



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

RECONOCIMIENTO DE CALRETICULINA DE *Trypanosoma cruzi*  
POR SUBCLASES DE INMUNOGLOBULINAS G PRESENTES  
EN EL SUERO DE CAMÉLIDOS INMUNIZADOS DE LA  
ESPECIE *Lama glama*

**LINDA MARISOL VELOSO BAEZA**

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

PROFESOR GUÍA: GALIA RAMIREZ TOLOZA

SANTIAGO, CHILE  
AÑO 2017



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

RECONOCIMIENTO DE CALRETICULINA DE *Trypanosoma cruzi*  
POR SUBCLASES DE INMUNOGLOBULINAS G PRESENTES  
EN EL SUERO DE CAMÉLIDOS INMUNIZADOS DE LA  
ESPECIE *Lama glama*

**LINDA MARISOL VELOSO BAEZA**

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

NOTA FINAL: .....

FIRMA

PROFESOR GUÍA : GALIA RAMÍREZ

.....

PROFESOR CONSEJERO: JOSÉ PIZARRO

.....

PROFESOR CONSEJERO: CLAUDIO ZÚÑIGA

.....

**SANTIAGO, CHILE**

**2017**

MEMORIA DE TÍTULO

**RECONOCIMIENTO DE CALRETICULINA DE *Trypanosoma cruzi* POR SUBCLASES DE INMUNOGLOBULINAS G PRESENTES EN EL SUERO DE CAMÉLIDOS INMUNIZADOS DE LA ESPECIE *Lama glama***

**RECOGNITION OF *Trypanosoma cruzi* CALRETICULIN BY IMMUNOGLOBULIN G SUBCLASSES PRESENT IN SERUM OF IMMUNIZED CAMELIDAE *Lama glama* SPECIES**

**Linda Marisol Veloso Baeza\***

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

## RESUMEN

Los camélidos poseen tres subclases de Inmunoglobulina G (IgG): IgG1, IgG2 e IgG3. Las dos últimas, carecen de cadena liviana, conociéndose como anticuerpos de cadena pesada (AcCP). Su sitio de unión al antígeno, formado por los dominios variables de las cadenas pesadas, posee un peso molecular de 15 kDa, pudiendo generarse biotecnológicamente (*nanobody*). Este hecho facilita su producción, biodistribución, penetración tisular y neutralización de proteínas de membrana que participan en el proceso de infectividad. La proteína Calreticulina de *Trypanosoma cruzi* (TcCRT) participa en la infectividad y evasión del sistema inmune por parte del parásito. *Nanobodies* anti-TcCRT podrían ser utilizados para disminuir su infectividad. En este contexto, previamente, dos llamas (*Lama glama*) inmunizadas con TcCRT recombinante (rTcCRT) produjeron un suero anti-rTcCRT. Con el fin de averiguar qué subclase de IgG es responsable de esta reactividad, esta Memoria de Título propuso determinar la(s) subclase(s) de IgG que reconocen rTcCRT en estos sueros inmunes. Para ello, se generó una columna de sefarosa unida a rTcCRT en la que se incubaron los sueros inmunes de ambas llamas, obteniéndose fracciones purificadas cuya reactividad anti-rTcCRT fue comprobada mediante Western Blot. Los sueros purificados fueron cargados en geles de poliacrilamida en presencia de dodecil sulfato de sodio al 12%, en condiciones reductoras y no reductoras, que se tiñeron con azul de *Coomassie*. Se observaron bandas cuyo peso molecular concuerda con IgG1. Se concluye, que las llamas inmunizadas produjeron IgG1 contra rTcCRT, sin embargo, para comprobar la generación de IgG2 e IgG3 se requerirán estudios adicionales.

**Palabras claves:** llamas, subclases de IgG, anticuerpos de cadena pesada, calreticulina de *Trypanosoma cruzi*.

## ABSTRACT

The camelids have three subclasses of immunoglobulin G (IgG): IgG1, IgG2 and IgG3. IgG2 and IgG3 lack of a light chain, called heavy chain antibodies (HCAbs). The site of binding to the antigen consists of the variable domains of both heavy chains and has a molecular weight of 15 kDa, being possible to generate it biotechnologically (*nanobody*). This fact allows its easy production, better biodistribution, tissue penetration and neutralization of

membrane proteins participating in the infectious process. *Trypanosoma cruzi* calreticulin (TcCRT) is a protein involved in the infectivity and evasion of the host immune system. Nanobodies anti-TcCRT could be used to decrease the parasite infectivity. In this context, previously, two immunized llamas (*Lama glama*) with recombinant TcCRT (rTcCRT) produced an anti-rTcCRT serum. To find out the subclass of IgG responsible of this reactivity, this Undergraduate Thesis proposed to determine the IgG subclass(es) of IgG (IgG1, IgG2 and IgG3) able to recognize rTcCRT in these immune sera. For this, it was generated a Sepharose column linked to rTcCRT in which were incubated both llama immune sera. We obtained purified anti-rTcCRT fractions whose reactivity were tested by Western Blot. Purified sera were loaded on a 12% polyacrylamide gel in the presence of sodium dodecyl sulfate under reducing and non-reducing conditions and stained with Coomassie blue. Observed bands were consistent with the molecular weight of IgG1. In conclusion, both immunized llamas produced IgG1 against rTcCRT, however, additional studies may be performed to demonstrate the generation of IgG2 and IgG3.

**Key words:** llamas, IgG subclasses, heavy chain antibodies, *Trypanozoma cruzi* calreticulin, purification.

## INTRODUCCIÓN

La familia Camelidae (Orden Artiodactyla, Suborden Tylopoda) se encuentra conformada por los camélidos del viejo mundo y los sudamericanos o del nuevo mundo. Estos últimos, habitan en América del Sur, a lo largo de la cordillera de Los Andes, siendo conformados por dos especies domésticas, alpaca (*Vicugna pacos*) y llama (*Lama glama*); y dos especies silvestres, guanaco (*Lama guanicoe*) y vicuña (*Vicugna vicugna*) (Pinto *et al.*, 2010). Estas especies poseen peculiares adaptaciones a ambientes extremos, como el existente en el altiplano andino y tienen su centro de origen y diversificación en los Andes Centrales y del Sur, principalmente Perú, Bolivia y Argentina (Pastori y Fuentealba, 2006; Pinto *et al.*, 2010). Debido a la gran importancia que han adquirido en los últimos años, sobre todo para los países que utilizan la especie como recurso, ha crecido el número de investigaciones que se han hecho de esta. Un tema especialmente presente entre los artículos científicos publicados, principalmente de llama, es la particular estructura de sus inmunoglobulinas (Igs).

Independientemente de la especificidad que tengan las Igs, en los mamíferos en general, estas proteínas tienen una estructura común, consistente en cuatro cadenas polipeptídicas: dos cadenas pesadas idénticas de 55-70 kDa denominadas con la letra H (del inglés “*heavy*” o pesada), unidas covalentemente a un oligosacárido; y un par idéntico de cadenas livianas no glicosiladas de 25 kDa denominadas con la letra L (del inglés “*light*” o liviana). Cadenas pesadas y livianas se enlazan entre sí por un puente disulfuro y por uniones no covalentes. Además, presentan una región constante (CH, del inglés “*constant heavy*” para las pesadas y CL, del inglés “*constant light*” para las livianas) y una región variable (VH, del inglés “*variable heavy*” y VL, del inglés “*variable light*”, respectivamente) (Hassanzadeh-Ghassabeh *et al.*, 2013). Las Igs cumplen un rol central en el sistema inmune adaptativo, mediante el reconocimiento de epitopos específicos que permite neutralizar y eliminar agentes patógenos del hospedero (Pain *et al.*, 2015). Sin embargo, las IgG de los camélidos difieren en su estructura en relación a los demás anticuerpos conocidos en otras especies de mamíferos.

En 1993 se analizó por primera vez el suero de camélidos mediante cromatografía de afinidad en Sefarosa-proteína A y Sefarosa-proteína G, descubriendo la existencia de tres subclases de IgG: IgG1, IgG2 e IgG3. Las dos últimas, carecen de cadena liviana y se conocen como Igs homodiméricas (Hammers-Casterman *et al.*, 1993). Algunos estudios sugieren la existencia de dos linajes distintos de linfocitos B en camélidos, uno de los cuales sintetiza las clásicas Igs de cuatro cadenas, mientras que el otro linaje expresa aquellas carentes de las cadenas livianas (De Genst *et al.*, 2006; Hassanzadeh-Ghassabeh *et al.*, 2013). Esto se debería a una alteración a nivel de la transcripción al ARN mensajero y no de una supresión en el gen correspondiente (Hassanzadeh-Ghassabeh *et al.*, 2013).

