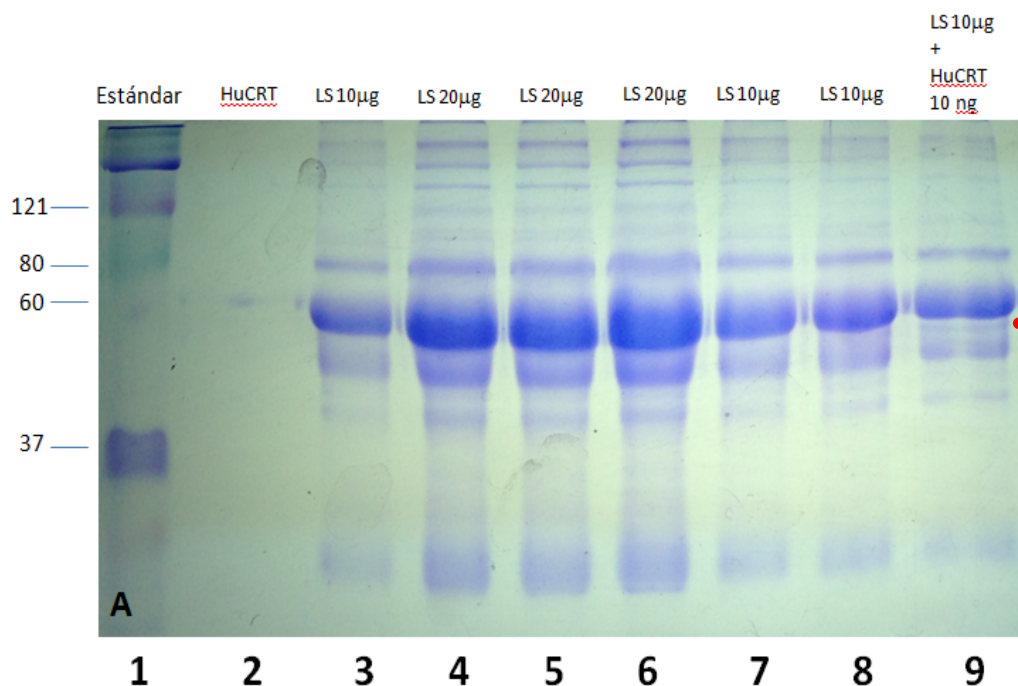


Fig. 2. SDS-PAGE del líquido sinovial del equino. Carril 1: estándar de peso molecular, carril 2: control (+) con 10ng HuCRT (60kDa) y carriles 3, 4, 5 y 6 corresponden a LS equino en concentraciones de proteína de 10 µg y 20 µg .

Con el resultado obtenido en la electroforesis, se dispone de un primer indicio acerca de la localización en el gel, la proteína en estudio.

Con la finalidad de identificar en el gel la verdadera ubicación de la CRT del líquido sinovial, se realizó un ensayo de reconstitución en el cual, se agregó líquido sinovial junto a 10 ng de HuCRT (carril 9) y de esta manera, lograr visualizar la banda correspondiente a la proteína en cuestión. En la electroforesis se evidenció una banda bajo la albúmina (banda de mayor tamaño) a un peso molecular relativo aproximado de 50 kDa no presente en los otros carriles (Fig. 3).



**Fig. 3. SDS-PAGE del líquido sinovial del equino. Carril 1: estándar de peso molecular; carril 2: control (+) con 10ng de HuCRT. Carril 9: LS + 10ng de HuCRT recombinante en donde aparece una banda (punto rojo) que no se encuentra presente en los otros carriles y correspondería a la CRT adicionada.**

En este ensayo, se aprecia que en el líquido sinovial, fluido biológico con una gran variedad de proteínas distintas, la CRT migra de manera diferente a lo que ocurre cuando ésta se encuentra pura. Esta variación en su migración puede ser atribuible a un efecto de “empuje” ejercido por la albúmina (67 kDa), debido a su

gran concentración en el líquido sinovial (Greve *et al.*, 1987) produciendo una distorsión en el gel de poliacrilamida.

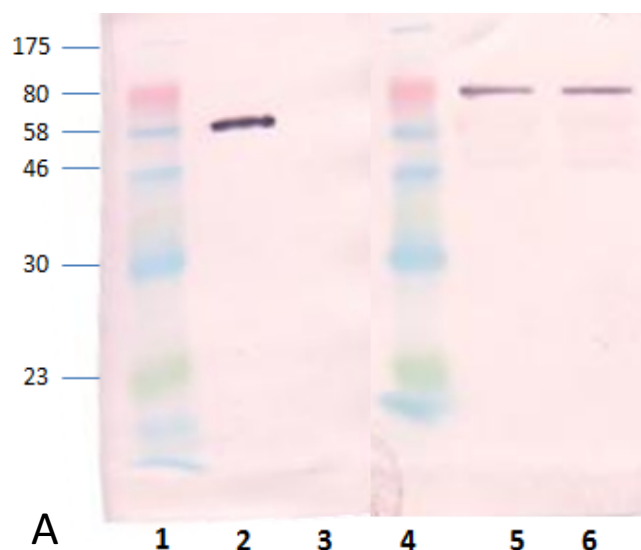
## 5.2 Inmuno electro transferencia (IWB)

Posterior a la separación de las proteínas del líquido sinovial del equino en geles de poliacrilamida al 12%, las proteínas fueron transferidas a una membrana de PVDF para la determinación antigénica de la CRT y a una membrana de nitrocelulosa para el ensayo funcional para determinar a la CRT.

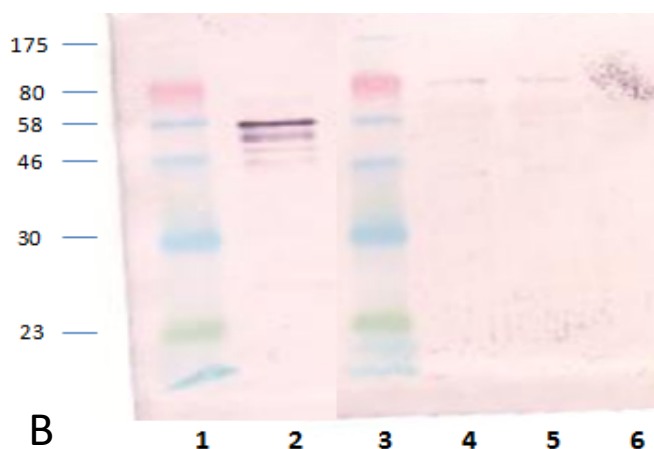
El análisis del IWB fue realizado de manera cualitativa mediante la determinación de la presencia o ausencia de bandas inmunoreactivas. De acuerdo a lo anterior, se pudo determinar inmunoreactividad a un peso molecular de aproximadamente 80 kDa. La reacción producida al utilizar el anticuerpo anti HuCRT fue mayor en relación a cuando se utilizó el anticuerpo anti TcCRT (Fig. 4A y 4B).

La situación antes descrita puede atribuirse principalmente, a que el humano presenta una mayor cercanía evolutiva con la especie equina que *Trypanosoma cruzi* con el equino, produciendo un mayor reconocimiento por parte del anticuerpo frente a epítopos de la proteína. El resultado anterior resulta contradictorio si se toma en cuenta el peso molecular de la CRT (aprox 60 kDa), el ensayo de reconstitución previamente realizado y la banda inmunoreactiva de aprox. 80 kDa.

Conforme a los resultados obtenidos, en un segundo IWB realizado, se aumentó la concentración del segundo anticuerpo (1/1000). Con esta modificación, se evidenció una doble inmunoreactividad al utilizar el segundo anticuerpo anti IgG de conejo de cabra (Sigma-Aldrich®). En este ensayo, se evidenciaron 2 bandas, la primera de ellas con un peso molecular aproximado de 80 kDa y una segunda banda de aproximadamente 50 kDa (Fig. 5).

