



**UNIVERSIDAD
SAN SEBASTIAN**
UNIVERSIDAD SAN SEBASTIÁN
FACULTAD DE MEDICINA Y CIENCIA
ESCUELA DE BIOQUÍMICA
SEDE SANTIAGO

**ROL DE GALECTINA-8 EN LA ADHESIÓN DE LEUCOCITOS AL
ENDOTELIO DEPENDIENTE DE ÓXIDO NÍTRICO**

Seminario para optar al grado académico de Bioquímico

Profesora tutora: Dra. Andrea Soza
Profesor co-tutor: Dra. Fabiola Sánchez
Alumna: Sofia Millaray Leiva Madariaga

© Sofía Millaray Leiva Madariaga

Queda prohibida la reproducción parcial o total de esta obra en cualquier forma, medio o procedimiento sin permiso por escrito del o los autores.

Santiago, Chile
2022

En _____, el ___ de ___ de ___ los abajo firmantes dejan constancia que el (la) estudiante _____ de la carrera de _____ ha aprobado el seminario para optar al título de _____ con una nota de _____.

Dra. Marcela Bravo Zehnder

Dra. Claudia Metz Bae

Dra. Cheril Tapia Rojas

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, quisiera agradecer a todos los integrantes del laboratorio de la Dra. Andrea Soza Gajardo, especialmente a la líder del equipo quien fue mi tutora y me acompañó en todo el proceso, también a las estudiantes de doctorado Francisca Pérez, Nicol Díaz y la Dra. Elisa Pérez por todas sus enseñanzas, consejos y motivación además de agradecer el haber confiado en mí y guiarme en esta última etapa.

Por otro lado, quisiera agradecer a cada uno de los docentes que hizo parte de este proceso integral de formación.

Finalmente agradezco a mi familia, mi pareja y amistades por el apoyo, la comprensión y amor que me han dado a lo largo de todo este proceso. Ha sido un camino de altos y bajos donde su apoyo a sido fundamental para la culminación de este proceso.

**INFORME ESCRITO
AVANCE N°3
SEMINARIO TÍTULO BIOQ1039**

1. DATOS ESTUDIANTE:	
NOMBRE:	Sofia Millaray Leiva Madariaga
RUT:	19.984.271-4
CORREO ELECTRÓNICO:	sleivam@correo.uss.cl
2. DATOS TUTOR:	
NOMBRE:	Andrea Soza
RUT:	10.065.359-1
CORREO ELECTRÓNICO:	Andrea.soza@uss.cl
CO-TUTOR:	Fabiola Sánchez
3. DATOS SEMINARIO DE TÍTULO:	
TÍTULO:	Rol de Galectina-8 en la adhesión de leucocitos al endotelio dependiente de óxido nítrico
SEMESTRE REALIZACIÓN:	
FECHA DE ENTREGA:	
NOTA	Uso interno



UNIVERSIDAD SAN SEBASTIAN

SEMINARIO DE TÍTULO

**ROL DE GALECTINA-8 EN LA ADHESIÓN DE LEUCOCITOS AL ENDOTELIO DEPENDIENTE DE
ÓXIDO NÍTRICO**

NOMBRE ESTUDIANTE

Sofia Millaray Leiva Madariaga

TUTORA

Andrea Soza

COTUTOR

Fabiola Sánchez

FECHA DE ENTREGA

Viernes, 24 de junio del 2022

Santiago, Chile

SEMINARIO DE TÍTULO 2020

LISTA DE CHEQUEO

INDICE		SI	NO	PAGINA
I	Aspectos Generales	X		4
I.1.	Investigador(a) Responsable	X		4
I.2.	Institución Patrocinante	X		5
I.3.	Financiamiento adicional comprometido por otras Instituciones interesadas en el Proyecto	X		5
I.4.	Resumen de Recursos Solicitados	X		5
I.5.	Objeto(s) de Estudio	X		6
II.	Resumen	X		9
III.	Formulación del Proyecto, Marco Teórico y Discusión Bibliográfica	X		10
IV.	Referencias Bibliográficas	X		13
V.	Hipótesis de Trabajo	X		18
VI.	Objetivos	X		18
VII.	Metodología	X		19
VIII.	Plan de Trabajo	X		23
IX.	Trabajo Adelantado por el(la) Investigador(a) Responsable		X	No aplica
X.	Recursos Disponibles	X		24
XI.	Detalle y justificación de recursos solicitados	X		25
XII.	Anexos:			
	Certificado de Ética, Bioética, Bioseguridad, Permisos y Otros	X		32
	Certificado Instituto Antártico Chileno (INACH)		X	No aplica
	Certificado de Publicaciones Aceptadas y/o En prensa		X	No aplica
	Cotizaciones, Facturas Proforma y Otros documentos	X		34

I. ASPECTOS GENERALES

Tipo Proyecto	Investigación	Consejo	1	<ol style="list-style-type: none"> 1. Ciencia 2. Tecnología 3. 	Duración (máximo años)	1

TÍTULO:	ROL DE GALECTINA-8 EN LA ADHESIÓN DE LEUCOCITOS AL ENDOTELIO DEPENDIENTE DE ÓXIDO NÍTRICO
----------------	--

Escriba 3 palabras claves que identifiquen la propuesta

Galectina-8	Óxido nítrico	VCAM-1
-------------	---------------	--------

Disciplina Principal (máx. 1) (*)	41	Disciplina Secundaria (máx. 2) (*)	43
Disciplina OCDE (máx. 1) (*)	1.6	Región de Aplicación (ej. IV Región)	RM
Sector de Aplicación (máx. 1) (*)	30		

(*) Para completar la información requerida, utilice los códigos disponibles en la sección bases de datos y documentos, en <http://www.conicyt.cl/fondecyt/2013/03/15/concurso-iniciacion-en-investigacion-2013/>.

I.1. INVESTIGADOR(A) RESPONSABLE

Leiva	Madariaga	Sofia Millaray	19.984.271-4
Apellido Paterno	Apellido Materno	Nombres	RUN o Pasaporte
Enrique Rodríguez Merino 1567, Buin, Santiago, Chile			
Dirección para envío de correspondencia (Calle, Nº, Depto., Comuna, Ciudad y País)			
sleivam@correo.uss.cl		(56) 9 4136 0588	
Dirección de correo electrónico		Teléfono	

I.2. INSTITUCION PATROCINANTE

Universidad San Sebastián / Facultad de Medicina y Ciencia /Escuela de Bioquímica
Universidad/Facultad/Departamento

I.3. FINANCIAMIENTO ADICIONAL COMPROMETIDO POR OTRAS INSTITUCIONES INTERESADAS EN EL PROYECTO. Sólo considere, si los hay, aportes comprometidos por otras entidades o instituciones interesadas en los resultados y que co-financiarían el proyecto. Adjunte carta de compromiso.