La IgG1 heterodimérica convencional en camélidos, con un peso aproximado de 160 kDa, posee dos cadenas pesadas de aproximadamente 55 kDa y dos livianas de 25 kDa, formando parte del 55-75% de la IgG sérica. IgG2 e IgG3, conocidas como AcCP, poseen sólo dos cadenas pesadas, cada una de aproximadamente 46 kDa y 43 kDa respectivamente, y forman parte del 25-45% de las IgG séricas de la llama. Se caracterizan por tener un dominio variable simple (VHH del inglés “*variable heavy heavy*”), que experimenta hipermutación somática y expone uniones de afinidad nanomolar. Además, posee una región bisagra y dos dominios constantes (CH2 y CH3) (ver Anexo 1). Los dos

dominios constantes son altamente homólogos a los dominios de la fracción cristalizable (Fc) de los anticuerpos convencionales (Daley *et al.*, 2010; Herrera, 2011; Hassanzadeh-Ghassabeh *et al.*, 2013).

Los AcCP tienen una capacidad de unión al antígeno equivalente a las IgGs convencionales, a pesar de carecer de los sitios de contacto que normalmente le confieren las cadenas livianas (Herrera, 2011; Pain *et al.*, 2015). El sitio de unión al antígeno, está formado por el VHH, que contiene cuatro regiones estructurales que forman la disposición cortical y tres regiones determinantes de complementariedad (CDR del inglés “*complementary determinant region*”) en las cuales, el largo mayor del CDR3, en comparación con una IgG1 convencional, facilita la unión al antígeno (Daley *et al.*, 2010).

A partir de estas Igs, la compañía Ablynx desarrolló un producto denominado *nanobody* (patente EPO656946), que es básicamente el polipéptido que forma la región variable (VHH) (ver Anexo 1) y que conserva su capacidad de detectar y unirse a un antígeno específico, por lo que se utiliza como herramienta de alto rendimiento en distintos campos de la ciencia médica, controlando varias enfermedades de animales y humanos (Pastori y Fuentealba, 2006; Herrera, 2011). Estos *nanobodies* son empleados en un amplio espectro terapéutico, tales como en enfermedades oncológicas, infecciosas y neurodegenerativas a nivel experimental. Los blancos potenciales incluyen proteínas ubicadas en la superficie de células eucariotas, bacterias patógenas, venenos, citoquinas, otras proteínas secretadas e incluso intracelulares (Wesolowski *et al.*, 2009). En comparación con anticuerpos monoclonales desarrollados en ratones, presentan un costo de producción mucho menor y una aplicación más sencilla, ya que pueden ser administrados incluso por vía oral. Además, por su estabilidad frente a los cambios de temperatura, se permiten menores exigencias en la cadena de frío, pudiendo transportarse y almacenarse a temperatura ambiente. Asimismo, al ser pequeños, poseen una mejor distribución tisular (Muyldermans *et al.*, 2009; Hassanzadeh-Ghassabeh *et al.*, 2013).

Se han aislado distintos VHH específicos contra toxinas bacterianas como enterotoxina estafilocócica B y neurotoxina botulínica A, que si bien no se ha informado sobre sus capacidades de neutralización, algunos han mostrado cierta utilidad para fines diagnósticos. Estudios indican que tienen una acción similar o más efectiva sobre venenos de serpiente y escorpiones que fragmentos de IgG (Wesolowski *et al.*, 2009). En el área microbiológica y

parasitológica hay innumerables desafíos, pues existen varias enfermedades de difícil erradicación, algunas causadas por parásitos intracelulares tales como *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*), agente causal de la enfermedad de Chagas, donde se han identificado distintas proteínas relacionadas con infectividad o evasión del sistema inmune que podrían ser neutralizados utilizando *nanobodies* (Toso *et al.*, 2011; Ramírez *et al.*, 2011a).

Para lograr invadir las células del hospedero, *T. cruzi* cuenta con una serie de moléculas de superficie, tales como gp82, gp30, gp35/50, gp85, trans-sialidasas y calcineurina B (Ramírez *et al.*, 2011a). Una de ellas es TcCRT, proteína de superficie que interactúa con C1q, inhibiendo el sistema del complemento y produciendo una señal “eat me” para macrófagos y células dendríticas, con lo que el parásito cumple su objetivo de infectar y posteriormente multiplicarse dentro de esta célula (Ferreira *et al.*, 2005; Ramírez *et al.*, 2011a).

C1q tiene gran afinidad por el dominio CH2 de la porción Fc de la IgG. Es por esto que IgGs dirigidas contra TcCRT, reclutan más C1q, aumentando la infectividad del parásito. Fragmentos F(ab')<sub>2</sub> anti-TcCRT, que se encuentran desprovistos de sus porciones Fc son incapaces de unir C1q, por lo tanto son una herramienta efectiva para reducir la interacción entre TcCRT y C1q, disminuyendo la infectividad mediada por ésta (Ramírez *et al.*, 2011b). Sin embargo, estos fragmentos derivan de IgGs policlonales de conejo y son de gran tamaño (100 kDa) y alto costo de producción.

Según lo anteriormente visto, es que se desea utilizar las propiedades especiales que posee el sistema inmune de los camélidos, específicamente de la llama, para obtener VHH o *nanobodies* específicos para TcCRT que puedan ser probados en una futura terapia o complemento para la terapia de la enfermedad de Chagas.

En el contexto de un proyecto previo, dos llamas hembras fueron inoculadas con rTcCRT en tres ocasiones, obteniéndose un suero inmune que reconoce a rTcCRT en ELISA y Western Blot. Sin embargo, se desconoce si dicha capacidad de reconocimiento está dada por las 3 subclases de IgG presentes en estas dos llamas o sólo se debe a la IgG1 convencional. Por este motivo, el objetivo de esta Memoria de Título fue complementar el estudio anterior, a través de la determinación de la o las subclases de IgG (IgG1, IgG2 y/o IgG3) que están reconociendo rTcCRT en estos sueros inmunes de llama.

## MATERIAL Y MÉTODO

1. Obtención de IgGs específicas contra rTcCRT purificadas por afinidad en columnas de Sefarosa activada con Bromuro de Cianógeno unida a rTcCRT

1.1. Generación de una columna de Sefarosa activada con Bromuro de Cianógeno unida a rTcCRT.

La purificación por afinidad de los anticuerpos de llama se llevó a cabo empleando una columna construida con Sefarosa activada con Bromuro de Cianógeno (CNBr) a la cual se acopló rTcCRT, actuando como ligando.

Se dializaron 3 mg de rTcCRT, incubándose en *buffer* de acoplamiento (100 mM NaHCO<sub>3</sub>, 500mM NaCl, pH 8.3) durante toda la noche a 4°C. Por otro lado, se empleó 140 mg de perlas de Sefarosa activada con CNBr (Sigma-Aldrich), que fueron lavadas y rehidratadas con 50 mL de 1 mM HCl frío, pH 3, durante 15 minutos a 4°C, incubándose posteriormente con su ligando durante toda la noche a 4°C. Luego, fueron lavadas con 15 mL de *buffer* de acoplamiento.

Para finalizar, se añadieron 3 mL de *buffer* Tris-HCl 1 M (pH 8), incubándose durante 2 horas a temperatura ambiente, con el objetivo de bloquear los sitios activos remanentes de las perlas de Sefarosa que no se acoplaron a la proteína. Para la purificación de anticuerpos, la resina unida a la proteína fue depositada dentro de una columna plástica de 1,7 mL (Sephadex G-25, Isolab Inc., Innovative Biochemical Methodology, USA) y almacenada en *buffer* fosfato salino, desde ahora llamado PBS (10mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1.8 Mm NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 140 mM NaCl, pH 7.4).

1.2. Purificación de las IgGs específicas para rTcCRT desde el suero de llamas inmunizadas.

A la columna generada, se le aplicó 1 mL de suero anti-rTcCRT de ambas llamas, por separado. El suero fue incubado con la Sefarosa activada con CNBr acoplada a rTcCRT durante toda la noche a 4°C.

Posteriormente, la columna fue lavada con PBS para eliminar las fracciones del suero que no se unieron a rTcCRT. Esto se llevó a cabo hasta que no apareció material proteico en la elución del lavado, lo que se verificó por la lectura de absorbancia de las muestras de lavado

mediante espectrofotometría a 280 nm. Los anticuerpos específicos contra rTcCRT fueron eluidos con 6 mL de *buffer* de elución (150 mM NaCl, pH 2.5). Las distintas fracciones fueron colectadas en tubos Eppendorf de 1,6 mL, teniendo 1 mL de eluido por tubo que se mezcló con 100  $\mu$ L de *buffer* de neutralización (PBS saturado con Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>), para obtener un pH de 7,5. Se midió la absorbancia de cada fracción eluida mediante espectrofotometría a 280 nm, siendo el resultado obtenido dividido por el coeficiente de extinción molar de la IgG (entendido como la  $A_{280}$  de 1mg/ml de solución de IgG). Con esto se calculó la concentración de IgG en las fracciones eluidas.