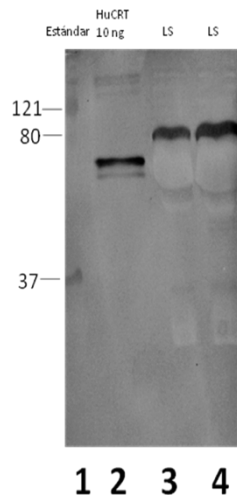


**Fig. 4A.** Carriles 1 y 4 Marcador de peso; carril 2: 10 ng rHuCRT; carriles 5 y 6: 10 µg de líquido sinovial equino; carril 3: no fue cargado. Fueron incubados con suero anti HuCRT (1/2000), seguido del 2º anticuerpo anti IgG de conejo conjugado con fosfatasa alcalina (1/2000) (Sigma ®).



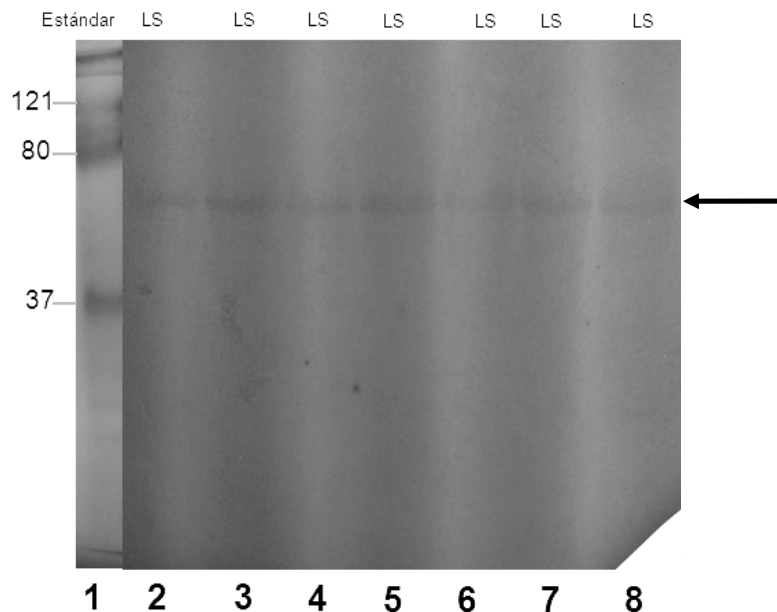
**Fig. 4B.** Carriles 1 y 3 Marcador de peso; carril 2: 10 ng rTcCRT; carriles 4, 5 y 6: 10 µg de líquido sinovial equino. Fueron incubados con suero anti TcCRT (1/2000), seguido del 2º anticuerpo anti IgG de conejo conjugado con fosfatasa alcalina (1/2000) (Sigma ®).

La banda de 80 kDa (mayor intensidad), fue identificada como transferrina mediante espectrometría de masas MALDI-TOF (Tabla 1, Fig. 8), por lo cual, se propuso la presencia de una reactividad cruzada entre el segundo anticuerpo utilizado y la transferrina del equino.



**Fig. 5. IWB del líquido sinovial del equino. Carril 1: estándar de peso molecular; carril 2: control (+) con 10ng de rHuCRT; carriles 3 y 4 fueron cargados con 10 $\mu$ g totales de proteína. Se reconoce fuertemente una banda dada por la transferrina (80kDa) y a su vez, aparece una banda de menor peso molecular, aparentemente distorsionada y “empujada” por la albúmina (50kDa).**

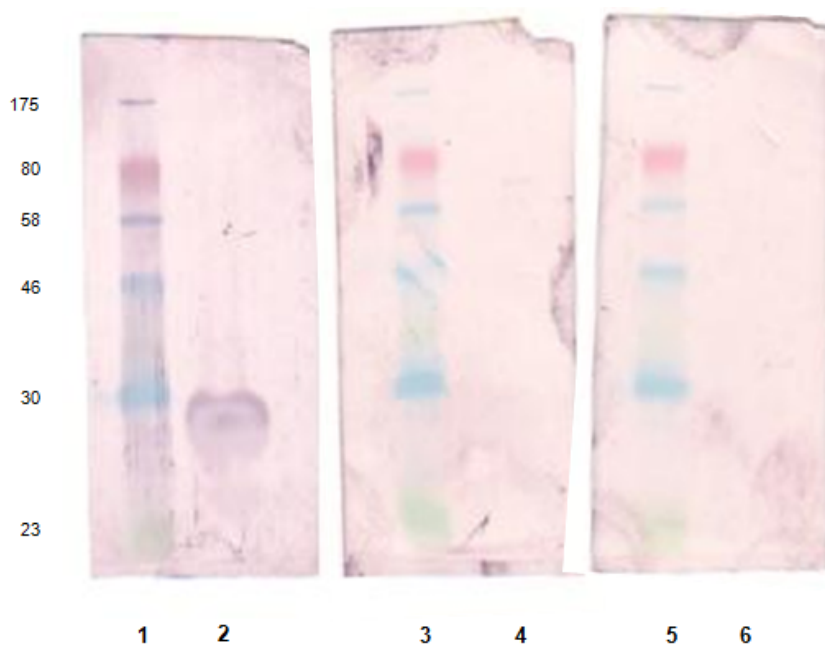
Dado estos resultados, se realizó nuevamente un IWB modificándose el segundo anticuerpo comercial (Dako ®). Se evidenció una banda inmunoreactiva de aproximadamente 50 kDa. Adicionalmente, no se produjo la reacción con la molécula de transferrina evidenciada anteriormente (Fig. 6).



**Fig. 6. IWB del líquido sinovial equino. Carril 1: Marcador de peso molecular. Carriles 2 al 8 (10 $\mu$ g de proteína total): LS equino. Membrana fué incubada con suero anti TcCRT (1/2000), seguido del 2° anticuerpo anti IgG de conejo conjugado con peroxidasa (1/2000) (Dako®). Se reconoce una banda a un peso molecular de aproximadamente 50 kDa. No existe reacción cruzada con otras proteínas.**

Este resultado, por una parte confirma que la reacción observada anteriormente (80 kDa) se debe a una reacción cruzada del segundo anticuerpo y no a una reacción del primer anticuerpo. También, se puede comenzar a presumir que la banda inmunoreactiva si correspondería a la CRT debido a que en primera instancia, existe un reconocimiento por parte del anticuerpo anti HuCRT y por otro lado, el peso molecular de la banda evidenciada, se correlaciona con el peso molecular de la banda observada en el gel de poliacrilamida cuando se realizó el ensayo de reconstitución. De acuerdo a lo anterior, antigénicamente los resultados son concordantes con la presencia de la molécula de EqCRT en el líquido sinovial.

Con el objeto de seguir recopilando información que permita caracterizar a esta proteína, se realizó un western blot para estudiar la potencial unión entre el C1q del complemento y la EqCRT del líquido sinovial. En los ensayos realizados, no se observó una reacción positiva cuando se utilizó el anticuerpo anti HuCRT ni tampoco para cuando se utilizó el anticuerpo anti TcCRT (Fig. 7).



**Fig. 7. IWB correspondiente al desafío entre C1q del complemento y CRT. Se cargaron 15 µg de C1q en carriles 2, 4 y 6. Carriles 1, 3 y 5 Marcador de peso; carril 2: se incubó con 200 µg de HuCRT como control (+); carriles 4 y 6 se incubaron con 300µg de proteína total de líquido sinovial. Todas las membranas fueron incubadas con 2º anticuerpo anti IgG de conejo conjugado con fosfatasa alcalina (1/1000).**

Como se puede desprender del IWB, la caracterización funcional de la presencia de la proteína CRT en el líquido sinovial equino no generó una reacción positiva lo que se puede atribuir principalmente a la baja concentración de la proteína en el mencionado fluido corporal, que aunque exista algún grado de unión entre ambas moléculas, ésta unión no es capaz de generar una señal que sea detectable mediante este ensayo molecular.

### **5.3 Espectrometría de masas del líquido sinovial del equino**

Las bandas inmunoreactivas fueron extraídas desde el gel de poliacrilamida para su análisis en el espectrómetro de masas. Los cromatogramas obtenidos fueron comparados con los disponibles en las bases de datos (Mascot y MS-Fit), lo que permitió identificar las proteínas inmunoreactivas. El análisis de la banda de mayor intensidad y de un peso molecular de 80 kDa, fue identificada como precursor de transferrina de acuerdo al cromatograma o huella peptídica obtenido (Tabla 1, Fig. 8).