INSTITUCIÓN	TOTAL APORTE (m\$)
No aplica	No aplica
No aplica	No aplica
TOTAL	-

I.4. RESUMEN DE RECURSOS SOLICITADOS (m\$)

DESGLOSE PRESUPUESTARIO	Montos Anuales (m\$)		
	SEMESTRE 1	SEMESTRE 2	TOTAL
Personal	3.500	3.300	6.800
Viajes para el proyecto	0	2.720	2.720
Viajes para Cooperación Internacional	0	0	0
Gastos de Operación	6.300	7.850	14.150
Bienes de Capital	0	0	0
Total Solicitado	9.800	13.870	23.670

I.5. OBJETO(S) DE ESTUDIO

Su proyecto involucra estudios en/con*:	Marque con una X
Seres humanos y/o material biológico humano	X
Animales, muestras animales y/o material biológico	
Material que represente riesgo en Bioseguridad	X
Sitios arqueológicos	
Especies protegidas, áreas silvestres protegidas, internación de especies	
Archivos y/o bases datos que contengan información sensible	
No aplica: (incluir justificación)	

*Debe adjuntar en anexos Carta de Consentimiento informado y/o protocolo animal. Revise manual de Bioseguridad de CONICYT en http://www.conicyt.cl/fondecyt/files/2012/09/articles-30555_recurso_1.pdf.

Adjunta a su postulación todos los **documentos** requeridos:
(marque con una X)

SI NO

Este archivo debe contener un máximo de **18 páginas**, incluyendo secciones obligatorias y opcionales. Secciones obligatorias: Resumen, Introducción, Referencias Bibliográficas, Hipótesis, Objetivos, Metodología, Plan de Trabajo. No se incluye en este máximo la sección de resultados.

Se recomienda mantener el formato tamaño carta, fuente Verdana tamaño 10 y extensión sugerida para cada sección.

Nombre Inv. Responsable:	Sofia Millaray Leiva Madariaga
Título Proyecto:	ROL DE GALECTINA-8 EN LA ADHESIÓN DE LEUCOCITOS AL ENDOTELIO DEPENDIENTE DE ÓXIDO NÍTRICO

- II. RESUMEN:** que describa los principales puntos que se abordarán. **La extensión máxima de esta sección es de 1 página tamaño carta** (utilizar formato tamaño carta, fuente Verdana tamaño 10 o similar).
- III. INTRODUCCIÓN.** Esta sección debe incluir los fundamentos teóricos-conceptuales y estado del arte que sustentan la propuesta. **Extensión sugerida: 5 páginas.** Asegúrese de destacar el potencial impacto y novedad científica o tecnológica de su propuesta (utilizar formato tamaño carta, fuente Verdana o similar tamaño 10).
- IV. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS:** Incluya en esta sección, el listado de referencias bibliográficas citadas en la sección Introducción. **Extensión sugerida: 5 páginas.** Utilizar formato APA USS (American Psychological Association).
- V. HIPÓTESIS DE TRABAJO:** Explícite la(s) pregunta(s) que orientará(n) la investigación propuesta y la hipótesis de trabajo. **Extensión máxima sugerida: ½ página.**
- VI. OBJETIVOS:** Especifique el objetivo general y los objetivos específicos con los cuales espera validar la hipótesis propuesta. **Extensión máxima sugerida: ½ página.**
- VII. METODOLOGÍA:** Describa la estrategia experimental y los métodos que planea utilizar, fundamentando técnicamente su elección para abordar cada uno de los objetivos propuestos. Incluya, si es pertinente a su proyecto, completa descripción del diseño experimental (cuantitativo o cualitativo), elección de tamaños muestrales, uso de bases de datos, archivos, metodología para el análisis estadístico de los resultados y cualquier otro elemento que se requiera para comprender su estrategia para desarrollar los objetivos. **Extensión sugerida: 5 páginas.**

VIII. PLAN DE TRABAJO: En relación con los objetivos planteados, señale las etapas y actividades para cada mes de ejecución de la propuesta a través de una carta Gantt.
Extensión sugerida: 1 página.

IX. TRABAJO ADELANTADO POR INVESTIGADOR(A) RESPONSABLE: Sección opcional, si corresponde, resume los principales resultados de sus trabajos anteriores sobre el tema a investigar.

X. RECURSOS DISPONIBLES:

Identifique claramente los medios y recursos con que cuenta la Institución Patrocinante para realizar el proyecto, provenientes tanto de FONDECYT u otras fuentes de financiamiento. Por ejemplo: conexión a Internet, equipamiento, suscripciones a revistas, software y licencias disponibles, etc. **(letra tamaño 10, Verdana).**

RESUMEN

El proceso de adhesión de leucocitos al endotelio es un evento crucial en la respuesta inflamatoria. Este proceso se encuentra regulado por diversas proteínas incluyendo a la molécula de adhesión VCAM-1, una glicoproteína encargada de mediar la adhesión firme de los leucocitos al endotelio. Si bien los niveles basales de VCAM-1 en la membrana plasmática son bajos ubicándose mayoritariamente a nivel intracelular, durante un proceso inflamatorio VCAM-1 es translocada a la superficie de células endoteliales. El rol del óxido nítrico en la adhesión de leucocitos al endotelio es controversial. Por un lado, en células endoteliales sanas existe un nivel basal de óxido nítrico producido por la enzima óxido nítrico sintasa (eNOS) otorgando propiedades anti-adhesivas al endotelio. Por otro lado, se ha demostrado que en un contexto inflamatorio el óxido nítrico (NO) puede favorecer la adquisición de características adhesivas en células endoteliales. No está totalmente claro el rol del NO en la expresión de moléculas de adhesión. Galectina-8 (Gal-8), una proteína de unión a carbohidratos, secretada por las células endoteliales promueve unión de leucocitos. Recientemente, nuestro laboratorio demostró que Gal-8 adicionada a células endoteliales activa eNOS, promoviendo la producción de óxido nítrico. Por lo tanto, en este proyecto se plantea lo siguiente:

Hipótesis: "Galectina-8 promueve la producción de óxido nítrico favoreciendo la adhesión de leucocitos al endotelio mediado por un incremento de VCAM-1 en la superficie celular."

Objetivo general: Analizar el efecto del óxido nítrico inducido por Galectina-8 en la adhesión de leucocitos al endotelio mediado por un aumento de VCAM-1 en la superficie celular.

Objetivos específicos:

1. Determinar si el óxido nítrico inducido por Galectina-8 genera un aumento de la adhesión de leucocitos al endotelio.
2. Determinar si el aumento de VCAM-1 en la superficie celular es dependiente de óxido nítrico inducido por Galectina-8.
3. Determinar si la adhesión de leucocitos inducida por Galectina-8 depende del aumento de VCAM-1 en la superficie celular.

Metodología: Mediante las técnicas de biotinylation, Inmunoblot, siRNA de VCAM-1, transfección de VCAM-GFP y FRAP se evaluará niveles de la proteína VCAM-1 en la superficie de células endoteliales EAhy 926 en ausencia y presencia de Gal-8 recombinante.

Resultados esperados: Esperamos encontrar un aumento de la adhesión de los leucocitos a las células endoteliales en respuesta a la estimulación con Gal-8 dependiente de la producción de óxido nítrico a través del aumento de la expresión de VCAM-1 en la superficie de células endoteliales.

Relevancia: Esperamos que nuestros resultados ayuden a entender el mecanismo por el cual Gal-8 aumenta la adhesión de leucocitos al endotelio.