El pH de cada fracción se midió utilizando papel pH (MERCK) como indicador. Los anticuerpos fueron mantenidos a -20°C con PBS 0,1% azida de sodio. Una vez utilizada, la columna fue lavada tres veces con 10 mL de PBS y luego con 5 mL de solución 150 mM NaCl-HCl (pH 5).

### 1.3. Medición de la reactividad anti-rTcCRT de las IgGs purificadas.

#### 1.3.1. Ensayo de Western Blot

##### 1.3.1.1. Electroforesis (Laemmli, 1970)

Se prepararon geles de poliacrilamida al 12% de 1,5 mm de grosor, en presencia de dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE) (Sigma). Para el gel separador se utilizó 4 ml de una solución de acrilamida (Gibco) al 30%, 3 ml de agua desionizada, 3 ml PBS (pH 8.8), 100  $\mu$ l persulfato de amonio (Sigma) al 10% y 6  $\mu$ l N,N,N',N'-Tetrametiletildiamina (TEMED) (Bio-Rad) 0,065% v/v. Tras la polimerización a 37°C del gel separador, se preparó sobre él un gel concentrador ("*stacking*") al 4%, a partir de una solución de 0.75 ml de acrilamida al 30%, 3 ml de agua desionizada, 1.25 ml de PBS (pH 6.8), 100  $\mu$ l de persulfato de amonio y 6  $\mu$ l de TEMED. La polimerización de este gel se realizó con un separador discontinuo. Previo a depositar rTcCRT en una concentración de 500 ng por carril en el gel, las proteínas fueron denaturadas con  $\beta$ 2-mercaptoetanol (Sigma) 5% v/v (condiciones reductoras), en una solución de glicerol al 50% v/v, azul de bromofenol (Merck) al 0,12% p/v, Trizma base (Sigma) 120 mM y SDS al 4%. Luego, las muestras conteniendo rTcCRT fueron calentadas a 100°C, durante 5 minutos. La electroforesis se realizó en una cámara Bio-Rad a 100 V y a temperatura ambiente.

### 1.3.1.2. Western blot (Towbin *et al.*, 1979)

Se realizó la transferencia de rTcCRT presente en el gel SDS-PAGE al 12% a una membrana de nitrocelulosa (Hybond-ECL, Amersham), en un sistema húmedo estándar (Bio-Rad), durante 60 minutos a 100 V y a 4°C. Luego, la membrana fue bloqueada en PBS-leche al 5%, durante toda la noche a 4°C. Al día siguiente, se incubó el *pool* de IgGs de llama específicas anti-rTcCRT, obtenidas en la cromatografía de afinidad, en una dilución de 1:1.000 durante 90 minutos a temperatura ambiente (20-24°C). A continuación, la membrana fue lavada e incubada con un segundo anticuerpo de conejo anti-llama (donado por el Laboratorio de Inmunología de la Agresión Microbiana, ICBM, Facultad de Medicina, Universidad de Chile) durante 90 minutos a temperatura ambiente y luego uno de cabra anti-conejo conjugado a fosfatasa alcalina, diluido 1:1.000 (DAKO) durante 90 minutos en iguales condiciones de temperatura. Finalmente, la membrana fue revelada con sustrato para fosfatasa alcalina, compuesto por 66  $\mu$ l NBT (Nitro Blue Tetrazolium), 33  $\mu$ l BCIP (Fosfato 5-bromo-4-cloro-indol), Sigma, y 10 ml *buffer* para fosfatasa alcalina (100mM NaCl, 5mM MgCl<sub>2</sub>, 100mM Trizma base, pH 9.5).

## 2. Determinación de las subclases de IgG que reconocen rTcCRT

### 2.1. Electroforesis (Laemmli, 1970)

Las IgGs obtenidas fueron analizadas mediante SDS-PAGE en condiciones similares a las detalladas en el punto 1.3.1.1. Las IgGs de llama específicas anti-rTcCRT obtenidas en la cromatografía de afinidad, se depositaron en ambos geles en presencia y ausencia de  $\beta$ 2-mercaptoetanol (Sigma) 5% v/v (condición reductora y no reductora, respectivamente), en una solución de glicerol al 50% v/v, azul de bromofenol (Merck) al 0,12%, Trizma base (Sigma) 120 mM y SDS al 4%. Luego, las muestras correspondientes a las condiciones reductoras, fueron calentadas a 100°C, durante 5 minutos. La electroforesis se realizó en una cámara (Bio-Rad) a 100 V, a temperatura ambiente.

Finalmente, los geles fueron puestos en placas petri y se agregó 36 ml de solución de tinción azul de *Coomassie* G-250 en cada placa, siendo teñidos durante toda la noche a temperatura ambiente. La destinción de los geles se llevó a cabo al día siguiente mediante solución de destinción de azul de *Coomassie* (metanol, agua desionizada, ácido acético glacial) a temperatura ambiente.

Con el objetivo de verificar los resultados obtenidos, se realizó un ensayo de Western Blot en el que se cargaron los sueros purificados específicos anti-rTcCRT de ambas llamas en un gel de poliacrilamida al 12% en presencia de dodecil sulfato de sodio y en condiciones reductoras. Terminada la electroforesis, las proteínas cargadas en el gel, fueron transferidas a una membrana de nitrocelulosa, que fue incubada con un anticuerpo de conejo anti-llama y luego uno de cabra anti-conejo conjugado a fosfatasa alcalina, diluido 1:1.000. Finalmente, la membrana fue revelada con sustrato para fosfatasa alcalina.

2.2. Obtención de IgGs específicas contra rTcCRT mediante cromatografía de afinidad a partir de las fracciones colectadas previo a la elución de los sueros inmunes de llama.

Con el fin de descartar una posible saturación de la columna durante la incubación de los sueros inmunes de las llamas 1 y 2, las fracciones que no fueron capturadas en la primera purificación (fracciones 1-5), volvieron a ser sometidas a cromatografía de afinidad en las mismas condiciones que el punto 1.2. Se midió la absorbancia de cada fracción eluida por espectrofotometría a 280 nm. Luego, el resultado obtenido se dividió por el coeficiente de extinción molar de la IgG, para calcular la concentración de esta en las fracciones eluidas.

2.3. Concentración de fracciones eluidas a partir de las fracciones colectadas previo a la elución de los sueros inmunes de llama.

Con el fin de concentrar la proteína contenida en las fracciones eluidas, a partir de las fracciones 1-5 de la primera cromatografía, éstas fueron agregadas en un tubo Centricon Millipore (Amicod<sup>®</sup>) y se centrifugaron a 3.500 RPM durante 10 minutos. Luego, se midió la absorbancia de las fracciones a 280 nm en un espectrofotómetro, siendo los valores divididos por el coeficiente de extinción molar de IgG, obteniéndose la concentración proteica.

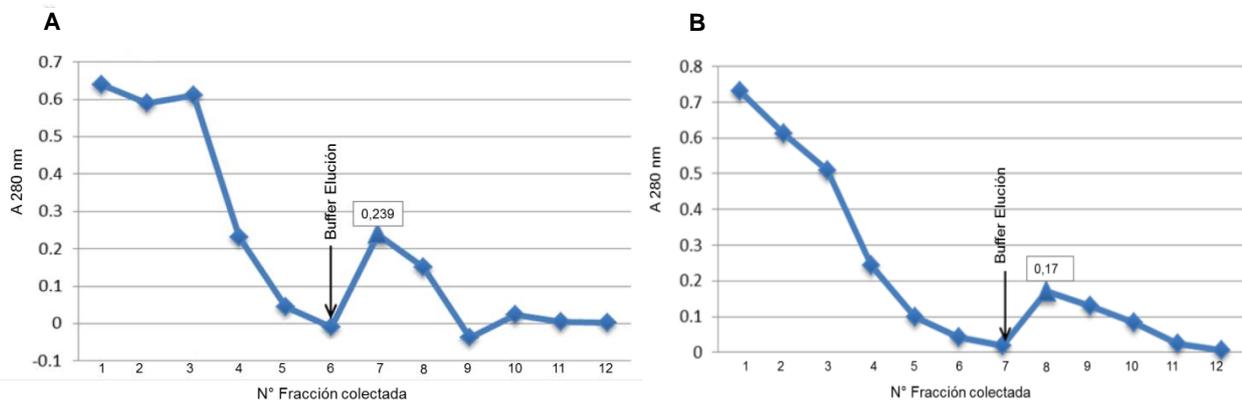
2.4. Determinación de las subclases de IgG que reconocen rTcCRT en las fracciones purificadas y concentradas de llama.

Las Igs purificadas y concentradas fueron sometidas a SDS-PAGE 12%, en similares condiciones del punto 2.1.