Como ya se mencionó anteriormente, el reconocimiento de esta proteína y la generación de una señal positiva en el IWB se debió a una reactividad cruzada generada por el segundo anticuerpo utilizado. Conforme a lo anterior y con la finalidad de evitar la reacción cruzada del 2º anticuerpo, en los ensayos posteriores se utilizó un 2º anticuerpo comercial distinto (Dako ®), con el cual solo apareció una banda inmunoreactiva de aproximadamente 50 kDa. Consecuente a ello, resulta lógico pensar que el anticuerpo utilizado en el segundo ensayo, puede tener una mayor especificidad por el primer anticuerpo y no generar una reacción cruzada con otras proteínas por una unión inespecífica.

Con la obtención de la banda de un peso molecular aproximado de 50 kDa y con la información obtenida desde el ensayo de reconstitución, se procedió en enviar a espectrometría de masas la pequeña banda concordante con la presencia



de la molécula de CRT. Los resultados de este ensayo revelaron que la proteína con predominancia en ese trozo de gel correspondió a Albúmina (Tabla 2, Fig. 9).

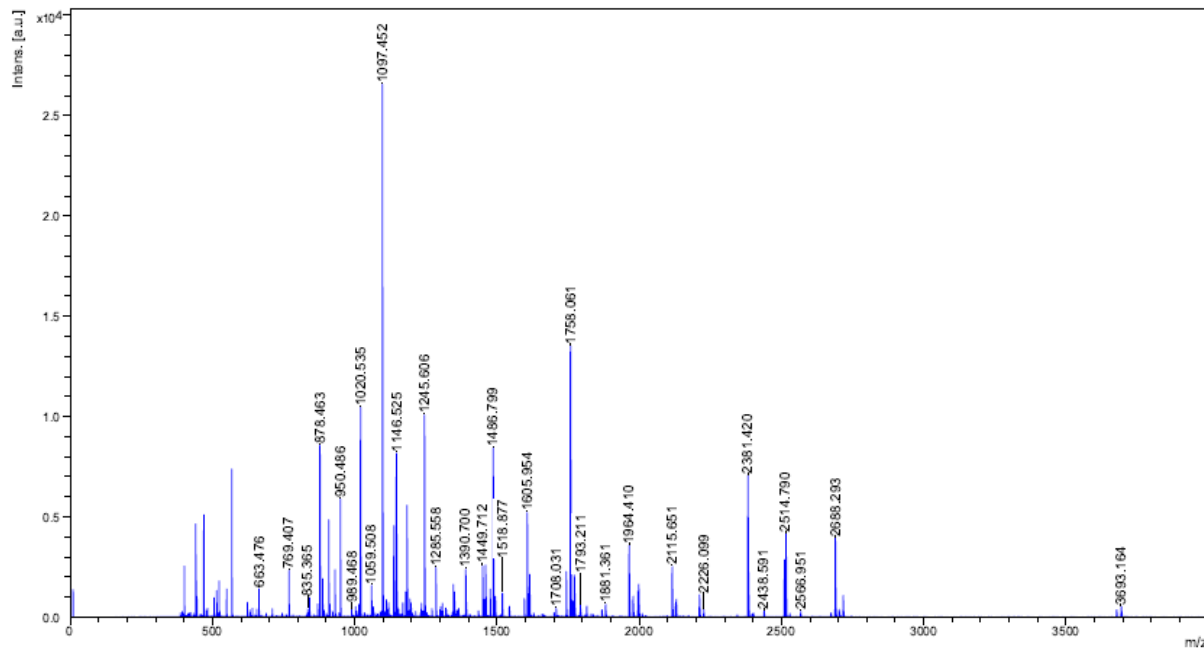
### Muestra Carril 3

| Base de datos                   | Identificación |
|---------------------------------|----------------|
| Mascot (All entries)            | -              |
| Mascot (Other mammalia)         | -              |
| MSFit (All)                     | -              |
| MSFit ( <i>Equus caballus</i> ) | -              |

### Muestra Carril 6

| Base de datos                   | Identificación                                                           |
|---------------------------------|--------------------------------------------------------------------------|
| Mascot (All entries)            | serotransferrin precursor [ <i>Equus caballus</i> ]                      |
| Mascot (Other mammalia)         | serotransferrin precursor [ <i>Equus caballus</i> ]                      |
| MSFit (All)                     | serotransferrin precursor [ <i>Equus caballus</i> ]                      |
| MSFit ( <i>Equus caballus</i> ) | LipA and NB-ARC domain-containing protein [ <i>Arthroderma gypseum</i> ] |
| MSFit ( <i>Equus caballus</i> ) | serotransferrin precursor [ <i>Equus caballus</i> ]                      |

**Tabla 1. Resultado del análisis mediante espectrometría de masas de la banda de 80kDa obtenida desde el SDS-PAGE identificada en el IWB.**



**Fig. 8. Espectro de las señales obtenidas mediante espectrometría de masas (MALDI-TOF) de la banda de 80kDa obtenida desde el SDS-PAGE identificada en el IWB.**

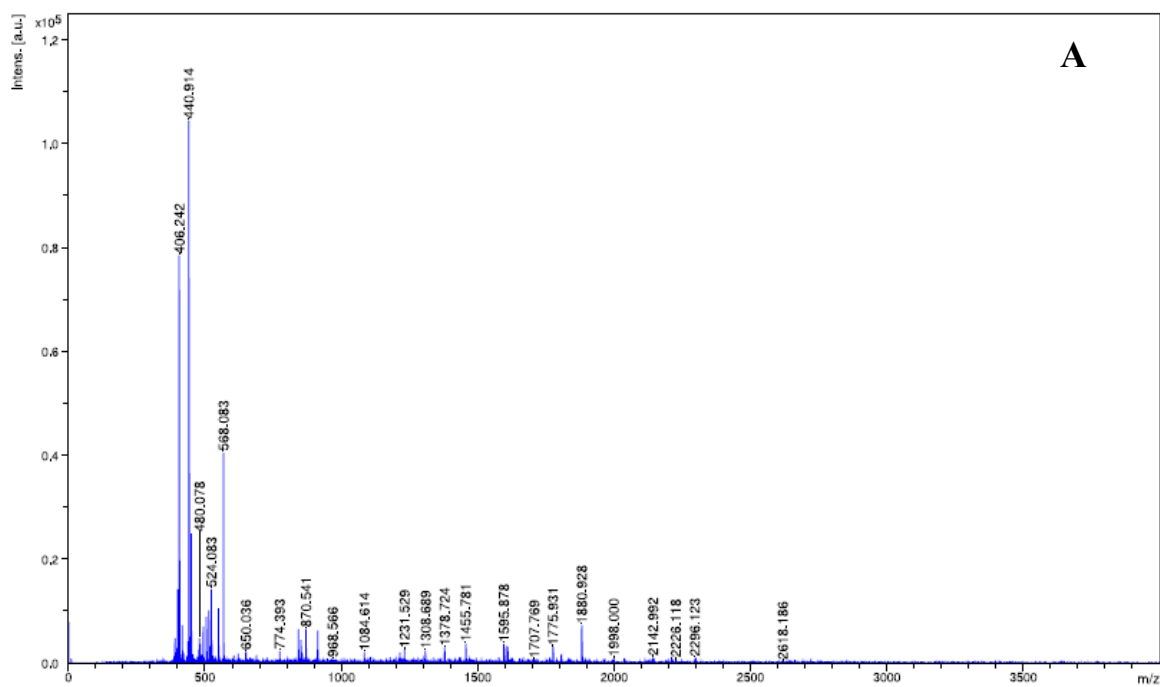
| Muestra C3                      |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |
|---------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Bases de datos                  | Identificación                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |
| Mascot (All entries)            | Serum albumin [ <i>Equus caballus</i> ]<br>Serum albumin [ <i>Equus asinus</i> ]                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |
| Mascot (Mammalia)               | Serum albumin [ <i>Equus caballus</i> ]<br>Serum albumin [ <i>Equus asinus</i> ]                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |
| MSFit (All)                     | Serum albumin [ <i>Equus caballus</i> ]                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |
| MSFit (Mammals)                 | Serum albumin [ <i>Equus caballus</i> ]<br>Putative RNA-binding protein 15 [ <i>Homo sapiens</i> ]<br>Inactive ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 53 [ <i>Mus musculus</i> ]<br>Glutamate receptor-interacting protein 2 [ <i>Rattus norvegicus</i> ]                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |
| MSFit ( <i>Equus caballus</i> ) | Serum albumin [ <i>Equus caballus</i> ]                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |
| Muestra C7+8                    |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |
| Bases de datos                  | Identificación                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |
| Mascot (All entries)            | Serum albumin [ <i>Equus caballus</i> ]<br>Serum albumin [ <i>Equus asinus</i> ]                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |
| Mascot (Mammalia)               | Serum albumin [ <i>Equus caballus</i> ]<br>Serum albumin [ <i>Equus asinus</i> ]                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |
| MSFit (All)                     | Serum albumin [ <i>Equus caballus</i> ]                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |
| MSFit (Mammals)                 | Serum albumin [ <i>Equus caballus</i> ]<br>Inactive ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 53 [ <i>Mus musculus</i> ]<br>DNA ligase 3 [ <i>Mus musculus</i> ]                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |
| MSFit ( <i>Equus caballus</i> ) | Serum albumin [ <i>Equus caballus</i> ]                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |
| Muestra C9                      |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |
| Bases de datos                  | Identificación                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |
| Mascot (All entries)            | Serum albumin [ <i>Equus caballus</i> ]<br>Serum albumin [ <i>Equus asinus</i> ]                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |
| Mascot (Mammalia)               | Serum albumin [ <i>Equus caballus</i> ]<br>Serum albumin [ <i>Equus asinus</i> ]                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |
| MSFit (All)                     | Serum albumin [ <i>Equus caballus</i> ]<br>Glutamate receptor-interacting protein 2 [ <i>Rattus norvegicus</i> ]<br>DNA replication licensing factor Mcm6 [ <i>Drosophila pseudoobscura</i> ]<br>Probable translation initiation factor IF-2 [ <i>Pyrococcus horikoshii</i> ]<br>Ankyrin [ <i>Homo sapiens</i> ]<br>Signal transducer and activator of transcription 4 [ <i>Mus musculus</i> ]<br>Elongation factor 2 [ <i>Pyrobaculum neutrophilum</i> ]<br>UvrABC system protein A [ <i>Zymomonas mobilis</i> ]<br>Valine--tRNA ligase [ <i>Photorhabdus luminescens</i> ] |
| MSFit (Mammals)                 | Serum albumin [ <i>Equus caballus</i> ]                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |
| MSFit ( <i>Equus caballus</i> ) | Serum albumin [ <i>Equus caballus</i> ]<br>Alpha-1-antitrypsin 2 [ <i>Equus caballus</i> ]                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |

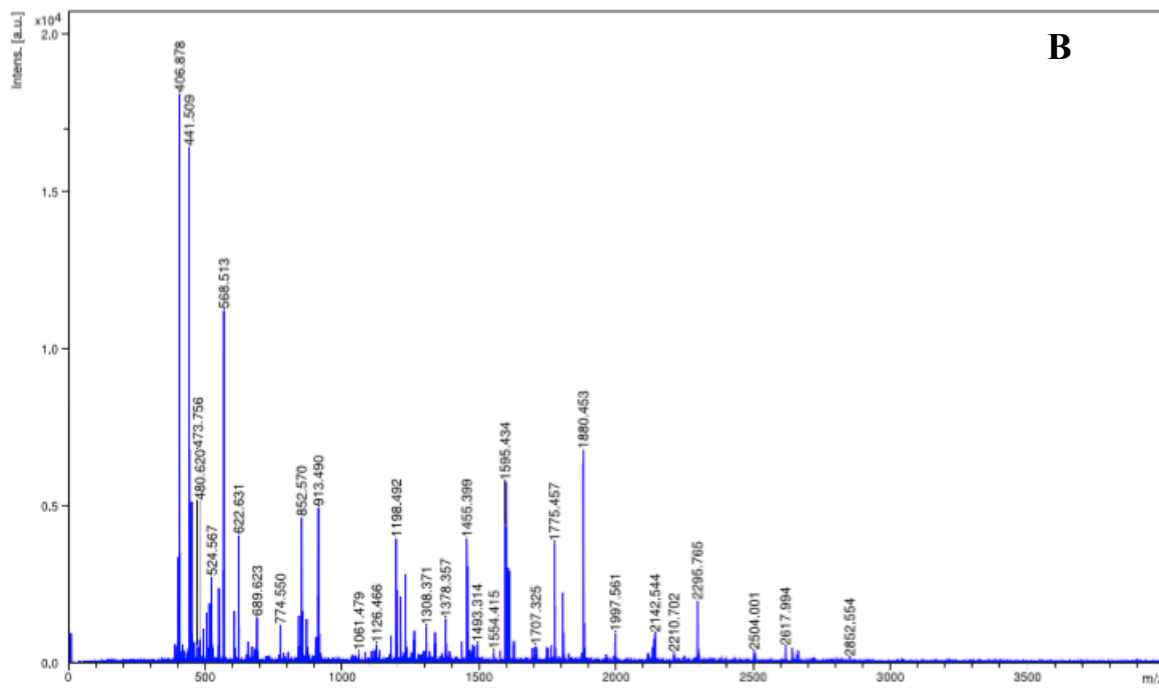
**Tabla 2. Resultado del análisis mediante espectrometría de masas de la banda de 50kDa obtenida desde el SDS-PAGE identificada en el IWB. Incluso la muestra obtenida desde el carril 9, en donde se agregó la rHuCRT, fue identificada como albumina.**

Esta situación no significa que la proteína en estudio no se encuentra presente y se atribuyen estos resultados a que en primer lugar, la migración de CRT y albúmina en el gel de poliacrilamida es muy cercana debido a su similar peso molecular, condición que hace difícil lograr una adecuada separación entre ellas al realizar el SDS-PAGE. En segundo lugar, la concentración de la Albúmina es muy elevada, distorsionando y enmascarando frecuentemente las proteínas cercanas a

ella. Consecuente con lo anterior, se presume que a pesar de obtener el trozo de gel con la banda adecuada, ésta se encuentra “contaminada” con albúmina lo que se traduce en los resultados obtenidos. Lo antes mencionado queda de manifiesto al comparar la huella peptídica de las diferentes muestras obtenidas desde el gel de poliacrilamida ya que si bien es cierto, todas fueron identificadas como albúmina, la muestra del carril 9, en donde se agregó HuCRT recombinante presenta un espectro levemente diferente al obtenido desde los otros carriles (Fig. 9).

Lamentablemente, el nuevo análisis de espectrometría de masas de la banda inmunoreactiva, no fue confirmatorio para la CRT equina, por lo tanto, otros ensayos deben ser diseñados para lograr obtener una muestra más pura de la proteína para posteriormente ser procesada mediante espectrometría de masas.