INTRODUCCION

Adhesión de leucocitos al endotelio en respuesta inflamatoria

El endotelio vascular, es una monocapa de células endoteliales que constituye el revestimiento celular interno de arterias, venas y capilares (Kruger, Blocki, Franke y Jung, 2019). El endotelio desempeña un amplio número de funciones, entre ellas controla el tráfico de células inflamatorias hacia la pared del vaso (Badimon y Martínez, 2002; Kruger, et al., 2019). El reclutamiento de leucocitos al sitio de la lesión es un evento crucial en la regulación de una respuesta inflamatoria (Lightfoot, McGrettrick y Iqbal, 2021), un proceso altamente regulado por proteínas del endotelio y leucocitos circulantes (Krautter y Iqbal, 2021). Las moléculas de adhesión de las células endoteliales son glicoproteínas de membrana plasmática bien definidas que desempeñan un papel importante en el reclutamiento de células del torrente sanguíneo y señalización celular. Las tres familias de moléculas de adhesión celular presentes en el glucocáliz endotelial son selectinas, integrinas y proteínas de la superfamilia de las inmunoglobulinas como ICAM-1 y VCAM-1 (Reitsma, Slaaf, Vink, Zandvoort y Egbrink, 2007; Krautter y Iqbal, 2021). La adhesión leucocitaria comienza por el proceso de marginación donde las fuerzas hemodinámicas facilitan el movimiento de los leucocitos hacia el endotelio venular (Lightfoot, et al., 2021). Luego las selectinas presentes en la membrana endotelial interactúan con sus ligandos, que son glicoproteínas como PSGL-1 presentes en la membrana del leucocito (Ley, et al., 2007), generando la desaceleración de los leucocitos (Nourshargh y Alon, 2014). De manera simultánea, las quimioquinas secretadas por el endotelio o células presentes en el tejido inflamado, interactúan con sus receptores presentes en los leucocitos induciendo su activación y favoreciendo cambios conformacionales en las integrinas mejorando su afinidad, lo que permite la adhesión firme de leucocitos a la membrana endotelial mediada por la unión de la molécula de adhesión intercelular 1 (ICAM-1) y la molécula de adhesión celular vascular 1 (VCAM-1) a las integrinas de leucocitos VLA-4, LFA-1 y Mac-1 (Krautter y Iqbal, 2021). Por último, la migración de leucocitos a través del endotelio se produce tanto de forma paracelular o transcelular (Lightfoot, et al., 2021).

Rol de VCAM-1 en respuesta inflamatoria

Las moléculas de adhesión son reguladores críticos de la función celular, integridad de los tejidos y homeostasis. No sólo median interacciones célula a célula, sino que también a través de asociación con el citoesqueleto celular y varias proteínas adaptadoras desencadenando eventos de señalización intracelular en respuesta a señales específicas (Bui, Wiesolek y Sumagin, 2020). Las moléculas de adhesión son ICAM-1 y VCAM-1, las cuales se encuentran presentes en niveles bajos en la membrana plasmática endotelial. En la respuesta inflamatoria el aumento de la capacidad adhesiva de ICAM-1 se encuentra principalmente asociado al proceso de "agrupamiento". Los niveles bajos de ICAM-1 en la superficie se encuentran en un estado inactivo, la asociación lateral entre las proteínas ICAM-1, se reagrupen e interactúan generando un aumento en afinidad por las integrinas aumentando la adhesión (Aguilar, 2021). Para VCAM-1 se ha descrito que el aumento de su expresión en la superficie depende de un aumento en el movimiento vesicular hacia la superficie celular (Aguilar, et al., 2020; Mackesy y Goalstone, 2011). VCAM-1, es una glicoproteína de superficie celular que se expresa en niveles bajos en células endoteliales. Sin embargo, su expresión aumenta en presencia de una respuesta inflamatoria (Bui, et al., 2020; Schmitz, et al., 2013). VCAM-1 es un importante regulador de la adhesión de leucocitos y la migración transendotelial a través de la interacción con la integrina VLA-4 o $\alpha 4\beta 1$ (Kong, Kim, Kim, M., Jang y Lee, 2018). La unión a VCAM-1 está regulada por el estado de activación de las integrinas. La

conformación de alta afinidad de las integrinas media la adhesión firme al endotelio que resiste el flujo sanguíneo (Cook-Mills, Marchense y Abdala-Valencia, 2011). En células endoteliales aórticas estimuladas con TNF- α se demostró que VCAM-1 aumenta su expresión desde los 10 minutos (Fong, et al., 2016). Asimismo, se observó mediante microscopía de fluorescencia, que VCAM-1 aumenta su presencia en la membrana endotelial al cabo de 4 horas de estimulación. Al mismo tiempo se observa una translocación desde regiones perinucleares a la superficie celular. Esto además se corroboró mediante citometría de flujo sugiriendo que hay un transporte desde un pool vesicular a la membrana (Mackesy y Goalstone, 2011).

Rol del óxido nítrico en adhesión de leucocitos en respuesta inflamatoria

El óxido nítrico (NO) es una molécula altamente reactiva y difusible capaz de actuar como mensajero fisiológico (López, Aranda y Rodríguez, 2020). El óxido nítrico es producido en el organismo por tres sintetas de óxido nítrico diferentes: endotelial (eNOS), inducible (iNOS) y neuronal (nNOS) (Aguilar, Koning, Ehrenfeld y Sánchez, 2020). La eNOS y nNOS son isoformas constitutivas reguladas por niveles de calcio intracelular y poseen menor capacidad de producir óxido nítrico que la isoforma iNOS. Esta isoforma es independiente de calcio y después de un período prolongado de estimulación, puede producir altos niveles de óxido nítrico estimulada por citoquinas inflamatorias y estrés oxidativo (López, et al., 2020). En el dogma clásico de la señalización de óxido nítrico, la mayoría de sus efectos están regulados por la guanilato ciclasa soluble (sGC) y la proteína quinasa G (PKG). Sin embargo, se han descrito efectos asociados a la S-nitrosilación (SNO) (Marín, et al., 2012), la cual es una modificación post-traduccional inducida por el óxido nítrico en los tioles libres de las cisteínas en proteínas para formar S-nitrosotioles (Aguilar, et al., 2020). Las primeras investigaciones demostraron que en el endotelio sano existe un nivel constitutivo de óxido nítrico producido por eNOS que confiere propiedades anti-adhesivas y anti-inflamatorias en las células endoteliales (Kubes, Suzuki y Granger, 1991; Lefer, et al., 1999) a través de la S-nitrosilación basal de NF κ B bloqueando su activación, favoreciendo un fenotipo anti-adhesivo (Kelleher, et al., 2007). Existe información contradictoria, que demuestra actividad pro-adhesiva regulada por óxido nítrico (Jousen, et al., 2002; Bessa, et al., 2002; Sektioglu, et al., 2016). Una posible explicación es que debido a que el NO posee una vida media corta, factores como la ubicación de la enzima NOS en la célula, la concentración y el tiempo, pueden ser determinantes para que ejerza sus funciones biológicas (Sektioglu, et al., 2016). Por lo que, los mecanismos por los cuales el óxido nítrico modula interacciones entre endotelio y leucocito aún no han sido completamente dilucidados, generando una gran controversia respecto al rol del óxido nítrico en la regulación de la expresión de moléculas de adhesión, mediada por citoquinas inflamatorias (Aguilar, et al., 2020). También, se ha observado que el óxido nítrico participa en la regulación del movimiento de proteínas a la superficie celular a través de S-nitrosilación del factor sensible a la N-etilmaleimida (NSF), inhibiendo el movimiento de vesículas que contienen moléculas de adhesión, favoreciendo propiedades antiadhesivas (Matsushita, et al., 2003; Lowenstein, 2007). En contraste, se ha demostrado que la s-nitrosilación de NSF favorece el aumento del tráfico a la superficie del receptor AMPA en neuronas (Umanah, et al, 2020; Aguilar, et al., 2020). Esto sugiere, que el óxido nítrico puede favorecer el transporte vesicular dependiendo del contexto celular, ya sea mediante la ganancia de la S-nitrosilación. En conjunto, estos antecedentes sugieren que el óxido nítrico inducido por Gal-8 podría favorecer el aumento de VCAM-1 en la superficie mediante un mecanismo independiente de su síntesis.

