

---

## RESUMEN

---

El *Trypanosoma cruzi* es un protozoo hemoflagelado, agente causal de la enfermedad de Chagas o Tripanosomiasis Americana, dolencia endémica y crónica, que afecta a aproximadamente 18 millones de individuos en América Latina. Es un parásito intracelular que convive con su hospedero, por más de 70 años, en un equilibrio del tipo "vivir y dejar vivir". En este contexto son diversos los mecanismos desarrollados por el hospedero para su eliminación y por el parásito para evadirlos, lo que lo hace, sin duda, un modelo fascinante para ser estudiado.

En los últimos años hemos clonado, secuenciado y expresado el gen de calreticulina de *T. cruzi* (TeCRT), proteína de 45kDa, electroforéticamente dimórfica e inmunogénica [1-5]. Esta molécula fue descrita, por primera vez, en 1991 en el laboratorio donde se desarrolló esta Tesis, como Te45, un antígeno de *T. cruzi* inmunogenéticamente restringido en ratones [6]. Posee 41% de homología con calreticulina de *Leishmania donovani* y más de un 50% con calreticulina humana (HuCRT) [1]. TeCRT está presente en la superficie de tripomastigotes, une C1q y MBL, inhibiendo la ruta clásica del sistema del complemento [7]. Su gen se localiza en diversos cromosomas [1].

Calreticulina (CRT) de mamíferos es una proteína multifuncional altamente conservada que une calcio, está presente en todas las células de los organismos superiores, excepto eritrocitos. Regula más de 40 funciones claves, entre ellas se incluyen: chaperona del tipo lectina, señalización y almacenamiento del calcio, modulación de la expresión génica, adhesión celular, fagocitosis de células apoptóticas por unión a C1q, inhibición de la angiogénesis y del crecimiento tumoral, inhibición de la actividad lítica de las perforinas de células T y NK, e inhibición de la activación del complemento dependiente de C1q. Igualmente, calreticulina está presente en diversos compartimentos subcelulares.

El documento de esta Tesis se divide en 9 capítulos, de los cuales el primero es una revisión bibliográfica y en los **capítulos 6, 7 y 8**, se incluyen revisiones que hemos publicado, recientemente, sobre el rol de calreticulina de parásitos en su interacción con el hospedero vertebrado, en *Inmunología*, 2002 [8] y *Molecular Immunology*, 2004 [9], y *Trends in Parasitology*, 2005[10], respectivamente. En el **capítulo 9** se incluye una discusión general del documento de esta Tesis y en el resto de los capítulos se presentan resultados.

Paralelamente al desarrollo de esta Tesis, y de particular interés ha resultado la habilidad de TeCRT para combinarse específicamente con componentes iniciales del Sistema del Complemento (C1q y MBL), lo que resulta en una importante inhibición de la ruta clásica del complemento humano [9]. Es posible, entonces, que *T. cruzi* utilice a TeCRT para modular, en su beneficio, este importante brazo efector de la respuesta

inmune. En el **capítulo 2** analizamos, en el modelo murino, la capacidad inmunogénica de TcCRT, como proteína recombinante (TcCRTr) y de plasmidios portadores de fragmentos del gen que codifica TcCRT. También, se muestran experimentos preliminares de desafío con tripomastigotes sanguíneos de *T. cruzi*, cepa Tulahuén y se analiza la inmunidad pasiva, inducida por anticuerpos policlonales lapinos anti el dominio funcional S, de unión a C1q, de TcCRT. Demostramos, en ensayo ELISA, que TcCRTr es inmunogénica en ratones BALB/c y que los anticuerpos generados reconocen la proteína nativa mediante inmunofluorescencia indirecta por microscopia convencional. La inoculación de DNA desnudo con pSec.K2, en ratones BALB/c, genera inmunidad humoral específica anti TcCRT, analizado en ensayos ELISA. Mediante análisis de citometría de flujo, estos anticuerpos reconocen la proteína nativa en el interior y en la superficie de los parásitos, confirmando la expresión intracelular y extracelular de esta proteína. Previamente habíamos demostrado que IgG de ratones A.SW (*H2<sup>d</sup>*) inmunizados con tripomastigotes o epimastigotes de *T. cruzi* y suero de pacientes humanos infectados reconocían Tc45 [1, 3, 5]. Además, se generaron anticuerpos monoclonales anti TcCRT y tres plasmidios, portadores del gen de *TcCRT*; pcDNA.K1, pcDNA.K2 y pSec.K2.

Dado que TcCRT posee un segmento con 46% de identidad y 60% de positividad con el fragmento funcional descrito con propiedad antiangiogénica de HuCRT (aa 120-180) y que, sorprendentemente, en ratones y ratas infectados con *T. cruzi* se observa una disminución, e incluso desaparición, del crecimiento de diversos tumores trasplantables y espontáneos, en el **capítulo 3** analizamos el efecto antiangiogénico de TcCRT, en un ensayo, *in vivo*, en membrana alantocoriónica de embriones de pollo (CAM). Utilizamos proteína nativa y recombinante, la construcción plasmidial pSec.K2, que porta el gen de *TcCRT*, sin sus secuencias líder y de retención en el retículo endoplásmico (KDEL) y Betametasona, como control positivo. La capacidad productiva del constructo génico fue verificada por citometría de flujo, mostrando que sueros de ratones inmunizados con el plasmidio recombinante reconocen TcCRT en tripomastigotes de *T. cruzi*, fijados y vivos. TcCRT y pSec.K2 indujeron un efecto antiangiogénico altamente significativo en ensayos CAM *in vivo*. Los resultados mostrados aquí indicarían que TcCRT, como su contraparte humana, tiene propiedades antiangiogénicas. Probablemente, el efecto antiangiogénico de esta sustancia ocurre preferentemente sobre el crecimiento de tejidos neoplásicos, pero no en tumores establecidos; debido a su efecto sobre la formación de nuevos vasos. Estas propiedades, podrían explicar, al menos en parte, la actividad antineoplásica observada en infecciones experimentales con *T. cruzi*. En este Capítulo, se adjunta un trabajo publicado en *Molecular and Biochemical Parasitology*, 2005[11], en el cual mostramos estos resultados. Como información anexa a este documento se agrega la **Figura 51**, donde se muestra la vasculatura de membranas tratadas o no con TcCRTr.