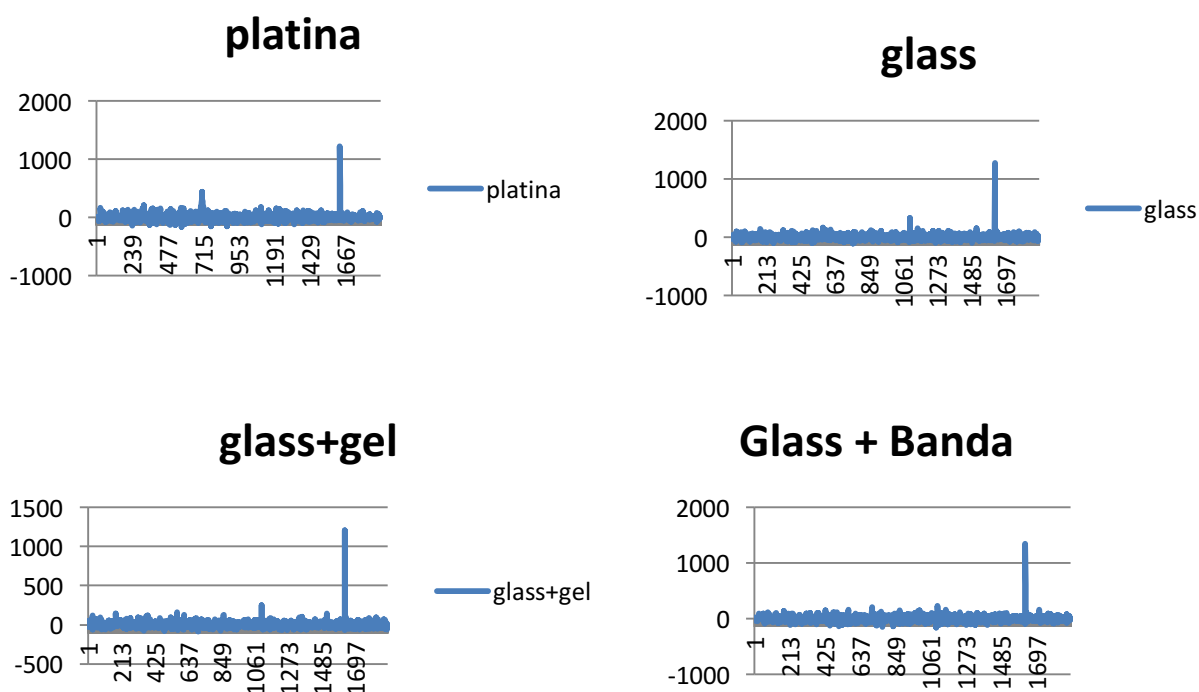
**Fig. 9. Espectro de las señales obtenidas mediante espectrometría de masas (MALDI-TOF) de la banda de 50kDa obtenida desde el SDS-PAGE identificada en el IWB en el carril 3 (A) y carril 9 (B).**

La falta de identificación de algunas muestras puede tener varias causas entre ellas: (i) una proteólisis incompleta (que se ha descrito para proteínas con alto contenido de prolina o para algunas proteínas hidrofóbicas) y que se traduce generalmente en la ausencia de señales sobre  $m/z$  2000 en el espectro de masas, (ii) contaminación con queratina y que se observa en el tratamiento de los datos en el programa Peak Erazor, (iii) presencia de modificaciones post-traduccionales no indicadas en el análisis de bases de datos, (iv) ausencia de proteína similares en las bases de datos y (v) mezcla de proteínas. En la inspección de los espectros se observó la presencia de señales sobre  $m/z$  2000 descartando una proteólisis incompleta; el análisis en Peak Erazor detectó bajo contenido de contaminación con queratina; la presencia de modificaciones post-traduccionales no es verificable pero las proteínas no presentan un alto contenido de estas como para que las bases de datos no detecten péptidos sin modificar. No es posible establecer la ausencia de

proteínas similares en la base de datos; pero aparentemente la causa más probable de la ausencia de identificación correspondería a una mezcla de proteínas.

## 5.4 Espectroscopia de Raman

Al realizar las diferentes mediciones espectroscópicas a las muestras de HuCRT pura, gel puro y gel con diferentes proteínas, se evidenció que los espectros generados no fueron diferentes entre sí, y no se observó un patrón espectral que pudiese corroborar la presencia de CRT (Fig. 10).



**Fig. 10. Análisis espectroscópico obtenido del gel de poliacrilamida mediante espectroscopia de Raman.**

Lo anterior refleja que la espectroscopia de Raman no es lo suficientemente sensible para poder detectar y diferenciar dos proteínas entre sí con la longitud de onda utilizada.

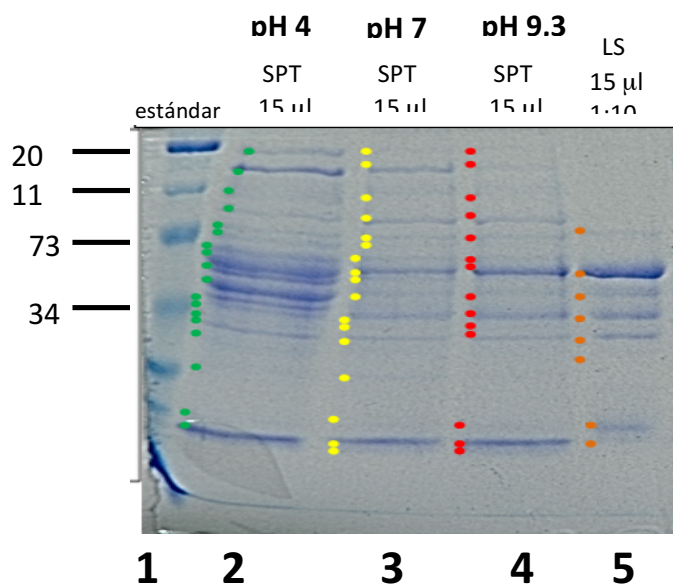
## **5.5 Modificación del patrón electroforético de las proteínas del líquido sinovial equino (Fueyo, 2015)**

Con la finalidad de modificar del patrón electroforético a través de la disminución de la concentración de albúmina y aumento de la concentración de las proteínas menos abundantes, se sometió el LS equino al protocolo de bibliotecas de ligandos combinatoriales a distintas condiciones de pH. Así en el solubilizado post tratamiento, la concentración de proteína fue de 8,5; 6,2 y 5,2 mg/ml de proteína para pH 4,0; 7,0 y 9,3 respectivamente

En el primer gel de poliacrilamida (Fig. 11), el primer carril corresponde a un estándar de peso molecular. Del carril dos al cuatro, corresponden a cargas de 15  $\mu$ L (CVT=carga de volumen total) de líquido sinovial equino tratado con Proteominer a diferentes pH (4,0; 7,0 y 9,3 para los carriles dos, tres y cuatro, respectivamente). El quinto carril corresponde a una carga de líquido sinovial sin tratar, en dilución 1:10. La carga de proteína total (CPT) para cada carril corresponde a 96, 69, 58,5 y 6,2  $\mu$ g respectivamente.

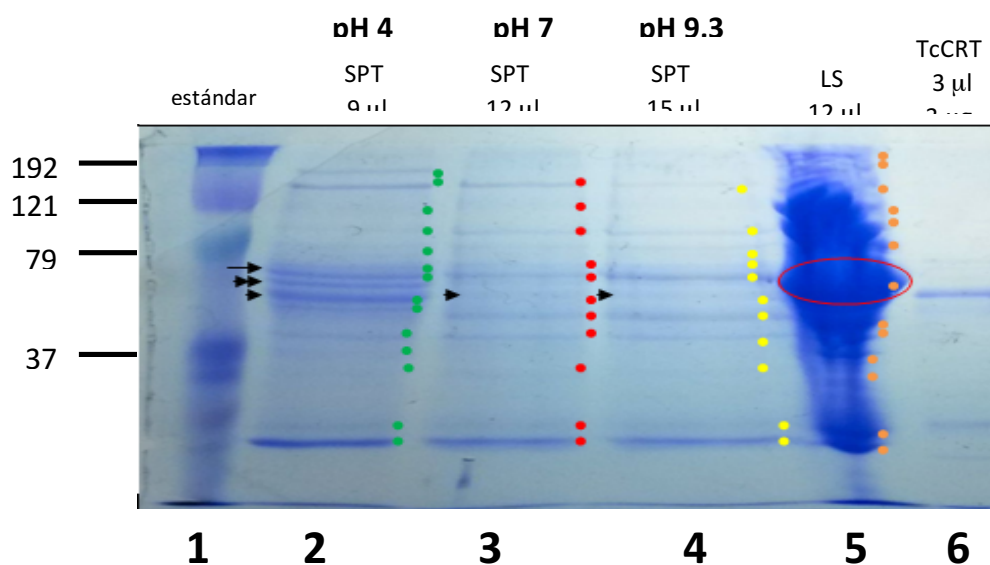
En cuanto al cambio de patrón electroforético a distintos pH, es evidente que hay una mayor cantidad de bandas, y de mayor definición, en el carril correspondiente a pH 4,0.

Ejemplo de ello es la segunda banda del carril cinco, que corresponde a la primera banda aparente de los carriles tres y cuatro, donde a medida que el pH se alcaliniza, la banda se hace menos definida. Por ende, se puede evidenciar que existe la expresión diferencial de proteínas entre los solubilizados post-tratamiento de los distintos pH.