Rol de Gal-8 en la adhesión de leucocitos en la respuesta inflamatoria

Gal-8 es una lectina que pertenece a la familia de las galectinas que une β -galactósidos presentes en proteínas y lípidos de la superficie celular (Lightfoot, et al., 2021). Estas proteínas se sintetizan en el citosol y se secretan por una vía no convencional al espacio extracelular ya que carecen de un péptido señal requerido para la secreción de proteínas a través de la vía secretora convencional (Lightfoot, et al., 2021; Camby, Mercier, Lefranc y Kiss, 2006). No se ha dilucidado por completo el mecanismo de secreción de las diferentes galectinas, sin embargo, se ha propuesto que algunas de ellas se secretan por exosomas (Johannes, Jacob y Leffler, 2018). Gal-8 es una galectina de tipo "repetición en tándem" que consta de dos dominios de reconocimiento de carbohidratos (CRD) con diferente selectividad de glicanos conectados por un péptido enlazador (Lightfoot, et al., 2021; Oyanadel, et al., 2018). Gal-8 posee una especificidad única entre las galectinas debido a que su dominio N-terminal posee una fuerte afinidad por beta-galactósidos sialilado o sulfatados en posición α -2-3, mientras que su C-terminal tiene mayor afinidad por oligosacáridos ramificados de tipo N-acetil lactosamina (Oyanadel, et al., 2018; Elola, et al., 2014). Gal-8 se expresa ampliamente en diferentes órganos y tejidos (Cattaneo, et al., 2014). Una vez secretada, Gal-8 ejerce su función a través de interacciones dependientes de carbohidratos con receptores de señalización de la superficie celular (Obino, et al., 2018; Sampson, et al., 2016), incluidas las integrinas (Cárcamo, et al., 2006; Pardo, et al., 2019). Las integrinas son una superfamilia de receptores de adhesión celular que se unen a ligandos de la matriz extracelular, superficie celular y solubles (Takada, Ye y Simon, 2007). Se ha descrito que la activación de las células endoteliales induce la expresión de Gal-8 contribuyendo en procesos inflamatorios (Romaniuk, et al., 2010; Thyssen, 2021). Gal-8 modula adhesión celular e induce eventos de señalización (Levy, et al., 2001). Se ha descrito que Gal-8 extracelular aumenta adhesión plaquetaria (Cattaneo, et al., 2014) y de diferentes leucocitos de sangre periférica como eosinófilos, monocitos, células T y B a las células endoteliales (Yamamoto, et al., 2008). Un estudio reciente mostró que en células endoteliales EAhy 926 Gal-8 se une a integrinas β 1 e induce la activación de la quinasa de adhesión focal (FAK) y eNOS, lo que promueve la S-nitrosilación de p120-catenina (p120) y la disociación de las uniones adherentes induciendo la hiperpermeabilidad en las células endoteliales (Zamorano, et al., 2019). Por lo tanto, estos datos están en concordancia que Gal-8 podría además aumentar la adhesión de leucocitos incrementando los niveles de óxido nítrico.

REFERENCIAS

- Aguilar, G., Koning, T., Ehrenfeld, P. y Sánchez, F. Role of NO and S-nitrosylation in the Expression of Endothelial Adhesion Proteins That Regulate Leukocyte and Tumor Cell Adhesion. (2020). *Frontiers in Physiology*, 13. Doi: 10.3389/fphys.2020.595526.
- Aguilar, G., Cordova, F., Koning, T., Sarmineto, J., Boric, M., ..., Sánchez, F. (2021). TNF- α -activated eNOS signaling increases leukocyte adhesion through the S-nitrosylation pathway. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology*, 321(6). Doi: 10.1152/ajpheart.00065.2021.
- Badimon, L. y Martínez -González, J. (2002). Endothelium and vascular protection: an update. *Revista Española de Cardiología*, 55, 17-26. Recuperado de: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15626352/>
- Belin, B., Goins, L. y Mullins, D. (2015). Comparative analysis of tools for live cell imaging of actin network architecture. *Bio Architecture*, 4(6), 189-202. Doi: <https://doi.org/10.1080/19490992.2014.1047714>.
- Bessa, X., Elizalde, I., Mitjans, F., Piñol, V., Miquel, R., Panés, J., Piulats, J., Piqué, J. y Castells, A. (2002). Leukocyte Recruitment in Colon Cancer: Role of Cell Adhesion Molecules, Nitric Oxide, and Transforming Growth Factor β 1. *Gastroenterology*, 122(4), 1122-1132. Doi: 10.1053/gast.2002.32369.
- Bui, T., Wiesolek, H. y Sumagin, R. (2020). ICAM-1: A master regulator of cellular responses in inflammation, injury resolution, and tumorigenesis. *Journal of Leukocyte Biology*, 108(3), 787-799. Doi: 10.1002/JLB.2MR0220-549R.
- Cai, H., Reinisch, K., Ferro-Novick, S. (2007). Coats, Tethers, Rabs, and SNAREs Work Together to Mediate the Intracellular Destination of a Transport Vesicle. *Developmental Cell*, 12(5), 671-682. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2007.04.005>
- Camby, I., Mercier, M., Lefranc, F. y Kiss, R. (2006). Galectin-1: a small protein with major functions. *Glycobiology*, 16(11). Doi: <https://doi.org/10.1093/glycob/cwl025>.
- Cárcamo, C., Pardo, E., Oyanadel, C., Bravo, M., Toro, P., Cáceres, M., ... Soza, A. (2006). Galectin-8 binds specific beta1 integrin and induces polarized spreading highlighted by asymmetric lamellipodia in Jurkat T cells. *Experimental Cell Research*, 12(4), 374-386. Doi: 10.1016/j.yexcr.2005.10.025.
- Cattaneo, V., Tribulatti, M., Carabelli, J., Carestia, A., Schattner, M. y Campéela, O. (2014). Galectin-8 elicits pro-inflammatory activities in the endothelium. *Glycobiology*, 24(10). Doi: <https://doi.org/10.1093/glycob/cwu060>.
- Cook-Mills, J., Marchense, M. y Abdala-Valencia, H. (2011). Vascular Cell Adhesion Molecule-1 Expression and Signaling During Disease: Regulation by Reactive Oxygen Species and Antioxidants. *Antioxidants y Redox Signaling*, 15(6), 1607-1638. Doi: 10.1089/ars.2010.3522.
- Dwivedi, H., Srivastava, A. y Shukla, A. (2020). Reversible biotinylation of purified proteins for measuring protein-protein interactions. *Methods Enzymol*, 281-294. Doi: 10.1016/bs.mie.2019.11.008.
- Elola, M., Ferragut, F., Cárdenas, V., Nugnes, L., Gentilini, L., Laderach, D., ... Rabinovich, G. (2014). Expression, localization and function of galectin-8, a tandem-repeat lectin, in human tumors. *Histology and Histopathology*, 29(9), 1093-1105. Doi: 10.14670/HH-29.1093.
- Favretto, G., Cunha, R., Dalboni, M., De Olivera, R., de Carvalho, F., Massy, Z. y Marques, A. (2019). Endothelial Microparticles in Uremia: Biomarkers and Potential Therapeutic Targets. *Toxins (Basel)*, 11(5), 267. Doi: 10.3390/toxins11050267.