## RESULTADOS

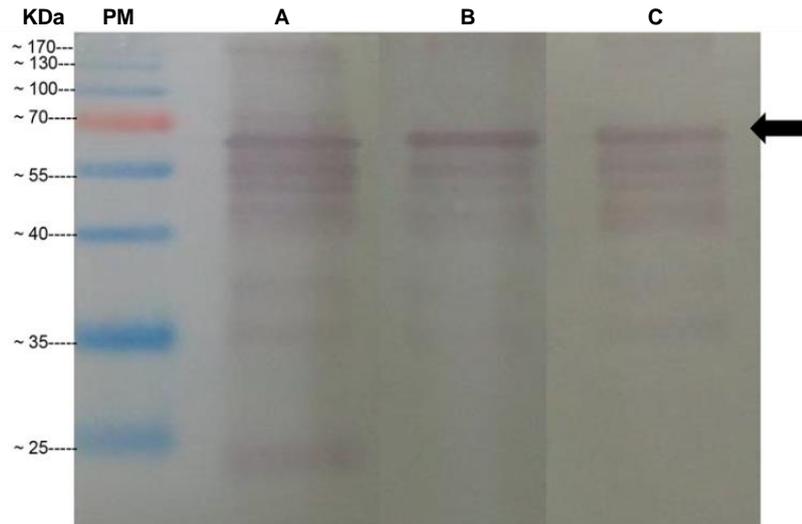
1. Las IgGs purificadas por cromatografía de afinidad son específicas contra rTcCRT.

En una primera instancia, se generó una columna de sefarosa-rTcCRT activada con CNBr, donde se incubaron los sueros inmunes de las llamas 1 y 2. Luego de finalizar la incubación, la columna fue lavada con PBS. Se midió la absorbancia de las fracciones obtenidas de este lavado por espectrofotometría a una longitud de onda ( $\lambda$ ) de 280 nm, hasta alcanzar un valor lo más cercano a 0, luego se agregó el *buffer* de elución y las fracciones obtenidas fueron neutralizadas. Nuevamente, se midió la absorbancia de cada fracción por espectrofotometría a 280 nm, obteniéndose un peak de elución de 0,239 para la llama 1 y 0,170 para la llama 2, tal como se observa en la figura 1 (A y B, respectivamente). Estos valores son equivalentes a una concentración de IgG de 0,167  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  en llama 1 y 0,118  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  en llama 2, utilizando un coeficiente de extinción molar de la IgG de 1,43.



**Figura 1. Cromatograma de purificación de suero inmune llama 1 (A) y llama 2 (B).** Se midió la absorbancia de las fracciones eluidas mediante espectrofotometría a  $\lambda$  280 nm. El peak de elución en el suero de llama 1 es 0,239 y en el suero de llama 2 es 0,17.

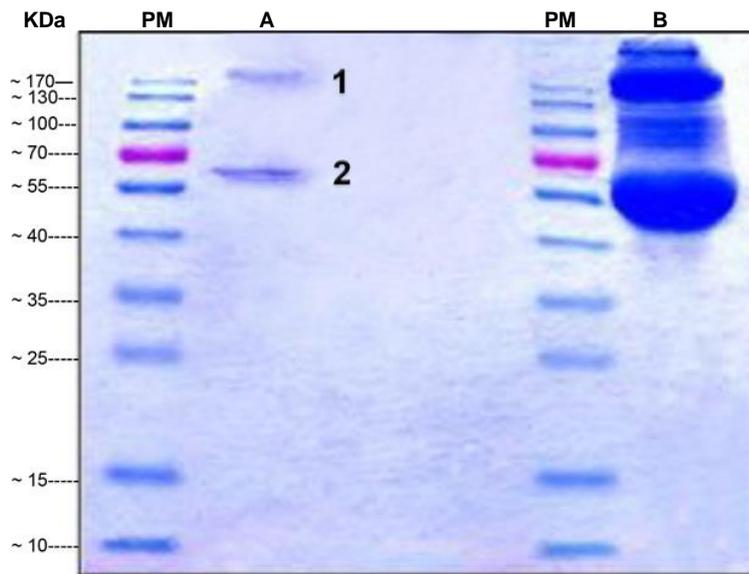
Las Igs purificadas (fracciones 7 en A y 8 en B de los cromatogramas de la Figura 1) fueron sometidas a Western Blot para evaluar si reconocen a rTcCRT. Las Igs reconocen a rTcCRT como una banda predominante de 60 kDa (Figura 2). Tanto el suero policlonal de conejo anti-rTcCRT (control positivo de reconocimiento) como el de llama reconocieron el mismo patrón proteico previamente descrito por Molina *et al.*, 2005 y Aguilar *et al.*, 2005.



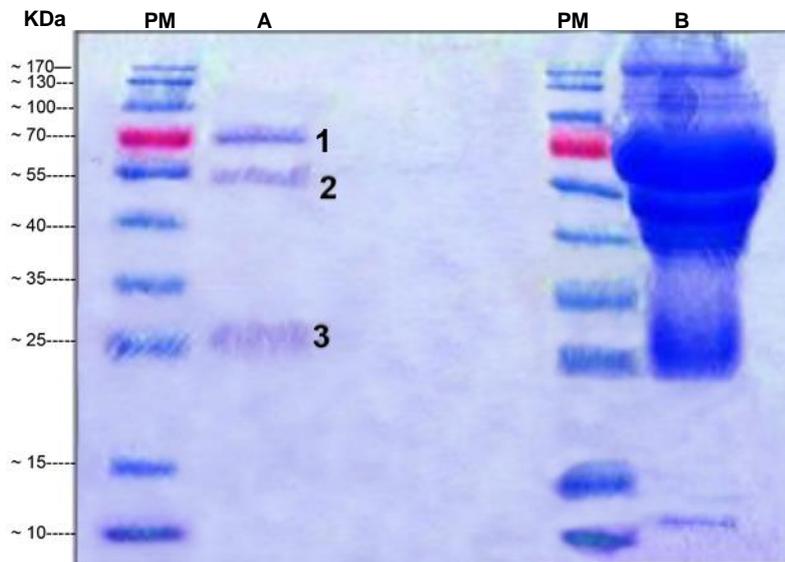
**Figura 2. Reactividad de la Inmunoglobulinas purificadas de llama anti-rTcCRT por WB.** PM. Peso Molecular; A. suero inmune policlonal de conejo anti-rTcCRT; B. Inmunoglobulinas purificadas por afinidad llama 1; C. Inmunoglobulinas purificadas por afinidad llama 2.; Flecha indica rTcCRT.

2. La subclase IgG1 del suero de llamas inmunizadas con rTcCRT reconocen la proteína.

Las Igs purificadas fueron sometidas a SDS-PAGE al 12%, en condiciones reductoras y no reductoras. Al analizar los geles, se observaron bandas cuyo peso molecular fue comparado con un estándar, coincidiendo en rangos correspondientes a IgG subclase 1 de camélidos, es decir, una banda sobre 160 kDa en el gel no reductor (Figura 3) y 2 bandas de 55 y 25 kDa en el gel reductor (Figura 4), correspondientes a la cadena pesada y liviana de IgG1 respectivamente. Además, en el carril A del gel reductor y no reductor, se observa una banda predominante de aproximadamente 66 y 70 kDa, respectivamente (Figura 3 y 4), con una movilidad electroforética similar a la alcanzada por la albúmina sérica bovina. Es altamente probable que estas bandas correspondan a albúmina sérica de llama. En el carril B se muestra la movilidad electroforética de un suero completo de llama en condiciones no reductoras y reductoras (Figura 3 y 4, respectivamente).

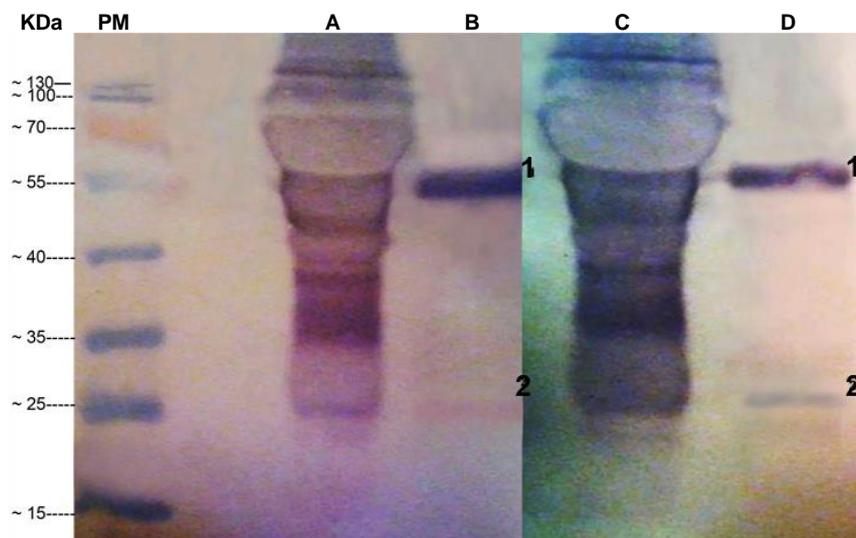


**Figura 3. Análisis de inmunoglobulinas purificadas de llama mediante SDS-PAGE en condiciones no reductoras.** PM. Estándar de peso molecular; A. IgG purificada; B. Suero completo no purificado; 1. IgG1 de aproximadamente 170 kDa; 2. Albúmina sérica de llama de aproximadamente 66 kDa.