**Fig. 11. Electroforesis del líquido sinovial equino que incluye capturas a pH extremos y diferente solución de resuspensión. Comparación a volúmenes iguales.**

Para evidenciar la expresión diferencial de bandas en el gel electroforético entre el solubilizado post-tratamiento y una muestra control de líquido sinovial equino sin tratar, se corrieron alícuotas que contuvieran la misma concentración total de proteína. El resultado se muestra en la Fig. 12.



**Fig. 12. Electroforesis de líquido sinovial equino que incluye las variaciones al protocolo inicial, con capturas a pH extremos y diferente solución de resuspensión. Comparación a concentraciones proteicas similares (58 µg).**

El primer carril corresponde a un marcador de peso molecular (estándar). El carril número 5 corresponde a la carga de líquido sinovial (LS) sin diluir, en una concentración de proteína de 6,6 mg/mL. Del segundo al cuarto carril corresponde a líquidos sinoviales tratados con Proteominer, a diferentes pH (4,0; 7,0 y 9,3 respectivamente). El último carril de la imagen corresponde a una alícuota de Calreticulina (CRT) recombinante de *Trypanosoma cruzi*. El círculo rojo corresponde a la gran banda de albúmina del líquido sinovial sin tratar. La flecha corresponde a la banda de albúmina en las muestras tratadas con Proteominer. Las cabezas de flecha corresponden a bandas ubicadas bajo la albúmina aproximadamente entre 50-70 kDa de masa molecular.

Resulta importante destacar que en los carriles correspondientes a pH 7,0 y 9,3 se obtuvo una menor cantidad de bandas que la muestra control, sin embargo, fue posible evidenciar una banda bajo la albúmina, entre los 60 y 70 kDa aproximadamente (cabeza de flecha), quizás enmascarada en la muestra control. Esto es aún más evidente en el carril correspondiente a pH 4,0, donde se evidencia otra banda adicional (doble cabeza de flecha), bajo la banda de albúmina y sobre la banda adicional antes descrita. Puesto que ya se había evidenciado con anterioridad bandas adicionales bajo la albúmina en el gel de la Fig. 11; para la elaboración del gel de la Fig. 12 se incorporó al último carril, una proteína pura de un peso molecular levemente menor a la albúmina pero que se encontrara dentro del rango que abarca la gran banda de albúmina del líquido sinovial sin tratamiento. Calreticulina recombinante de *Trypanosoma cruzi* fue la elegida debido a que, en geles SDS corre entre los 60 y 63 kDa (Michalak *et al.*, 1992). Las bandas antes descritas parecen migrar junto a la calreticulina, por lo que se infiere que podrían tener un peso molecular semejante, y por ende, corresponderían a proteínas enmascaradas por la banda de albúmina.

Conforme a los resultados obtenidos en el último gel de electroforesis (Fig. 12), las bandas obtenidas por debajo de la albúmina en el carril 2 (pH 4,0) (cabeza de flecha y doble cabeza de flecha). Estas bandas fueron cortadas para ser



analizadas mediante espectrometría de masas según el protocolo utilizado para los análisis previos. Estas bandas fueron seleccionadas debido a que comparten un peso molecular similar a la banda obtenida en el carril 6 de la Fig. 12 que corresponde a CRT pura y a los resultados del IWB obtenidos previamente a estos ensayos en donde se detectó inmunoreacción al utilizar anticuerpos anti HuCRT.

El análisis de la espectrometría de masas evidenció que las bandas obtenidas corresponden respectivamente a alfa-1-antiproteasa 2 (doble cabeza de flecha) y antitrombina-III (cabeza de flecha).

| <b>Muestra C2-1</b>     |                                                                    |
|-------------------------|--------------------------------------------------------------------|
| <i>Base de datos</i>    | <i>Identificación</i>                                              |
| Mascot (All entries)    | Alpha-1-antiproteinase 2-like isoform X1 [ <i>Equus caballus</i> ] |
| Mascot (Other mammalia) | Alpha-1-antiproteinase 2-like isoform X1 [ <i>Equus caballus</i> ] |
| <b>Muestra C2-2</b>     |                                                                    |
| <i>Base de datos</i>    | <i>Identificación</i>                                              |
| Mascot (All entries)    | Antithrombin-III isoform X2 [ <i>Equus caballus</i> ]              |
| Mascot (Other mammalia) | Antithrombin-III isoform X2 [ <i>Equus caballus</i> ]              |
| <b>Muestra C7-1</b>     |                                                                    |
| <i>Base de datos</i>    | <i>Identificación</i>                                              |
| Mascot (All entries)    | Calreticulin, putative [ <i>Trypanosoma cruzi</i> ]                |

**Tabla 3. Análisis de identificación mediante huella peptídica del carril nº2 de las bandas ►► y ► en la Fig. 13**

Finalmente, si bien es cierto, con el diseño experimental planteado para este estudio no se pudo corroborar a cabalidad la presencia de la proteína CRT en el líquido sinovial de la especie equina, si se logró detectar una banda inmuno reactiva mediante IWB lo cual da claros indicios de que la molécula si está presente en el líquido sinovial equino y por lo tanto, más estudios son necesarios para lograr su confirmación definitiva y estudiar cual es su rol en la homeostasis articular.

## 6. CONCLUSIONES

Se detectó la presencia de Calreticulina en el LS equino a través de la inmunoreacción positiva detectada principalmente mediante el anticuerpo anti HuCRT.

La albúmina debido a su similar peso molecular es un problema para la correcta identificación de la proteína en estudio.

La modificación del patrón electroforético es una metodología que sin duda ayuda a identificar proteínas que inicialmente no fueron evidenciadas en el SDS-PAGE

La concentración de CRT en el líquido sinovial es muy baja para ser evidenciada mediante SDS-PAGE y se requiere un nuevo diseño experimental para aislarla de mejor manera.

Consecuente con lo anterior, el experimento realizado para evaluar su unión a C1q del complemento debe ser modificado para poder detectar una inmunoreacción.

De acuerdo a estos resultados, existe evidencia científica que la CRT si se encuentra presente en el líquido sinovial equino sin embargo, más estudios son necesarios para lograr su identificación definitiva y de esta manera estudiar su rol en la homeostasis articular. Teniendo en cuenta que la molécula equina puede ser reconocida por el anticuerpo humano, se podría realizar un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) para su identificación o purificarla de precipitados de sulfato de amonio mediante dietilaminoetil-sephadex y ensayos cromatográficos con hidroxapatita como se ha reportado en humanos.

## 7. BIBLIOGRAFÍA

1. **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 inhibit its interaction with the first component of human complement. *Biol Res* 38: 187-195.
2. **ANGOSTO, M.C.; ÁLVAREZ-GÓMEZ, J.A.** 2010. Metaloproteinasas, matriz extracelular y cáncer. *An R Acad Nac Farm* 76 (1): 59-84.
3. **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.
4. **BASU, S.; SRIVASTAVA, P.K.** 1999. Calreticulin, a peptide-binding chaperone of the endoplasmic reticulum, elicits tumor- and peptide-specific immunity. *J Exp Med* 189: 797-802.
5. **BERTONE, A.L.; PALMER, J.L.; JONES, J.** 2001. Synovial fluid cytokines and eicosanoides as markers of joint disease in horses. *Vet Surg* 30 (6): 528-538.
6. **BIRKEDAL-HANSEN, H.; MOORE, W.G.I.; BODDEN, M.K.; WINDSOR, L.J.; BIRKEDAL-HANSEN, B.; DECARLO, A.; ENGLER, J.A.** 1993. Matrix metalloproteinases: a review. *Crit Rev Oral Biol Med* 4 (2): 197-250.
7. **BOOTH, C.; KOCH, G.L.** 1989. Perturbation of cellular calcium induces secretion of luminal ER proteins. *Cell* 59: 729-737.
8. **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.
9. **CARMONA, U.; GIRALDO-MURILLO, C.** 2007. Pathobiology and medical treatment of the osteoarthritis in the horse. *Vet Zootec.* 1 (1): 60-73.
10. **CARON, J.** 2011. Osteoarthritis **En:** *Diagnosis and management of lameness in the horse.* 2<sup>nd</sup> ed. Saunders. USA. Pp. 655-668.