- Fong, L., Theng, C., Cheok, Z., Mohd, M., Hakim, M y Ahmad, Z. (2016). Barrier protective effect of asiatic acid in TNF- α -induced activation of human aortic endothelial cell. *Phytomedicine*, 23(2), 191-199. Doi: 10.1016/j.phymed.2015.11.019
- Friedel, M., André, S., Goldschmidt, H., Gabius, H., Schwartz-Albiez, R. (2016). Galectin-8 enhances adhesion of multiple myeloma cells to vascular endothelium and is an adverse prognostic factor. *Glycobiology*, 26(10), 1048-1058. Doi: 10.1093/glycob/cww066.
- Huang, Y., Heng-Ye, H., Sekine, Y., Han, Y., Juluri, K., Luo, H., ... Snyder, S (2005). S-nitrosylation of N-ethylmaleimide sensitive factor mediates surface expression of AMPA receptors. *Comparative Study*, 46(4), 533-540. Doi: 10.1016/j.neuron.2005.03.028.
- Johannes, L., Jacob, R. y Leffler, H. (2018). Galectins at a glance. *Journal of Cell Science*, 131(9). Doi: 10.1242/jcs.208884.
- Joussen, A., Poulaki, V., Qin, W., Kirchhof, B., Mitsiades, N., Wiegand, S., Rudge, J., Yancopoulos, G. y Adamis, P. (2002). *The American Journal of Pathology*, 160(2), 501-509. Doi: 10.1016/S0002-9440(10)64869-9.
- Kelleher, Z., Matsumoto, A., Stamler, J. y Marshall, H. (2007). NOS2 regulation of NF- κ B by S-nitrosylation of p65. *The Journal of Biological Chemistry*, 282(82). 30667-30672. Doi: 10.1074/jbc.M705929200.
- Kelleher, Z., Sha, S., Foster, M., Foster, M., Forrester, M. y Marshall, H. (2014). Thioredoxin-mediated Desnitrosylation Regulates Cytokine-induced Nuclear Factor κ B (NF- κ B) Activation. *Journal of Biological Chemistry*, 289(5), 3366-3072. Doi: 10.1074/jbc.M113.503938.
- Krautter, F. y Iqbal, A. (2021). Glycans and Glycan-Binding Proteins as Regulators and Potential Targets in Leukocyte Recruitment. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*. Doi: 10.3389/fcell.2021.624082.
- Kruger-Genge, A., Blocki, A., Franke, R. y Jung, F. (2019). Vascular Endothelial Cell Biology: An Update. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(18). Doi: 10.3390/ijms20184411.
- Kong, D., Kim, Y., Kim, M., Jang, J. y Lee, S. (2018). Emerging Roles of Vascular Cell Adhesion Molecule-1 (VCAM-1) in Immunological Disorders and Cancer. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(4). Doi: 10.3390/ijms19041057.
- Kubes, P., Suzuki, M. y Granger, DN. (1991). Nitric oxide: an endogenous modulator of leukocyte adhesion. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 88, 4651-4655. Doi: 10.1073/pnas.88.11.4651.
- Lee, K., Lee, D., Jeoung, D., Lee, H., Choe, J., Ha, K., Won, M., Kwon, Y. y Kim, Y. (2012). Differential effects of substrate-analogue inhibitors on nitric oxide synthase dimerization. *Biochemical and Biophysical research communications*, 418, 49-55. Doi: 10.1016/j.bbrc.2011.12.123
- Lefer, DJ., Jones, SP., Girod, WG., Baines, A., Grisham, MB., Cockrell, AS., Huang, PL. y Scalia, R. (1999). Leukocyte-endothelial cell interactions in nitric oxide synthase-deficient mice. *The American Journal of Physiology*, 276(6), 1943-1950. Doi: 10.1152/ajpheart.1999.276.6.H1943.
- Ley, K., Laudanna, C., Cybulsky, M. y Nourshargh, S. (2007). Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated. *Nature Reviews Immunology*, 7(9), 678-689. Doi: 10.1038/nri2156
- Levy, Y., Arbel-Goren, R., Hadari, YR., Eshhr, S., Ronen, D., Elhanany, E., ... Zick, Y. (2001). Galectin-8 functions as a matricellular modulator of cell adhesion. *The journal of biological chemistry*, 276(33), 1285-1295. Doi: 10.1074/jbc.M100340200.