**Figura 4. Análisis de inmunoglobulinas purificadas de llama mediante SDS-PAGE en condiciones reductoras.** PM. Estándar de peso molecular; A. IgG purificada; B. Suero completo no purificado; 1. Albúmina sérica de llama de aproximadamente 70 kDa; 2. Cadena pesada de IgG1 de aproximadamente 55 kDa; 3. Cadena liviana de IgG1 de aproximadamente 25 kDa.

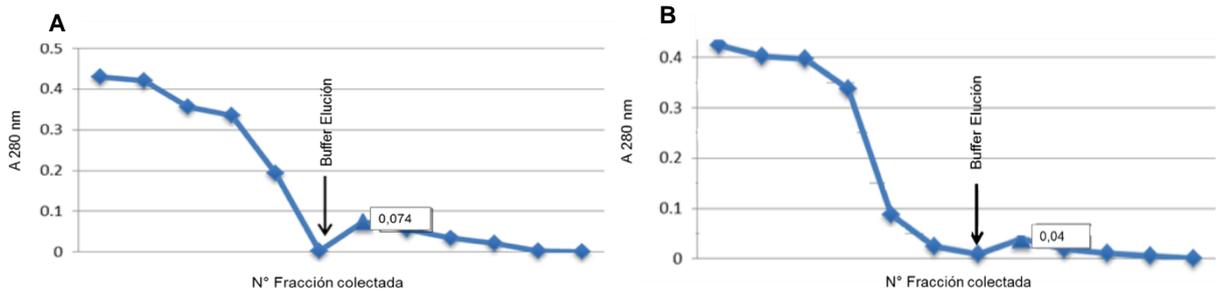
Con el objetivo de verificar que las bandas mostradas en las figuras 3 y 4 corresponden efectivamente a IgG, se realizó un Western Blot de los sueros purificados de llama 1 y 2 (Figura 5), a través de su incubación con un anticuerpo policlonal de conejo anti-llama y luego uno de cabra anti-conejo conjugado a fosfatasa alcalina. En la Figura 5, los carriles B y D muestran que los anticuerpos utilizados reconocen bandas de aproximadamente 55 kDa y 25 kDa, consistentes con el peso molecular de las cadenas pesadas y livianas de la IgG1 en condiciones reductoras. La banda correspondiente a albúmina sérica de llama, de aproximadamente 70 kDa, no es visualizada. Los carriles A y C actúan como control y corresponden a los sueros sin purificar.



**Figura 5. Western Blot anti-IgG de llama.** PM. Estándar de peso molecular; A. Suero completo no purificado de llama 1; B. IgG purificada llama 1; C. Suero completo no purificado llama 2; D. IgG purificada de llama 2; 1. Cadena pesada de IgG1 de peso molecular aproximado de 55 kDa; 2. Cadena liviana de IgG1 de peso molecular aproximado de 25 kDa. Para la identificación de la IgG, las membranas fueron incubadas con un anticuerpo policlonal de conejo anti-Ig de llama y luego, un anticuerpo de cabra anti- IgG de conejo conjugado a fosfatasa alcalina.

Con el fin de descartar una posible saturación de la columna durante la incubación de los sueros inmunes de las llamas 1 y 2, que dificultaría la obtención de las otras subclases de IgG (IgG2 e IgG3), las fracciones que no fueron capturadas (pool de fracciones 1-5 de la cromatografía de ambos sueros de llamas, mostrados en la Figura 1 A-B) volvieron a ser purificadas. Una vez que estas fracciones fueron sometidas a la columna de purificación, se midió la absorbancia de cada fracción eluida por espectrofotometría a un  $\lambda$  de 280 nm, obteniéndose un peak de elución de 0,074 para la llama 1 y 0,04 para la llama 2, tal como

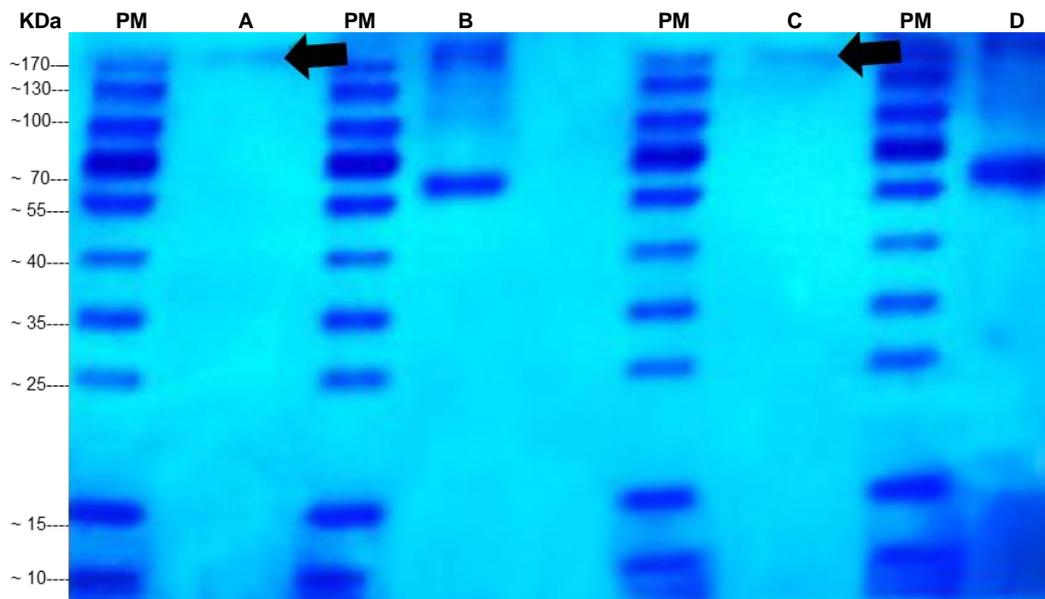
se observa en la Figura 6 (A y B, respectivamente). Estos valores son equivalentes a una concentración de IgG de 0,05  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  en llama 1 y 0,027  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  en llama 2, calculados utilizando el coeficiente de extinción molar de la IgG.



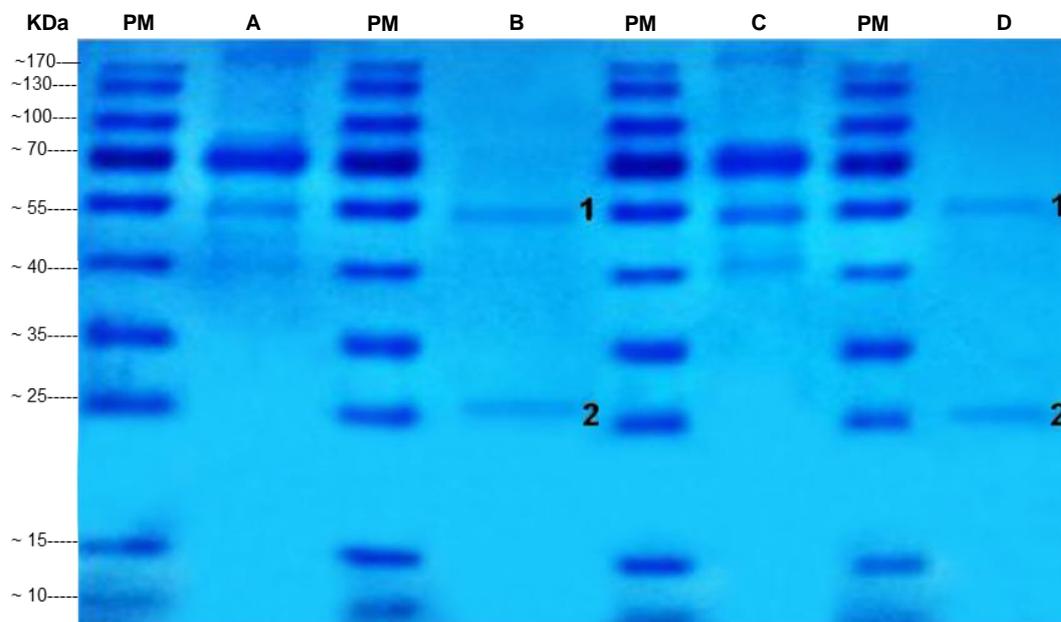
**Figura 6. Cromatograma de purificación de pool de fracciones no capturadas previa elución del suero inmune de llama 1 (A) y llama 2 (B) en la primera purificación.** Se midió la absorbancia de las fracciones eluidas mediante espectrofotometría a  $\lambda$  280 nm. El peak de elución en el suero de llama 1 es 0,074. El peak de elución en el suero de llama 2 es 0,04.