11. **CHEN, F.; HAYES, P.M.; MULROONEY, D.M.; PAN, A.** 1994. Identification and characterization of cDNA clones encoding plant calreticulin in barley. *Plant Cell* 6: 835-843.
12. **DEDHAR, S.; RENNIE, P.S.; SHAGO, M.; HAGESTEIJN, C.Y.; YANG, H.; FILMUS, J.; HAWLEY, R.G.; BRUCHOVSKY, N.; CHENG, H.; MATUSIK, R.J.; GIGUËRWE, V.** 1994. Inhibition of nuclear hormone receptor activity by calreticulin. *Nature* 367:480-483.
13. **DRESSELHAUS, T.; HAGEL, C.; LÖRZ, H.; KRANZ, E.** 1996. Isolation of a full-length cDNA encoding calreticulin from a PCR library of in vitro zygotes of maize. *Plant Mol Biol* 31 (1): 23-34.
14. **DUPUIS, M.; SCHAERER, E.; KRAUSE, K.H.; TSCHOPP, J.** 1993. The calcium-binding protein calreticulin is a major constituent of lytic granules in cytolytic T lymphocytes. *J Exp Med* 177: 1-7.
15. **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.
16. **FERREIRA, V.; MOLINA, M.C.; VALCK, C.; ROJAS, A.; AGUILAR, L.; RAMIREZ, G.; SCHWAEBLE, W.; FERREIRA, A.** 2004a. Role of calreticulin from parasites in its interaction with vertebrate hosts. *Mol Immunol* 40 (17): 1279-1291.
17. **FERREIRA, V.; VALCK, C.; SÁNCHEZ, G.; GINGRAS, A.; TZIMA, S.; MOLINA, M.C.; SIM, R.; SCHWAEBLE, W.; FERREIRA, A.** 2004b. The classical activation pathway of the human complement system is specifically inhibited by calreticulin from *Trypanosoma cruzi*. *J Immunol* 172: 3042-3050.
18. **FERREIRA, V.; MOLINA, M.C.; SCHWAEBLE, W.; LEMUS, D.; FERREIRA, A.** 2005. Does *Trypanosoma cruzi* calreticulin modulate the complement system and angiogenesis?. Abstract. *Trends Parasitol* 21 (4): 169-174.
19. **FLIEGEL, L.; BURNS, K.; MACLENNAN, D.H.; REITHMEIER, R.A.; MICHALAK, M.** 1989. Molecular cloning of the high affinity calcium-binding protein (Calreticulin) of skeletal muscle sarcoplasmic reticulum. *J Biol Chem* 264 (36): 21522-21528.
20. **FORTIER, L.A.; MOHAMMED, H.O.; LUST, G.; NIXON, A.J.** 2004. Insulin-like growth enhances cell-based repair of articular cartilage. *J Bone Joint Surg* 84 (2): 276-288.

21. **FRISBIE, D.D.; SANDLER, E.A.; TROTTER, G.W.; MCILWRAITH, C.W.** 2000. Metabolic and mitogenic activities of insulin-like growth factor-1 in interleukin-1-conditioned equine cartilage. *Am J Vet Res* 61 (4): 436-41.
22. **Fueyo, P.** 2015. Modificación del patrón electroforético de las proteínas del líquido sinovial equino mediante el uso de bibliotecas de ligandos combinatoriales. *Memoria de título*. Santiago, Chile. Universidad de Chile, Fac. Cs. Veterinarias y Pecuarias. Pp. 31.
23. **GARDAI, S.; MCPHILIPS, K.; FRASCH, S.C.; JANSSEN, W.; STAREFELDT, A.; MURPHY-ULLRICH, J.; BRATTON, D.; OLDENBORG, P.A.; MICHALAK, M.; HENSON, P.** 2005. Cell-surface calreticulin initiates clearance of viable or apoptotic cells through *trans*-activation of LRP on the phagocyte. *Cell* 123: 321-334
24. **GATICA, M.D.** 2009. Estudio de moléculas chaperonas humanas involucradas en la expresión en superficie de proteínas MICA y MICB en células de melanoma. *Memoria de título*. Santiago, Chile. Universidad de Chile, Fac. Cs. Químicas y Farmacéuticas. Pp. 75.
25. **GHIRAN, I.; TYAGI, S.R.; KLINKSTEIN, L.B.; NICHOLSON-WELLER, A.** 2002. Expression and function of C1q receptors and C1q binding proteins at the cell surface. Abstract. *Immunobiology* 205 (4-5): 407-420.
26. **GOLD, L.I.; RAHMAN, M.; BLECHMAN, K.M.; GREIVES, M.R.; CHURGIN, S.; MICHAELS, J.; CALLAGHAN, M.J.; CARDWELL, N.L.; POLLINS, A.C.; MICHALAK, M.; SIEBERT, J.W.; LEVINE, J.P.; GURTNER, G.C.; NANNEY, L.B.; GALIANO, R.D.; CADACIO, C.L.** 2006. Overview of the role for calreticulin in the enhancement of wound healing through multiple biological effects. *JIDSP* 11: 57-65.
27. **GOLD, L.I.; EGGLETON, P.; SWEETWYNE, M.T.; VAN DUYN, L.; GREIVES, M.; NAYLOR, S.M.; MICHALAK, M.; MURPHY-ULLRICH, E.** 2010. Calreticulin: non-endoplasmic reticulum functions in physiology and disease. *FASEB J* 24: 665-683.
28. **GOLD, L.I.; MICHALAK, M.** 2013. Therapeutic and cosmetic uses and applications of calreticulin. *United States Patent Application Publication*, US 2013/0159285 A1: 1-43.
29. **GONZALEZ-ÁVILA, G.; GONZALEZ, A.; DELGADO, J.; GUTIERREZ-GONZALEZ, L.** 2009. Participación de las metaloproteasas de matriz en la progresión del cáncer. *Rev Inst Nal Enf Resp Mex* 22 (4): 328-336.

30. **GREVE, P.; WITTWER, F.; WEGMANN, E.; BÖHMWALD, H.** 1987. Synovial fluid characteristics of the carpus intermedium in Chilean crossbreed saddle horses. *Av Cs Vet* 2 (2): 88-93.
31. **HASHIMOTO, S.; SETAREH, M.; OCHS, R.; LOTZ, M.** 1997. FAS/FAS ligand expression and induction of apoptosis in chondrocytes. *Arthritis Rheum* 40 (10): 1749-1755.
32. **HAWN, T.R.; TOM, T.D.; STRAND, M.** 1993. Molecular cloning and expression of SmlrV1, a *Schistosoma mansoni* antigen with similarity to Calnexin, Calreticulin, and OvRaL1. *J Biol Chem* 268 (11): 7692-7698.
33. **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.
34. **JOHNSON, C.A.; KLESHCHENKO, Y.Y.; IKEJIANI, A.O.; UDOKO, A.N.; CARDENAS, T.; PRATAP, S.; DUQUETTE, M.A.; LIMA, M.F.; LER, J.L.; VILLALTA, F.; NDE, P.N.** 2012. Thrombospondin-1 interacts with *Trypanosoma cruzi* surface calreticulin to enhance cellular infection. *Plos ONE* 7 (7): e40614.
35. **KIM, D.Y.; TAYLOR, H.W.; MOORE, R.M.; PAULSEN, D.B.; CHO, D.Y.** 2003. Articular chondrocyte apoptosis in equine osteoarthritis. *Vet J* 166 (1): 52-57.
36. **KOZLOV, G.; POCANSCHI, C.L.; ROSENAUER, A.; BASTOS-ARISTIZABAL, S.; GORELIK, A.; WILLIAMS, D.; GEHRING, K.** 2010. Structural basis of carbohydrate recognition by Calreticulin. *J Biol Chem* 285: 38612-38620.
37. **LABRIOLA, C.; CAZZULO, J.J.; PARODI, A.J.** 1999. *Trypanosoma cruzi* Calreticulin is a lectin that binds monoglucosylated oligosaccharides but no protein moieties of glycoproteins. *Mol Biol Cell* 10: 1382-1394.
38. **LASTA, G.E.** 1998. Revisión bibliográfica de líquido Sinovial. Nuevos aspectos relacionados a los proteoglicanos y glicosaminoglicanos. *Analecta Vet* 18 (1-2): 83-98.
39. **LEACH, D.; CALDWELL, S.; FERGUSON, J.** 1998. Ultrastructural study of synovial membrane from the antebrachio-carpal joint of calves. *Acta Anat* 133 (3): 234-246.
40. **LIU, N.; FINE, R.E.; JOHNSON, R.J.** 1993. Comparison of cDNAs from bovine brain coding for two isoforms of calreticulin. *Biochem Biophys Acta* 1202 (1): 70-76.