- Lightfoot, A., McGettrick, H. y Iqbal, A. (2021). Vascular Endothelial Galectins in Leukocyte Trafficking. *Frontiers in Immunology*, 12. Doi: 10.3389/fimmu.2021.687711.
- López-Sánchez, L. M., Aranda, E., & Rodríguez-Ariza, A. (2019). Nitric oxide and tumor metabolic reprogramming. *Biochemical Pharmacology*, 113769. doi: 10.1016/j.bcp.2019.113769
- Lowenstein, C. J., & Tsuda, H. (2006). N-Ethylmaleimide-sensitive factor: a redox sensor in exocytosis. *Biological Chemistry*, 387(10-11). doi:10.1515/bc.2006.173
- Mackesy, D. y Goalstone, M. (2011). Insulin augments tumor necrosis factor- α stimulated expression of vascular cell adhesion molecule-1 in vascular endothelial cells. *Journal of Inflammation*, 8(34). Doi:https://doi.org/10.1186/1476-9255-8-34
- Marín, N., Zamorano, P., Carrasco, P., Mujica, P., González, FG., Quezada, C., ... Sánchez, FA. (2012). S-nitrosylation of β -catenin and p120 catenin: a novel regulatory mechanism in endothelial hyperpermeability. *Circulation Research*, 111(5), 553-563. Doi: 10.1161 / CIRCRESAHA.112.274548.
- Matsushita, K., Morrell, C., Cambien, B., Yang, S., Yamakuchi, M., Bao, C., ... Lowenstein, C. (2003). Nitric Oxide Regulates Exocytosis by S-Nitrosylation of N-ethylmaleimide-Sensitive Factor. *Cell*, 115(2), 139-150.
- Meliton, AY., Muñoz, NM., Lambertino, A., Boetticher, E., Learoyd, J., Zhu, X. y Leff, AR. (2006). Phosphodiesterase 4 inhibition of beta2-integrin adhesion caused by leukotriene B4 and TNF-alpha in human neutrophils. *European Respiratory Journal*, 28(5). 920-928. Doi: 10.1183/09031936.06.00028406.
- Nourshargh, S. y Alon, R. (2014). Leukocyte Migration into Inflamed Tissues. *Immunity*, 41(5), 694-707. Doi: 10.1016/j.immuni.2014.10.008.
- Obino, D., Fetler, L., Soza, A., Malbec, O., Sáez, J., Labarca, M., ... Yuseff, M. (2018). Galectin-8 Favors the Presentation of Surface-Tethered Antigens by Stabilizing the B Cell Immune Synapse. *Cell Reports*, 25(11), 3110-3112. Doi: 10.1016/j.celrep.2018.11.052.
- Oyanadel, C., Holmes, C., Pardo, E., Retamal, C., Shaughnessy, R., Smith, P., ... González, A. (2018). Galectin-8 induces partial epithelial-mesenchymal transition with invasive tumorigenic capabilities involving a FAK/EGFR/proteasome pathway in Madin-Darby canine kidney cells. *Molecular biology of the cell*, 29(5), 557-574. Doi: 10.1091/mbc. E16-05-0301.
- Papayannopoulos, V., Metzler, K., Hakkim, A. y Zychlinsky, A. (2010) Neutrophil elastase and myeloperoxidase regulate the formation of neutrophil extracellular traps. *Journal of Cell Biology*, 191(3), 677-691. Doi: 10.1083/jcb.201006052.
- Pardo, E., Cárcamo, C., Uribe, R., Ciampi, E., Segovia, F., Curkovic, C., ... González, A. (2017). Galectin-8 as an immunosuppression in experimental autoimmune encephalomyelitis and a target of human early prognostic antibodies in multiple sclerosis. *Plos One*, 12(6). Doi: 10.1371/journal.pone.0177472.
- Quián, J. y Fulton, D. (2012). Exogenous, but not Endogenous Nitric Oxide Inhibits Adhesion Molecule Expression in Human Endothelial Cells. *Frontiers in Physiology*. Doi: 10.3389/fphys.2012.00003.
- Randriamboavonjy, V., Schrader, J., Busee, R. y Fleming, I. (2004). Insulin Induces the Release of Vasodilator Compounds from Platelets by a Nitric Oxide-G Kinase-VAMP-3-dependent Pathway. *Journal of Experimental Medicine*, 199(3), 347-356. Doi: 10.1084/jem.20030694.
- Ramos, T., Bullard, D. y Barnés, S. (2014). ICAM-1: Isoforms and Phenotypes. *The Journal of Immunology*, 192(10), 4469-4474. Doi: 10.4049/jimmunol.1400135.
- Rees, DD., Palmer, RM., Schulz, R., Hodson, HF., Mondaca, S. (1990). Characterization of three inhibitors of endothelial nitric oxide synthase in vitro and in vivo, *British*

- Journal of Pharmacology*, 101(3), 746-752. Doi: 10.1111/j.1476-5381.1990.tb14151.x.
- Reitsma, S., Slaaf, D., Vink, H., Zandvoort, M. y Egbrink, M. (2007). The endothelial glycocalyx: composition, functions, and visualization. *Pflugers Archive: European Journal of Physiology*, 454(3), 345-359. Doi: 10.1007/s00424-007-0212-8.
- Romaniuk, M., Tribulatti, M., Cattaneo, V., Laponi, M., Molinas, F., Campetella, O. y Schatter, M. (2010). Human platelets express and are activated by galectin-8. *The Journal Biochemical*, 432(3), 535-547. Doi: <https://doi.org/10.1042/BJ20100538>.
- Sampson, J., Suryawanshim A., Chen, W., Rabinovich, G., Panjawani, N. (2016). Galectin-8 promotes regulatory T-cell differentiation by modulating IL-2 and TGF β signaling. *Immunology and Cell Biology*, 94(2), 213-219. Doi: 10.1038/icb.2015.72.
- Scott, D., Dunn, T., Ballestas, M., Litovsky, S. y Patel, R. (2013). Identification of a high-mannose ICAM-1 glycoform: effects of ICAM-1 hypoglycosylation on monocyte adhesion and outside in signaling. *American Physiological Society Cell Physiology*, 305(2). Doi: 10.1152/ajpcell.00116.2013.
- Sektioglu, I., Carretero, R., Bender, N., Bogdan, C., Garbi, N., Umansky, V., ... Hammerling, G. (2016). Macrophage-derived nitric oxide initiates T-cell diagenesis and tumor rejection. *OncoImmunology*, 5(10). Doi: 10.1080/2162402X.2016.1204506.
- Schaefer, A., Duijn, T., Majolee, J., Burridge, K. y Hordijk, P. (2017). Endothelial CD2AP binds the receptor ICAM-1 to control mechanic signaling, leukocyte adhesion and the route of leukocyte diagenesis in vitro. *The Journal of Immunology*, 198(12), 4823-4836. Doi: 10.4049/jimmunol.1601987.
- Schmitz, B., Vischer, P., Brand, E., Schmidt-Petersen, K., Korb-Pap, A., Guske, K., ... Stefan-Martin, M. (2013). Increased monocyte adhesion by endothelial expression of VCAM-1 missense variation in vitro. *Atherosclerosis*, 230(2), 185-190. Doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2013.07.039.
- Takada, Y., Ye, X. y Simon, S. (2007). The integrin. (2007). *Genome Biology*, 8(5). Doi: 10.1186/gb-2007-8-5-215.
- Thijssen, V. (2021). Galectins in Endothelial Cell Biology and Angiogenesis: The Basics. *Biomolecules*, 11(9). Doi: <https://doi.org/10.3390/biom11091386>.
- Umanah, G., Ghasemi, M., Yin, X., Chang, M., Wna, J., Zhang, J., ... Dawson, V. (2020). AMPA Receptor Surface Expression Is Regulated by S-Nitrosylation of Thorase and Transnitrosylation of NSF. *Cell Reports*, 33(5). Doi: 10.1016/j.celrep.2020.108329.
- Yamamoto, H., Nishi, N., Shoji, H., Itoh, A., Lu, L., Hirashima, M. y Nakamura, T. (2008). Induction of Cell Adhesion by Galectin-8 and its Target Molecules in Jurkat T-Cells. *The Journal of Biochemistry*, 143(3), 311-324. Doi: <https://doi.org/10.1093/jb/mvm223>.
- Yang, H. y Huang, K. (2019). Dissecting the Vesicular Trafficking Function of IFT Subunits. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 7, 352. Doi:10.3389/fcell.2019.00352
- Wang, T., Li, L. y Hong, W. (2017). SNARE proteins in membrane trafficking. *Traffic*, 18(12), 767-775. Doi: <https://doi.org/10.1111/tra.12524>
- Weitz, G. y Chereng, S. (2011). Cell Adhesion Assays. *Methods in Molecular Biology*, 757. Doi: https://doi.org/10.1007/978-1-61779-166-6_2.
- Zamorano, P., Koning, T., Oyanadel, C., Mardones, G., Ehrenfeld, P., Boric, M., ... Sánchez, F. (2019). Galectin-8 induces endothelial hyperpermeability through the eNOS pathway involving S-nitrosylation-mediated adherent's junction