En el **capítulo 4** se presentan resultados donde se observa que TcCRT es una molécula electroforéticamente dimórfica, codificada por múltiples genes localizados en cromosomas cuyo número varía en función de la cepa o clon parasitario y, aparentemente, en el número de copias de genes que codificaría TcCRT presentes en cada cromosoma. En este sentido, se observan desde dos bandas, entre 1.125 y 2.000 kb, en el clon CL Brener y cepas colombianas 2 y 3, hasta en cuatro diferentes cromosomas en las cepas Tulahuén,

e Y y en el clon DM 28c. Además, se analiza, en geles de electroforesis de campo pulsado (PFGE), la presencia del gen de *TcCRT* en clones de *T. rangeli*. Se observa una señal muy débil, por lo que podría pensarse que el número de copias del gen por cromosoma es muy bajo y/o la secuencia del gen es lo suficientemente diferente como para dificultar la hibridación. Por otra parte, en geles de poliacrilamida en presencia de SDS (SDS-PAGE), en condiciones reductoras, *TcCRT* muestra un dimorfismo electroforético de 43 y 46 kDa, lo que permitiría clasificar a las cepas en dos grupos definidos. Aún desconocemos el significado funcional y la naturaleza bioquímica de la heterogeneidad cromosómica y del dimorfismo electroforético de *TcCRT*. Estos hechos sugieren que en *T. cruzi* existe una familia de CRTs o moléculas homólogas, abriendo la posibilidad de una variedad de funciones, quizás relevantes en la relación hospedero/parásito. En este Capítulo, se adjunta un trabajo publicado en *Am J Trop Med Hyg*, 2000, en el cual mostramos, entre otros datos, los primeros resultados en PFGE, describimos el dimorfismo electroforético de *TcCRT* y el uso del anticuerpo monoclonal E2G7, generado en el contexto de esta Tesis, para el clonamiento y expresión de *TcCRT*.

Ya fuera del contexto de esta Tesis, será de interés el verificar si Calreticulina del insecto triatomino, al igual que la de otros hematófagos [12], es secretada vía salival y si mantiene la propiedad de unirse a C1(q, r, s) y/o MBL-MAPS, de diversos hospederos potenciales. De ser así, el artrópodo se protegería de posibles mecanismos citotóxicos, mediado por el complemento, sobre la mucosa digestiva. Por ello, incluimos en el **capítulo 5** un trabajo, recientemente, publicado en *Parasitology Research*, 2004 [13], con relación a los hábitos alimenticios de *Mepraia spinolai*. Este es un vector artrópodo silvestre de *T. cruzi*, agente importante, al menos, en la mantención del ciclo parasitario. Allí propusimos un simple ensayo para evaluar la importancia de siete especies vertebradas como fuente de alimentación de *M. spinolai*. Conejos fueron inmunizados con proteínas séricas de cada una de las siete especies. Luego de titular, una dilución consenso de 1/100.000 de los sueros inmunes detecta proteínas séricas vertebradas en el 18.9% de contenido intestinal de 131 insectos probados. La mayor proporción de muestras negativas es consistente con informaciones previas que indican que estos insectos pueden resistir períodos prolongados de ayuno. Alternativamente, ellos se pudieron haber alimentado con sangre de especies de animales diferentes de aquellos de los cuales se generó el antisuero. En aproximadamente el 70% de las muestras positivas, se detectó un solo origen vertebrado de las proteínas séricas. Todos los sueros preinmunes dieron señal negativa. En 67% de los vectores positivos, se detectaron inmunoglobulinas de conejo directamente por medio de un anticuerpo de cabra específico. Así, los conejos silvestres, podrían jugar un papel en la transmisión de *T. cruzi*. Estos resultados son complementarios a los ya publicados en *J Med Entomol*, 2001 [14].

Por otra parte, a pesar de haber participado en otras iniciativas relacionadas con *TcCRT*, solo las cito y comento brevemente, cuando es relevante, pues forman parte de otras tesis y de publicaciones en las que soy coautora.

En el **anexo 1**, se adjunta la secuencia nucleotídica del gen *TcCRT*, y su traducción, publicada por nosotros, en la base de datos de GenBank vía NCBI (National Center for Biotechnology Information), el 22 de Julio de 1999, con el número de acceso AF162779.

Esta Tesis fue financiada con recursos estatales de los Proyecto del Fondo de Fomento al Desarrollo Científico y Tecnológico (FONDEF/CONICYT) números 1010930, 1970878 y 2010069.