

INDICE

	Materia	Página
INDICE		i
LISTAS DE ABREVIATURAS		v
RESUMEN		1
CAPITULO 1. – INTRODUCCIÓN		5
1.1.- ENFERMEDAD DE CHAGAS O TRIPANOSOMIASIS AMERICANA.....		5
1.1.1.- Definición.....		5
1.1.2.- Historia.....		5
1.1.3.- Epidemiología.....		6
1.1.4.- <i>Trypanosoma cruzi</i> y Su Ciclo de Vida.....		7
1.1.4.1.- Biología del Parásito (Estructuras, Organelos y Procesos Biológicos).....		7
1.1.4.2.- Estructura.....		9
1.1.4.3.- Ciclo de Vida.....		13
1.1.5.- Vectores.....		17
1.1.6.- Otras Formas de Propagación de la Enfermedad.....		18
1.1.7.- Evolución y Manifestación Clínicas de la Enfermedad de Chagas.....		19
1.1.8.- Respuesta Inmune.....		20
1.1.9.- Mecanismos de Evasión.....		25
1.1.10.- Patogénesis de la Enfermedad de Chagas.....		32
1.1.11.- Efecto Anti Neoplásico en Infecciones con <i>T. cruzi</i>		33
1.1.12.- Diagnóstico.....		34
1.1.13.- Quimioterapia e Inmunoprofilaxis.....		35
1.1.13.1.- Inmunoprofilaxis.....		35
1.2.- INMUNIZACIÓN GENÉTICA.....		36
1.3.- CALRETICULINA.....		38
1.3.1.- Generalidades.....		38
1.3.2.- Calreticulina y Antiangiogenesis.....		40
1.3.3.- Calreticulina de <i>T. cruzi</i> (TcCRT).....		41

CAPITULO 2. - ANÁLISIS DE LA CAPACIDAD INMUNOGÉNICA ACTIVA DE TCRT EN EL MODELO MURINO: INMUNIDAD ACTIVA INDUCIDA CON LA PROTEÍNA RECOMBINANTE Y CON EL GEN CODIFICANTE. INMUNIDAD PASIVA, INDUCIDA POR ACS POLICLONALES LAPINOS. EXPERIMENTOS PRELIMINARES DE DESAFÍO CON TRIPOMASTIGOTES SANGUÍNEOS.....		45
2.1.-	INTRODUCCIÓN.....	45
2.2.-	HIPÓTESIS.....	45
2.3.-	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	45
2.4.-	MATERIALES Y MÉTODOS.....	46
2.4.1.-	<i>Parásitos</i>	46
2.4.1.1.-	Epimastigotes de Cultivo.....	46
2.4.1.2.-	Tripomastigotes de Cultivos Celulares.....	46
2.4.1.3.-	Tripomastigotes Sanguíneos.....	46
2.4.2.-	<i>Animales y Sueros</i>	47
2.4.2.1.-	Animales.....	47
2.4.2.2.-	Sueros Murinos.....	47
2.4.3.-	<i>Reactivos Generados</i>	48
2.4.3.1.-	Anticuerpos Monoclonales Anti TcCRT.....	48
2.4.3.2.-	Extractos Parasitarios.....	48
2.4.3.3.-	TcCRT Nativa, Extracto Semipurificado.....	49
2.4.3.4.-	TcCRT Recombinante (TcCRTr).....	49
2.4.3.5.-	Vectores de Expresión Para Eucariontes.....	50
2.4.4.-	<i>Procedimientos y Técnicas Bioquímicas e Inmunoquímicas</i>	53
2.4.4.1.-	Determinación de Proteínas.....	53
2.4.4.2.-	Purificación de IgG por Cromatografía de Afinidad.....	53
2.4.4.3.-	Marcación Proteínas con ¹²⁵ I.....	53
2.4.4.4.-	Ensayos Inmunoenzimáticos (ELISA).....	54
2.4.4.5.-	Ensayo Inmuno radiométrico (IRMA).....	54
2.4.4.6.-	Inmunofluorescencia con Parásitos.....	55
2.4.4.7.-	Inmunoelectrotransferencia (IET).....	56
2.4.5.-	<i>Procedimientos y Técnicas de Biología Molecular</i>	58
2.4.5.1.-	Preparación de RNA.....	58
2.4.5.2.-	Preparación de DNA.....	58
2.4.5.3.-	PCR.....	61
2.4.5.4.-	Calculo de la Concentración de DNA y RNA.....	61
2.4.5.5.-	Producción de <i>E. coli</i> Competentes.....	62
2.4.5.6.-	Transformación Química de Bacterias.....	62
2.4.5.7.-	Electroforesis en Gel de Agarosa.....	62
2.4.5.8.-	Expresión <i>in vitro</i> del Antígeno TcCRT.....	62
2.4.6.-	<i>Inmunizaciones</i>	63
2.4.7.-	<i>Ensayos de Protección</i>	66
2.4.7.1.-	Ensayos de Protección en Animales Inmunizados con DNA y Proteína recombinante.....	66
2.4.7.2.-	Determinación de Capacidad Protectora Pasiva del AcPo de Conejo anti Domino S de TcCRT.....	67
2.4.8.-	<i>Materiales</i>	67
2.4.8.1.-	Bacterias.....	67
2.4.8.2.-	Líneas celulares.....	67