- disassembly. *Carcinogenesis*, 40(2), 313-323. Doi: <https://doi.org/10.1093/carcin/bgz002>.
- Zhang, X., Si, Y., Hua, X., Liu, Y., Ligao, Gao, L., Gui, X., Yu, Q. (2008). [Experimental study of human umbilical cord blood derived stromal cells transfected with recombinant adenoviral vector co-expressing VCAM-1 and GFP]. *Zhongguo Shi Yan Xue Za Zhi*, 16(3), 598-604. Recuperado de: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18549637/>
- Zhao, M. y Brunger, A. (2016). Recent advances in deciphering the structure and molecular mechanism of the AAA+ ATPase N-ethylmaleimide Sensitive Factor (NSF). *Journal of Molecular Biology*, 428, 1912-1926. Doi: 10.1016/j.jmb.2015.10.026.
- Zhao, C., Smith, E. y Whiteheart, S. (2012). REQUIREMENTS FOR THE CATALYTIC CYCLE OF THE N-ETHYLMALEIMIDE-SENSITIVE FACTOR (NSF). *Biochemical el Biophysical Acta*, 1823, 159-171. Doi: 10.1016/j.bbamcr.2011.06.003.
- Zhou, L., Ning, H., Wei, H., Xu, T., Zhao, X., Fu, A., ... Li, S. (2020). A Novel STAT3-Mediated GATA6 Pathway Contributes to tert-Butylhydroquinone- (tBHQ-) Protected TNF α -Activated Vascular Cell Adhesion Molecule 1 (VCAM-1) in Vascular Endothelium. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. Doi: 10.1155/2020/6584059

HIPOTESIS

Considerando en conjunto todos los antecedentes expuestos: que la activación de las células endoteliales inducen la expresión de Gal-8 contribuyendo a los procesos inflamatorios como el aumento en la adhesión de leucocitos; que Gal-8 activa eNOS, aumentando la producción de óxido nítrico, el cual a su vez, favorece la adquisición de propiedades adhesivas en células endoteliales; que la molécula de adhesión VCAM-1 aumenta en la superficie celular producto del incremento del tráfico vesicular; que Gal-8 aumenta la adhesión celular; pero se desconoce el mecanismo molecular por el cual Gal-8 favorece dicho aumento se propone la siguiente hipótesis:

"Galectina-8 promueve la producción de óxido nítrico favoreciendo la adhesión de leucocitos al endotelio mediado por un incremento de VCAM-1 en la superficie celular".

OBJETIVO GENERAL

Analizar si la producción de óxido nítrico inducido por Galectina-8 promueve un incremento en la adhesión de leucocitos al endotelio mediado por un aumento de VCAM-1 en la superficie celular.

OBJETIVOS ESPECIFICOS

- 1.- Determinar si el óxido nítrico inducido por Galectina-8 genera un aumento de la adhesión de leucocitos al endotelio.
- 2.- Determinar si el aumento de VCAM-1 en la superficie celular es dependiente de óxido nítrico.
- 3.- Determinar si la adhesión de leucocitos inducida por Galectina-8 depende del aumento de VCAM-1 en la superficie celular.

METODOLOGÍA

Estrategia experimental:

Objetivo 1: Determinar si el óxido nítrico inducido por Galectina-8 genera un aumento de la adhesión de leucocitos al endotelio.

Racional: Los antecedentes muestran que Gal-8 aumenta la adhesión de leucocitos a células endoteliales (Levy, et al., 2001; Cattaneo, et al., 2014; Yamamoto, et al., 2008) y, además, activa eNOS lo que lleva a un aumento en la producción de óxido nítrico (Zamorano, et al., 2019). Se ha demostrado que óxido nítrico favorece la actividad pro-adhesiva (Sektiglu, et al., 2016). Estos antecedentes sugieren que el aumento de la adhesión de leucocitos depende del aumento de óxido nítrico inducido por Gal-8. Por lo que se evaluará:

- 1.1 El rol del óxido nítrico inducido por Gal-8 en adhesión de leucocitos al endotelio se evaluará mediante un ensayo de adhesión en base a la medición de la actividad de la enzima mieloperoxidasa (MPO). MPO es oxidoreductasa, que se almacena en gránulos azurofílicos de los neutrófilos y en un proceso inflamatorio se libera alcanzando concentraciones de hasta 1nM (Papayannopoulos, Metzler, Hakkim y Zychlinsky, 2010). Se realizará el ensayo en células EAhy 926 silvestres y silenciadas con siRNA específico para eNOS y en células EAhy 926 en presencia o ausencia de L-NMA (Sigma-Aldrich), un inhibidor competitivo de NOS, el cual es un estereoisómero del precursor de óxido nítrico la L-arginina. Para esto las células EAhy 926 serán cultivadas hasta confluencia en placas de 24 pocillos, con baja concentración de suero (2% SFB) durante toda la noche. Posteriormente, las células se tratarán con distintas concentraciones de Gal-8 recombinante (5ug y 10ug) en distintos tiempos (0, 5, 15 y 30min). Para corroborar que el efecto Gal-8 es dependiente de la interacción con β -galactósidos en la superficie celular, se usará lactosa (20Mm) que no penetra en las células y se usa ampliamente para bloquear las interacciones de galectina con moléculas que contienen β -galactósidos. Para el ensayo de adhesión de leucocitos, se aislarán leucocitos polimorfonucleares (PMN) desde sangre periférica de personas sanas mediante una técnica de centrifugación de densidad en gradiente, aislando específicamente neutrófilos. La suspensión de leucocitos PMN aislados se incubarán durante 30min a 37° con las células EAhy 926 tratadas. Se eliminarán los PMN no unidos a través de dos lavados con PBS. Las células unidas se lisarán y se analizará la actividad de MPO (Aguilar, et al., 2021).
- 1.2 Los resultados anteriores se correlacionarán con la producción de óxido nítrico medida por DAF-FM, ampliamente usado para detectar y cuantificar concentración de óxido nítrico mediante fluorescencia. Para esto, células EAhy 926 serán transfectadas con siRNA específico para silenciar eNOS (Zhang, et al., 2006) utilizando Lipofectamine 2000 Transfection Reagent (Invitrogen, 10696153), siguiendo el protocolo recomendado por el fabricante. Se realizará el experimento 96h después de la transfección. Mediante análisis de Western Blot se confirmará agotamiento de eNOS. Estas células se tratarán con distintas concentraciones (5ug y 10ug) de Gal-8 recombinante en distintos tiempos (0, 5, 15 y 30min), para medir los niveles de óxido nítrico producidos por la estimulación con Gal-8 por microscopía de fluorescencia. Se realizará lo mismo en células EAhy 926 tratadas en presencia de L-NMA (Sigma-Aldrich).

Resultado esperado: Esperamos observar que a mayor concentración de galectina-8 recombinante mayor actividad de MPO. En cambio, en presencia de siRNA específico para eNOS y L-NMA no se observa aumento en la actividad de MPO. Además, mientras mayor sea la concentración de galectina-8 recombinante mayor los niveles de óxido nítrico.

Objetivo 2: Determinar si el aumento de VCAM-1 en la superficie celular es dependiente de óxido nítrico.

Racional: Los antecedentes muestran que el óxido nítrico otorga propiedades adhesivas a células endoteliales (Sektioğlu, et al., 2016). Además, se ha visto que el óxido nítrico participa como regulador del movimiento de proteínas hacia la superficie a través de la interacción con una proteína que participa en el tráfico vesicular (Aguilar, et al., 2020). Por lo tanto, para determinar si el aumento de VCAM-1 en la superficie celular depende de los niveles de óxido nítrico: Se evaluará los niveles de VCAM-1 en la superficie en células EAhy 926 silvestres y silenciadas para eNOS o tratadas con inhibidor el L-NMA mediante ensayos de biotilación de proteínas en la superficie celular.