Los valores de concentración de proteína obtenidos son muy bajos para cubrir los requerimientos mínimos para visualizar las bandas mediante SDS-PAGE al 12% (1  $\mu\text{g}$  por carril). Por esta razón, se decidió concentrar estas últimas fracciones eluidas previo a realizar este ensayo. Para esto, se concentraron las fracciones más altas obtenidas luego de la elución, mediante centrifugación en un tubo *Centricon Millipore* (Amicon<sup>®</sup>), hasta alcanzar los requerimientos mínimos del SDS-PAGE. Se midió la absorbancia de las fracciones concentradas por espectrofotometría a 280 nm, obteniéndose 0,088 para la llama 1 y 0,102 para la llama 2. Estos valores son equivalentes a una concentración de IgG de 0,06  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  y 0,07  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ , respectivamente.

Finalmente, las Igs purificadas y concentradas fueron sometidas a SDS-PAGE al 12%, en condiciones reductoras y no reductoras, siguiendo los mismos pasos del punto 2.1. Al analizar los geles, se observaron bandas ubicadas en los rangos correspondientes a IgG1, es decir aproximadamente 160 kDa para el gel no reductor (Figura 7, carril A y C), además de 55 y 25 kDa (Figura 8, carriles B y D) para el gel reductor. El gel fue teñido con tinción *blue silver*, para aumentar la sensibilidad del método.



**Figura 7. Análisis de la inmunoglobulinas purificadas de llama mediante SDS-PAGE en condiciones no reductoras.** Tinción de gel mediante “blue silver”. PM. Estándar de peso molecular; A. IgG purificada llama 1; B. Suero completo no purificado llama 1; C. IgG purificada llama 2; D. Suero completo no purificado llama 2; Flecha. IgG1 de peso molecular de aproximadamente 170 kDa en ambos sueros.



**Figura 8. Análisis de las inmunoglobulinas purificadas de llama mediante SDS-PAGE en condiciones reductoras.** Tinción de gel mediante “blue silver”. PM. Estándar de peso molecular; A. Suero completo no purificado llama 1; B. IgG purificada llama 1; C. Suero completo no purificado llama 2; IgG purificada llama 2; 1. Cadena pesada de IgG de peso molecular aproximadamente 55 kDa en ambos sueros; 2. Cadena liviana de IgG1 de peso molecular aproximadamente 25 kDa en ambos sueros.

## DISCUSIÓN

Los camélidos del viejo y nuevo mundo producen IgGs convencionales y AcCP. Estos últimos no poseen cadenas livianas en su estructura, conservando su capacidad de unión al antígeno. Se reconoce a IgG1 como un anticuerpo convencional y a IgG2 e IgG3 como AcCP. Estos AcCP comprenden aproximadamente un 45% de las IgG del suero en *Lama* spp. Esta representación es compatible con un rol significativo en la respuesta inmune. Sin embargo, aún no se tiene completa claridad acerca de la ventaja evolutiva que representan estas Igs carentes de cadena liviana para los camélidos.

Con pesos moleculares de aproximadamente 15 kDa, los dominios VHH de los AcCP son los fragmentos naturales de unión a antígeno más pequeños conocidos, donde su generación biotecnológica y aplicación potencial presenta grandes ventajas para el desarrollo de fármacos (terapéutica experimental con virus como VIH, virus respiratorio sincicial, entre otros), diagnóstico y aplicaciones industriales, siendo su versión recombinante llamada *Nanobody* (Daley *et al.*, 2010; Vanlandschoot *et al.*, 2011).

Debido a la importancia que la enfermedad de Chagas genera en el área de salud pública, existe interés en crear nuevas formas de tratamiento, que no sólo sean efectivos en los casos agudos, como las drogas actualmente disponibles. Así, la proteína TcCRT posee un rol demostrado en la evasión del sistema inmune del hospedero y en la infectividad de los tripomastigotes de *T. cruzi*. Al ser bloqueada con fragmentos de anticuerpo IgG (fragmentos F(ab')<sub>2</sub>) e inhibida su acción, disminuye la capacidad infectante de tripomastigotes, junto con la sintomatología y mortalidad en un modelo in vivo (Ramírez *et al.*, 2011b). Sin embargo, estos fragmentos de anticuerpo poseen un alto peso molecular (100 kDa), lo cual dificulta su administración y distribución. Por esta razón, sería de gran relevancia y utilidad generar VHHs contra esta proteína de superficie, los cuales son de pequeño tamaño y poseen una elevada selectividad, especificidad y afinidad por el antígeno, además de una eficaz biodistribución (Muyldermans *et al.*, 2009; Vanlandschoot *et al.*, 2011; Hassanzadeh-Ghassabeh *et al.*, 2013). En estudios previos se han generado VHHs capaces de unir epitopos de glicoproteínas de superficie en *Trypanosoma brucei*, que no son accesibles para las Igs convencionales (Stijlemans *et al.*, 2011).

En llamas, la inmunización más utilizada para proteínas es la activa, a través de la inoculación de un antígeno. Utilizando este tipo de inmunización, se han reportado VHHs

con afinidades en el rango nanomolar e incluso picomolar, comparándose incluso a lo observado en anticuerpos convencionales bivalentes. VHHs con afinidades nanomolares también han sido obtenidos utilizando librerías nativas o sintéticas (Stijlemans *et al.*, 2011). Con el objetivo de obtener un suero inmune que reconociera esta TcCRT, las llamas utilizadas en este estudio fueron inmunizadas con rTcCRT más adyuvante completo e incompleto de Freund. Los resultados del Western Blot en la Figura 2, muestran la existencia de una banda predominante de 60 kDa correspondiente a rTcCRT, así como con el suero control de conejo. El peso molecular de esta proteína recombinante es mayor que la nativa (nTcCRT) de 45 kDa, ya que la primera tiene aminoácidos extra, pertenecientes al vector plásmido y una cola de histidina, para propósitos de purificación (Molina *et al.*, 2005). Mientras nTcCRT se observa en el Western Blot como una única banda, con rTcCRT se observan varias bandas por debajo de la principal que corresponden a productos de degradación proteica, debido a la no utilización de inhibidores de proteasas (Aguilar *et al.*, 2005; Molina *et al.*, 2005).

A pesar que el suero inmune de llama reaccionó contra rTcCRT, indicando la inmunogenicidad de la molécula en esta especie animal, se desconocía qué subclases de IgG estaban involucradas en este reconocimiento. Por este motivo, se desarrolló una columna de sefarosa activada con CNBr acoplada a rTcCRT, que lograra purificar este suero y así, averiguar las subclases de IgG contenidas y cuáles de ellas reconocen esta molécula. Para el desarrollo de la columna, se utilizaron 3 mg de rTcCRT con 0,5 mL de perlas de sefarosa activada. Midiendo la concentración de rTcCRT en la primera fracción obtenida luego del lavado con *buffer* de acoplamiento, posterior a la incubación con las perlas de sefarosa, se logró comprobar que de estos 3 mg utilizados, 2,714 mg de rTcCRT fueron acoplados a la columna (90,4%). En la columna se incubó 1 mL de suero inmune de cada llama, obteniéndose fracciones cuya concentración de IgG fue obtenida a partir de los valores de absorbancia medida por espectrofotometría a 280 nm (Figura 1). Las fracciones más concentradas de ambas llamas, alcanzaron valores de 0,167 y 0,118 mg/mL, respectivamente (calculado con un coeficiente de extinción molar de IgG de 1,43). Esta concentración de IgG es esperable, dado que a pesar que IgG es la inmunoglobulina más abundante del suero de mamíferos, con una concentración de 600-1.800 mg cada 100 mL, sólo un 1-5% es específica contra un antígeno determinado (suero inmune) (Devlin, 2004). Por esta razón, resulta esperable que las concentraciones de IgG en los eluidos obtenidos

fueran pequeñas. Sin embargo, si se considera una concentración mínima de IgG en un suero total de 6 mg/mL, la cantidad de IgGs específicas contra un antígeno será de 0,06-0,18 mg/mL equivalentes a 60-180  $\mu\text{g/mL}$  de suero. Esto indica que la columna posee un rendimiento esperable.