2.4.8.3.- Plasmidios.....	68
2.4.8.4.- Partidores.....	69
2.4.8.5.- Sistemas Comerciales.....	69
2.4.8.6.- Soluciones.....	70
2.4.8.7.- Reactivos Generales o Comerciales.....	72
2.4.9.- <i>Análisis Estadístico</i>	74
2.5.- RESULTADOS.....	75
2.5.1.- <i>Caracterización de TcCRT: Análisis Bioinformático</i>	75
2.5.2.- <i>Generación de Productos con Potencial Biotecnológicos</i>	77
2.5.2.1.- Anticuerpos Monoclonales anti TcCRT.....	77
2.5.2.2.- Vectores que Expresan el Gen Completo o Fragmentos de <i>TcCRT</i> en Sistemas Eucariontes.....	79
2.5.3.- <i>Expresión del Gen de TcCRT en Ensayos in vitro</i>	85
2.5.3.1.- pcDNA.K1.....	85
2.5.3.2.- pcDNA.K2.....	87
2.5.3.3.- pSec.K2.....	88
2.5.4.- <i>Inmunización</i>	88
2.5.4.1.- Inmunización con TcCRT.....	89
2.5.4.2.- Inmunización con pcDNA.K1 y pcDNA.K2.....	91
2.5.4.3.- Inmunización con pSec.K2.....	95
2.5.4.4.- Inmunización con pSec.K2, pcDNA.K2 y TcCRT.....	98
2.5.5.- <i>Algunos Ensayos Preliminares de Desafío con Trypomastigotes</i>	101
2.5.5.1.- Animales Inmunizados con TcCRT.....	101
2.5.5.2.- Inmunización Pasiva con AcPo de Conejo anti TcCRT.....	103
2.5.5.3.- Animales Inmunizados con pcDNA.K1, pcDNA.K2 y pSec.K2.....	104
2.5.5.4.- Animales Inmunizados con pSec.K2, pcDNA.K2 y TcCRT.....	105
2.6.- DISCUSION.....	109
CAPITULO 3.- ROL ANTIANGIOGÉNICO, IN VIVO, DE CALRETICULINA DE TRYPANOSOMA CRUZI.....	117
3.1.- HIPÓTESIS.....	117
3.2.- OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	117
3.3.- RESUMEN.....	117
3.4.- Publicación: Molina MC y col. (2005) "An <i>in vivo</i> role for <i>Trypanosoma cruzi</i> calreticulin in anti-angiogenesis". <i>Mol Biochem Parasitol</i> . En prensa.....	119
CAPITULO 4.- TC45, UNA PROTEÍNA DIMÓRFICA E INMUNOGÉNICA DE TRYPANOSOMA CRUZI, CON LOCALIZACIÓN CROMOSÓMICA VARIABLE, ES CALRETICULINA.....	129
4.1.- HIPÓTESIS.....	129
4.2.- OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	129
4.3.- RESUMEN.....	129
4.4.- LOCALIZACIÓN CROMOSÓMICA DEL GEN QUE CODIFICA <i>TcCRT</i>	130

4.5.-	DIMORFISMO ELECTROFORÉTICO.....	132
4.6.-	Publicación: Aguillón JC, y col. (2000) "Tc45, a Dimorphic <i>Trypanosoma cruzi</i> Immunogen with Variable Chromosomal Localization, is Calreticulin" <i>Am J Trop Med Hyg</i> 63:306-312	135
CAPITULO 5. - UN SIMPLE ENSAYO INMUNOMÉTRICO PARA ESTUDIAR EL HÁBITO ALIMENTICIO DE MEPRALIA SPINOLAI, UN VECTOR DE TRYPANOSOMA CRUZI.		143
	Publicación: Molina MC y col. (2004) "A Simple Immunometric Assay to Assess the Feeding Habits of <i>Meprai spinolai</i> , a <i>Trypanosoma cruzi</i> Vector" <i>Parasitol Res</i> 92:375-379.....	145
CAPITULO 6. - CALRETICULINA DE PARÁSITO: POSIBLES ROLES ENTRE PARÁSITO/HOSPEDERO.....		151
	Publicación: FerreiraV, Molina MC, y col. (2002) "Parasite Calreticulin: Possible Roles in the Parasite/Host Interface". <i>Inmunología</i> 21:156-168.....	153
CAPITULO 7. - ROL DE CALRETICULINA DE PARÁSITOS EN SU INTERACCIÓN CON EL HOSPEDERO VERTEBRADO.		167
	Publicación: Ferreira V, Molina MC, y col. (2004) "Role of Calreticulin from Parasites in its Interaction with Vertebrate Hosts". <i>Molecular Immunology</i> 40:1279-1291.....	169
CAPITULO 8. - ¿CALRETICULINA DE T. CRUZI MODULA EL SISTEMA DEL COMPLEMENTO Y LA ANGIOGÉNESIS?.....		183
	Publicación: Ferreira V, Molina MC y col. (2005) "Does <i>Trypanosoma cruzi</i> Calreticulin Modulate the Complement System and Angiogenesis?" <i>Trends in Parasitology</i> , en prensa	185
CAPITULO 9. - DISCUSIÓN GENERAL.		191
DOCUMENTOS ANEXOS.		195
	ANEXO 1. - SECUENCIA NUCLEOTÍDICA DEL GEN DE TCRT, TRADUCCIÓN DEL GEN.	195
BIBLIOGRAFIA		197
	PÁGINAS WEB.	197
	REFERENCIAS.	199