41. **LISIGNOLI, G.; GRASSI, F.; ZINI, N.; TONEGUZZI, S.; PIACENTINI, A.; GUIDOLIN, D.; BEVILACQUA, C.; FACCHINI, A.** 2001. Anti-Fas-induced apoptosis in chondrocytes reduced by hyaluronan. Evidence for CD44 and CD54 (intercellular adhesion molecule 1) involvement. *Arthritis Rheum* 44 (8): 1800-1807.
42. **LÓPEZ, N.C.** 2008. Mecanismos antiangiogénicos de calreticulina de *Trypanosoma cruzi*. *Tesis Doctoral*. Santiago, Chile. Universidad de Chile, Fac. Cs. Químicas y Farmacéuticas. Pp. 108.
43. **LÓPEZ-ARMADA, M.J.; VAAMONDE-GARCÍA, C.; CARAMÉS, B.; LIRES-DEAN, M.; CILLERO-PASTOR, B.; BLANCO, F.J.** 2007. Evidence of inflammatory mechanisms in osteoarthritis. *Reumatol Clin* 3 (3): 23-27.
44. **MICHALAK, M.; MILNER, R.; BURNS, K.; OPAS, M.** 1992. Calreticulin. *Biochem J* 285: 681-692.
45. **MICHALAK, M.; CORBETT, F.; MESAELI, N.; NAKAMURA, K.; OPAS, M.** 1999. Calreticulin: one protein, one gene, many functions. *Biochem J* 344: 281-292.
46. **MOBASHERI, A.; VANNUCCI, S.J.; BONDY, C.A.; CARTER, S.D.; INNES, J.F.; ARTEAGA, M.F.; TRUJILLO, E.; FERRAZ, I.; SHAKIBAEI, M.; MARTÍN-VASALLO, P.** 2002. Glucose transport and metabolism in chondrocytes: a key to understanding chondrogenesis, skeletal development and cartilage degradation in osteoarthritis. *Histol Histopathol* 17 (4): 1239-1267.
47. **NI, M.; WEI, W.; WANG, Y.; ZHANG, N.; DING, H.; SHEN, C.; ZHENG, F.** 2013. Serum levels of Calreticulin in correlation with disease activity in patients with rheumatoid arthritis. *J Clin Immunol* 33 (5): 947-953.
48. **OLADIRAN, A.; BELOSEVIC, M.** 2010. *Trypanosoma carassii* calreticulin binds host complement component C1q and inhibits classical complement pathway-mediated lysis. Abstract. *Dev Comp Immunol* 34 (4): 396-405.
49. **OPAS, M.; SZEWCZENKO-PAWLIKOWSKI, M.; JASS, G.K.; MESAELI, N.; MICHALAK, M.** 1996. Calreticulin modulates cell adhesiveness via regulation of vinculin expression. *J Cell Biol* 135: 1913-1923.
50. **PERSSON, S.; ROSENQUIST, M.; SOMMARIN, M.** 2002. Identification of a novel calreticulin isoform (CRT2) in human and mouse. *Gene* 297 (1-2): 151-158.
51. **PIKE, S.E.; YAO, L.; JONES, K.D.; CHERNEY, B.; APPELLA, E.; SAKAGUCHI, K.; NAKHASI, H.; TERUYA-FELDSTEIN, J.; WIRTH, P.;**

- GUPTA, G.; TOSATO, G.** 1998. Vasostatin, a calreticulin fragment, inhibits angiogenesis and suppresses tumor growth. *J Exp Med* 188: 2349-2356.
52. **PIKE, S.E.; YAO, L.; SETSUDA, J.; JONES, K.D.; CHERNEY, B.; APPELLA, E.; SAKAGUCHI, K.; NAKHASI, H.; ATREYA, C.D.; TERUYA-FELDSTEIN, J.; WIRTH, P.; GUPTA, G.; TOSATO, G.** 1999. Calreticulin and calreticulin fragments are endothelial cell inhibitors that suppress tumor growth. *Blood* 94 (7): 2461-2468.
53. **RASERA, L.; MASSOCO, C.; FOZ FILHO, R.; BACCARIN, R.** 2006. Determination of tumor necrosis factor (TNF) levels in the synovial fluid of metacarpophalangeal joints in polo ponies. *Proceedings of the 9th Congress of the WEVA*. Marrakech. Pp. 159-160.
54. **SÁNCHEZ, J.; LÓPEZ, D.** 2011. Osteoarthritis cellular pathophysiology: The articular chondrocyte as central player. *Iatreia* 24 (2): 167,178.
55. **SAN ROMÁN, F.** 2000. El cartílago articular. *Iams Symposium*, Chicago.
56. **SEKHON, B.S.** 2010. Matrix metalloproteinases – an overview. *J Res Rep Biol* 1: 1-20.
57. **SERRANO, A.E.** 2009. Estudio de regulación de ligandos de NKG2D por interleuquina 10 y su asociación con Calreticulina, en trofoblasto y melanoma humano. *Tesis Doctoral*. Santiago, Chile. Universidad de Chile, Fac. Cs. Químicas y Farmacéuticas. Pp. 105.
58. **SUEYOSHI, T.; MCMULLEN, B.A.; MARNELL, L.L.; DU CLOS, T.W.; KISIEL, W.** 1991. A new procedure for the separation of protein Z, prothrombin fragment 1.2 and calreticulin from human plasma. *Thromb Res* 63: 569-575.
59. **TARR, J.M.; WINYARD, P.G.; RYAN, B.; HARRIES, L.W.; HAIGH, R.; VINER, N.; EGGLETON, P.** 2010. Extracellular calreticulin is present in the joints of patients with rheumatoid arthritis and inhibits FasL (CD95L)-mediated apoptosis of T cells. *Arthritis Rheum* 62 (10): 2919-2929.
60. **VEGA, J.A.; GARCÍA-SUÁREZ, O.; FERNÁNDEZ, D.; DEL VALLE, M.E.** 2002. Bioquímica y biología del cartílago articular. *Rev Ortop Traumatol* 5: 391-400.
61. **VERA, C.A.** 2011. Expresión de Calreticulina y su relación con el factor de crecimiento nervioso en cáncer ovárico epitelial. *Tesis de Magíster*. Santiago, Chile. Universidad de Chile, Fac. Cs. Químicas y Farmacéuticas. Pp. 69.



62. **WHITE, T.K.; ZHU, Q.; TANZER, M.L.** 1995. Cell surface calreticulin is a putative mannoside lectin which triggers mouse melanoma cell spreading. *J Biol Chem* 270: 15926-15929.
63. **WOCHUL, C.; JONG-YOUN, K.; SOYEON, L.; SUNJU, LEE.; BYEONG-WOOK, S.; HYE-JUNG, K.; MIN-JI, C.; SAE-YUN, K.; SEONG-MIN, H.; BYOUNG-HYUN, M.; YANGSOO, J.; NAMSİK, C.; KI-CHUL, H.** 2006. Mesenchymal stem cells with Calreticulin gene modulate cell adhesiveness through an integrin-mediated mechanism. *J Tissue Eng Regen Med* 3 (3): 327-335.
64. **WU, M.; MASSAELI, H.; DURSTON, M.; MASAELI, N.** 2007. Differential expression and activity of matrix metalloproteinase-2 and -9 in the calreticulin deficient cells. *Matrix Biol* 26 (6): 463-473.
65. **YOSHIHARA, Y.; NAKAMURA, H.; OBATA, K.; YAMADA, H.; HAYAKAWA, T.; FUJIKAWA, K.; OKADA, Y.** 2000. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in synovial fluids from patients with rheumatoid arthritis or osteoarthritis. *Ann rheum dis* 59: 455-461.