La presencia de IgG1 involucrada en el reconocimiento de rTcCRT fue identificada mediante SDS-PAGE. Sin embargo, no se pudieron identificar AcCP (IgG2 e IgG3). Estudios comparativos sobre camélidos del viejo mundo y del nuevo mundo, mostraron que los AcCP corresponden a un 50-75% del total de IgGs presentes en el suero de dromedarios y camellos, mientras que en las especies del nuevo mundo esa proporción es menor, con aproximadamente un 25-45% en llamas (Pain *et al.*, 2015). Así mismo, otros estudios demostraron que sueros purificados de dromedario, mediante cromatografía en columna de sefarosa-proteína A y proteína G, contienen aproximadamente 3 mg de IgG1 por mL de suero, mientras que las fracciones IgG2 e IgG3 son de 1 y 2 mg por mL de suero, respectivamente. Por lo tanto, la cantidad de IgG1 es comparativamente mayor (De Genst *et al.*, 2006). Así mismo, si tomamos en cuenta el porcentaje de IgG específica contra un antígeno presente en un suero, la cantidad de AcCP contra rTcCRT en el suero inmune de estas llamas, debería ser muy baja y a su vez difícil de identificar mediante SDS-PAGE. Para aumentar la sensibilidad de este método, se utilizó azul de Coomassie R-250 (*blue silver*) (Figura 7 y 8). Este compuesto permite detectar bandas correspondientes a 1  $\mu\text{g}$  de proteína. Sin embargo, no fue posible identificar bandas cuyo peso molecular coincidiera con IgG2 o IgG3. Es altamente probable que las llamas inmunizadas hayan generado una cantidad de IgG2 y/o IgG3 por debajo del límite de detección de estas técnicas. Actualmente, en el mercado existen metodologías de tinción de geles, como tinción de plata o tinción fluorescente, cuya sensibilidad para identificar proteínas en baja concentración es mayor que las utilizadas en este estudio y, por lo tanto, debiesen ser consideradas en investigaciones posteriores.

Se debe considerar la posibilidad de que estas llamas no hayan generado estos AcCP, sin embargo, no existen antecedentes en la literatura que avalen una deficiencia natural en la producción de estas Igs, posterior a los tres meses de edad. Como ocurre en otros rumiantes, los camélidos nacen severamente hipogammaglobulinémicos, debido a la falla en la transferencia pasiva de Igs *in utero*, a causa de su tipo de placenta epiteliocorial. Por ello, las crías obtienen IgGs maternas a través del calostro. Si falla la transferencia pasiva por

esta vía, aumenta la morbilidad y la mortalidad de las crías (Daley-Bauer *et al.*, 2010). El análisis de las subclases de IgG presentes en el suero, calostro y leche, indica que IgG1 y AcCP están representados en concentraciones relativas similares, lo que demuestra que la transferencia no es selectiva, es decir, que no existe una absorción diferencial en la sangre del recién nacido (Daley-Bauer *et al.*, 2010). En camélidos infectados con algún patógeno, los AcCP contribuyen de manera importante en la respuesta inmune contra la infección. Así, Daley *et al.* en el año 2010 demostraron que la IgG3 producida es altamente eficiente en la neutralización del virus *West Nile* (WNV), y su efecto es mayor en presencia del sistema del complemento. Por lo tanto, estos antecedentes sugieren que si bien las llamas inmunizadas con rTcCRT podrían haber producido IgG2 e IgG3, ya que como se mencionó anteriormente no hay antecedentes de deficiencia natural de estas, las concentraciones de estos AcCP serían indetectables por los métodos utilizados.

Por otra parte, es importante considerar el tipo de inmunización (vía de administración del antígeno y su concentración) y el adyuvante utilizado. Estudios previos han demostrado que la identificación de Igs antígeno-específicas es sencilla después de la inmunización de un camélido con antígenos purificados, solubles, proteicos correctamente plegados y fagos (Vincke *et al.*, 2012). Sin embargo, la inmunización con antígenos más complejos, tales como proteínas de transmembrana, y la posterior selección de Igs contra estos, resultan ser los pasos críticos (Hassanzadeh-Ghassabeh *et al.*, 2013). Generalmente, diversos adyuvantes, así como diferentes rutas de inmunización, inducen satisfactoriamente una respuesta de IgG1 y de AcCP en camélidos, siendo la primera subclase dominante (Hassanzadeh-Ghassabeh *et al.*, 2013). Además, al inmunizar contra proteínas de membrana, se debe tener en cuenta la disponibilidad de tales proteínas en cantidades suficientes para lograr una correcta inmunización. rTcCRT ha sido utilizada como inmunógeno en diversas especies animales (Aguilar *et al.*, 2005; Ribeiro *et al.*, 2009), las cuales han generado IgG contra esta. En este estudio, se comprobó que el suero inmune obtenido de las llamas inmunizadas, presenta reactividad contra rTcCRT. Las llamas utilizadas en este estudio fueron inmunizadas siguiendo un protocolo experimental similar al utilizado en las otras especies animales. Se utilizó la vía subcutánea, con tres inmunizaciones separadas por una semana, la primera con adyuvante completo de Freund, seguido por adyuvante incompleto de Freund. A pesar que este protocolo fue exitoso en otras especies animales, la escasa información encontrada en la literatura acerca de

protocolos de inmunización en llamas, hace difícil determinar si el tipo de inmunización fue correcta para esta especie animal y para estimular la producción de ambos tipos de IgG (IgG1 y AcCP). Según Hassanzadeh-Ghassabeh *et al.*, 2013, debido a que la gran mayoría de los AcCP e IgG convencionales reconocen epitopos conformacionales, la inmunización de camélidos con péptidos (incluso acoplados a vehículos proteicos amplios) no se recomienda por la pobre respuesta de AcCP.

Cabe mencionar que los resultados mostrados en la Figura 3 y 4, indican la existencia en SDS-PAGE de una banda de peso molecular no correspondiente a alguna de las subclases de IgG que se buscaban. Esta proteína muestra una movilidad electroforética en el gel y un peso molecular relativo muy similar a la albúmina sérica bovina (Cantisani *et al.*, 1990). Para comprobar este hecho y descartar que se tratase de una IgG, se realizó un Western Blot utilizando anticuerpos comerciales anti-Igs. En este ensayo no se visualiza la banda de 70 kDa, por lo cual esta no correspondería a una Ig (Figura 5).

Finalmente, al analizar la estructura de las IgG convencionales y AcCP, se pueden detectar diferencias estructurales. Sin embargo, hay poca información sobre las funciones y características específicas de estos últimos en la inmunidad de camélidos. Estudios sugieren que la aparición de estos AcCP correspondería a una evolución que favorece el desarrollo de respuestas contra patógenos, facilitando la protección del individuo. Entonces, la ventaja biológica de los AcCP parece consistir en el hecho de que han ampliado el espectro de antígenos sobre los cuales pueden actuar. Sin embargo, la investigación sobre las funciones de los anticuerpos de camélidos se ha visto obstaculizada, en gran medida, por la falta de reactivos específicos (Daley *et al.*, 2010; Hassanzadeh-Ghassabeh *et al.*, 2013).

El objetivo de esta Memoria de Título, era determinar las subclases de IgG en los sueros obtenidos de dos llamas inmunizadas con rTcCRT, una proteína del parásito *T. cruzi*. Al finalizar el trabajo experimental se observó la presencia de la subclase IgG1 en ambas llamas. El método experimental utilizado no puede descartar la posibilidad que estas llamas hayan producido IgG2 e IgG3. Sin embargo, para comprobar o descartar su presencia en el suero de llama se necesitarán nuevas aproximaciones experimentales y técnicas más sensibles.

## BIBLIOGRAFÍA

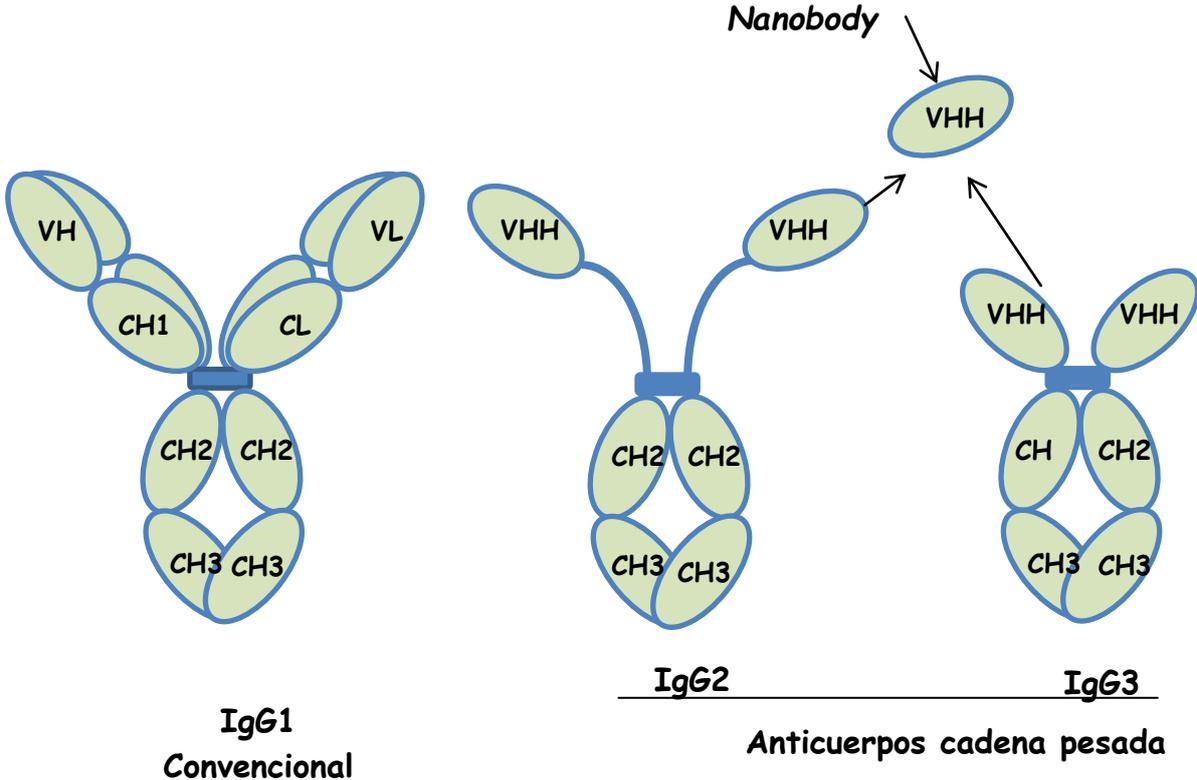
- **AGUILAR, L.; RAMÍREZ, G.; VALCK, C.; MOLINA, M.; ROJAS, A.; SCHWAEBLE, W.; FERREIRA, V.; FERREIRA, A.** 2005. F(ab')<sub>2</sub> antibody fragments against *Trypanosoma cruzi* calreticulin inhibit its interaction with the first component of human complement. *Biol Res* 38: 187-195.
- **CANTISANI, A.; NAPOLITANO, L.; GIUFFRIDA, M.; CONTI, A.** 1990. Direct identification and characterization of llama (*Lama glama* L.) whey proteins by microsequencing after Western blotting. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, 21: 227-236.
- **DALEY, L.; KUTZLER, M.; BENNETT, B.; SMITH, M.; GLASER, A.; APPLETON, J.** 2010. Effector functions of camelid heavy-chain antibodies in immunity to West Nile virus. *Clin Vaccine Immunol.* 17: 239–246.
- **DALEY-BAUER, L.; PURDY, S.; SMITH, M.; GAGLIARDO, L.; DAVIS, W.; APPLETON, J.** 2010. Contributions of conventional and heavy-chain IgG to immunity in fetal, neonatal, and adult alpacas. *Clin Vaccine Immunol.* 17: 2007–2015.
- **DE GENST, E.; SAERENS, D.; MUYLDERMANS, S.; CONRATH, K.** 2006. Antibody Repertoire Development in Camelids. *Dev Com Immunol* 30:187–198.
- **DEVLIN, T. M.** *Bioquímica*, 4ª ed. Barcelona: Reverté, 2004.
- **FERREIRA, V.; MOLINA, M.; SCHWAEBLE, W.; LEMUS, D.; FERREIRA, A.** 2005. Does *Trypanosoma cruzi* calreticulin modulate the complement system and angiogenesis? *Trends Parasitol.* 21(4):169-74.
- **HAMERS-CASTERMAN, C.; ATARHOUCHE, T.; MUYLDERMANS, S.; ROBINSON, G.; HAMERS, C.; BAJYANA SONGA, E.; BENDAHMAN, N.; HAMERS, R.** 1993. Naturally occurring antibodies devoid of light chains. *Nature* 363: 446–448.
- **HASSANZADEH-GHASSABEH, G.; DEVOOGDT, N.; DE PAUW, P.; VINCKE, C.; MUYLDERMANS, S.** 2013. Nanobodies and their potential applications. *Nanomedicine* 8(6).
- **HERRERA, A.** 2011. Las inmunoglobulinas G de los camélidos y sus aplicaciones. SIRIVS.
- **LAEMMLI, U.** 1970. Cleavage of Structural Proteins During the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature* 227(5259): 680-5.

- **MOLINA, M.; FERREIRA, V.; VALCK, C.; AGUILAR, L.; ORELLANA, J.; ROJAS, A.; RAMIREZ, G.; BILLETTA, R.; SCHWAEBLE, W.; LEMUS, D.; FERREIRA, A.** 2005. An in vivo role for *Trypanosoma cruzi* calreticulin in antiangiogenesis. *Molecular and Biochemical Parasitology* 140: 133–140.
- **MUYLDERMANS, S.; BARAL, T.; CORTEZ, V.; DE BAETSELIER, P.; DE GENST, E.; KINNE, J.; LEONHARDT, H.; MAGEZ, S.; NGUYEN, V.; REVETS, H.; ROTHBAUER U.; STIJLEMANS, B.; TILLIB, S.; WERNERY, U.; WYNS, L.; HASSANZADEH- GHASSABEH, G.; SAERENS, D.** 2009. Camelid Immunoglobulins and Nanobody Technology. *Vet Immunol and Immunopathol* 128:178–183.
- **PAIN, C.; DUMONT, J.; DUMOULIN, M.** 2015. Camelid single-domain antibody fragments: Uses and prospects to investigate protein misfolding and aggregation, and to treat diseases associated with these phenomena. *Biochimie*: 82–106.
- **PASTORI, S. Y FUENTEALBA, B.** 2006. Camélidos, Nuevos Avances Tecnológicos y Patentes: Posibilidades y Preocupaciones para la Región Andina. *Documentos de Investigacion* 2(4).
- **PINTO, C.; MARTIN, C.; CID, M.** 2010 Camélidos Sudamericanos: Clasificación, Origen y Características. *Rev Complut Cs Vet* 4 (1): 23-36.
- **RAMIREZ, G.; VALCK, C.; FERREIRA, V.; LOPEZ, N.; FERREIRA, A.** 2011a. Extracellular *Trypanosoma cruzi* calreticulin in the host–parasite interplay. *Trends in Parasitology* 27 (3).
- **RAMIREZ, G.; VALCK, C.; MOLINA, M.; RIBEIRO, C.; LOPEZ, N.; SANCHEZ, G.; FERREIRA, V.; BILLETA, R.; AGUILAR, L.; MALDONADO, I.; CATTAN, P.; SCHWAEBLE, W.; FERREIRA, A.** 2011b. *Trypanosoma cruzi* calreticulin: A novel virulence factor that binds complement C1 on the parasite surface and promotes infectivity. *Immunobiology* 216: 265-273.
- **RIBEIRO C.; LÓPEZ, N.; RAMÍREZ, G.; VALCK, C.; MOLINA, M.; AGUILAR, L.; RODRÍGUEZ, M.; MALDONADO, I.; MARTÍNEZ, R.; GONZÁLEZ, C.; TRONCOSO, R.; LAVANDERO, S.; GINGRAS, A.; SCHWAEBLE, W.; FERREIRA, A.** 2009. *Trypanosoma cruzi* calreticulin: a possible role in Chagas' disease autoimmunity. *Mol Immunol.* 46(6):1092-9.
- **STIJLEMANS, B.; CALJON, G.; KUMAR, S.; SAERENS, D.; CONRATH, K.; PÉREZ-MORGA, D.; SKEPPER, J.; NIKOLAOU, A.; BRYNS, L.; PAYS, E.; MAGEZ, E.; FIELD, M.; DE BAETSELIER, P.; MUYLDERMANS, S.** 2011. High Affinity

Nanobodies against the Trypanosome brucei VSG Are Potent Trypanolytic Agents that Block Endocytosis. PLoS Pathog. 7(6).

- **TOSO, A.; VIAL, F.; GALANTI, N.** 2011. Transmisión de la enfermedad de Chagas por vía oral. Rev Med Chile 139: 258-266.
- **TOWBIN, H.; STAEHELIN T.; GORDON, J.** 1979 Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. Proc Natl Acad Sci U S A. 76(9):4350-4.
- **VANLANDSCHOOT, P.; STORTELEERS, C.; BEIRNAERT, E.; IBANEZ, L.; SCHEPENS, B.; DEPLA, E.; SAELENS, X.** 2011. Nanobodies®: new ammunition to battle viruses. Antiviral Research. 92(3): 389-407.
- **VINCKE, C.; GUTIÉRREZ, C.; WERNERY, U.; DEVOOGDT, N.; HASSANZADEH-GHASSABEH, G.; MUYLDERMANS, S.** 2012. Generation of Single Domain Antibody Fragments Derived from Camelids and Generation of Manifold Constructs. Methods Mol Biol. 907:145-76.
- **WESOLOWSKI, J.; ALZOGARAY, V.; REYELT, J.; MANDY, U.; JUAREZ, K.; URRUTIA, M.; CAUERHV, A.; DANQUAH, W.; RISSIEK, B.; SCHEUPLEIN, F.; SCHWARZ, N.; ADRIOUCH, S.; BOYER, O.; SEMAN, M.; LICEA, A.; SERREZE, D.; GOLDBAUM, F.; HAAG, F.; KOCH, F.** 2009. Single Domain Antibodies: Promising Experimental and Therapeutic Tools in Infection and Immunity. Med Microbiol Immunol 198:157–174.

Anexo 1.



**Figura 1. Subclases de Inmunoglobulinas G de los camélidos.** Se señala el fragmento variable de la cadena pesada de IgG2 e IgG3, conocido como *nanobodie*. Adaptado Myldermans *et al.*, 2009.