Las células EAhy 926 serán cultivadas hasta confluencia luego, serán cultivadas con baja concentración de suero (2% SFB) durante toda la noche. Posteriormente, las células se tratarán con 10ug de Gal-8 recombinante en distintos tiempos (0, 5, 15 y 30min). Posteriormente se realizará un ensayo de biotilación que nos permite marcar las proteínas que se encuentran en la superficie celular mediante el uso de la sulfo-NSH-Biotina (Thermo Fisher), una vez marcadas las proteínas de superficie celular con biotina, se lisarán las células para obtener extractos proteicos, los cuales se aislarán a través del uso de esferas de estreptavidina agarosa, las cuales poseen alta afinidad por la biotina. Para corroborar que el efecto Gal-8 es dependiente de la interacción con β -galactósidos en la superficie celular, se usará lactosa (20Mm). Se realizará un inmunoblot para detectar la presencia de VCAM-1 en la superficie utilizando el anticuerpo anti-VCAM-1.

Resultado esperado: Se espera observar que galectina-8 recombinante genere un aumento de VCAM-1 en la superficie celular, mientras que en presencia de siRNA específico para eNOS y L-NMA no se observa aumento de VCAM-1 en la superficie.

Objetivo 3: Determinar si la adhesión de leucocitos inducida por Galectina-8 depende del aumento de VCAM-1 en la superficie celular.

Racional: Los antecedentes muestran que VCAM-1 se expresa en niveles bajos en células endoteliales (Bui, et al., 2020; Schmitz, et al., 2013). Sin embargo, se ha observado un aumento de VCAM-1 en la superficie celular en la respuesta inflamatoria producto del aumento del tráfico vesicular (Aguilar, et al., 2020). Un estudio demostró que en presencia de TNF-alfa, VCAM-1 aumenta su translocación desde una región perinuclear hacia la superficie (Mackesy y Goalstone, 2011). Para probar si el incremento de la adhesión de leucocitos inducida por Gal-8 recombinante extracelular depende del aumento de VCAM-1 en la superficie a través de su translocación desde un compartimiento intracelular a la superficie celular se realizarán los siguientes experimentos:

- 3.1 Evaluar si el aumento de VCAM-1-GFP en la superficie depende de la translocación de VCAM-1 desde compartimientos intracelulares a la superficie celular. Se transfectarán las células endoteliales EAhy 926 de manera transciente con un cDNA que codifica para VCAM-GFP utilizando Lipofectamine 2000 Transfection Reagent (Invitrogen, 10696153), siguiendo el protocolo recomendado por el fabricante. Las células EAhy 926-VCAM-GFP cultivadas en placas de cultivo para célula viva (live cell imaging), serán cultivadas con baja concentración suero (2% SFB) durante toda la noche y serán tratadas con 10ug de Gal-8 recombinante a distintos tiempos (0, 5, 15 y 30 min) en presencia o ausencia del inhibidor L-NMA (Sigma-Aldrich). Para el fotoblanqueo de GFP se ajustará el láser de argón multilínea a una potencia de 50mW para un solo pulso de 488nm usando un área de fotoblanqueo de 20 pixeles de diámetro circular situado en la señal VCAM-GFP de la superficie celular utilizando el microscopio confocal espectral Leica SP8 (Zhang, et al., 2008).
- 3.2 Evaluar si el aumento de VCAM-1 en la superficie celular, inducido por Gal-8 aumenta la adhesión de leucocitos. En células EAhy 926 silvestres y transfectadas con siRNA específico para silenciar VCAM-1 de manera transciente utilizando Lipofectamine 2000 Transfection Reagent (Invitrogen, 10696153), siguiendo el protocolo recomendado por el fabricante y en células EAhy 926 en presencia o ausencia de L-NMA (Sigma-Aldrich). Las células EAhy 926 serán cultivadas hasta alcanzar confluencia. Luego serán cultivadas con baja concentración de suero (2% SFB) durante toda la noche. Posteriormente, las células se tratarán con 10ug de Gal-8 recombinante en distintos tiempos (0, 5, 15 y 30min). Para corroborar que el efecto Gal-8 es dependiente de la interacción con β -galactósidos en la superficie celular, se usará lactosa (20Mm). Posteriormente, las células endoteliales serán incubadas con una suspensión de leucocitos PMN aislados de personas sanas durante 30min a 37°. Luego se eliminarán los PMN no unidos a través de dos lavados con PBS. Las células unidas se lisarán y se analizará la actividad de MPO (Aguilar, et al.,2021).

Resultado esperado: Se espera observar un aumento en la actividad de MPO inducido por galectina-8 recombinante en células EAhy926 silvestres. En cambio, en células silenciadas para VCAM-1 no se observa aumento significativo en la actividad MPO.

Materiales y métodos:

Reactivos y anticuerpos: El inhibidor competitivo de NOS, NG-metil-L-arginina (L-NMA) de Sigma-Aldrich facilitado por la Dra. Fabiola Sánchez, Universidad Austral de Chile. Gal-8 recombinante facilitado por la Dra. Andrea Soza, Universidad San Sebastián. Se utilizarán los anticuerpos primarios monoclonal anti-VCAM-1 (Abcam, ab134047) y el anticuerpo monoclonal de carga GADPH (Santa cruz, sc-365062), anticuerpos secundarios conjugados con HRP anti-rabbit o mouse (Thermo Fisher, G-21040).

Cultivo celular: La línea celular que se utilizará en este trabajo es EAhy926 (células endoteliales venosas humanas inmortalizadas). Esta línea será mantenida en un medio DMEM suplementado con Suero Fetal Bovino (SFB) al 10% y HAT 1X (hipoxantina-aminopterin-timidina) a una temperatura de 37°C. Para los tratamientos con Gal-8 las células se dejarán toda la noche con DMEM al 2% SFB (Aguilar, et al., 2021).

Inducción y purificación de GST-Gal-8: Se utilizarán bacterias competentes *E. coli* Top 10 transformadas con el vector pGEX-Gal-8. Las bacterias se crecerán a 37°C, en medio LB con el antibiótico ampicilina (ThermoScientific). Al día siguiente, se realizará una dilución 1 en 100 del inóculo saturado y se cultivarán en medio LB con el antibiótico hasta alcanzar una absorbancia de 0.6 a 600 nm. Posteriormente, el cultivo bacteriano se inducirá con isopropil-1-tio-β-D-galactopiranosido (IPTG, ThermoScientific) (OD: 0.9) y las bacterias serán sedimentadas por centrifugación (rotor Sorvall SS-34). Para la purificación de Gal-8, se prepararán los extractos proteicos a 4°C. Las bacterias se lisarán en PBS frío con lisozima (0,5mg/ml, ThermoScientific) suplementado con inhibidores de proteasas bacterianas (Protease Inhibitor Cocktail(BPI, Merck). El lisado bacteriano será sonicado. El lisado se centrifugará a máxima velocidad (14.000 rpm en centrífuga Eppendorf) y el sobrenadante se incubará con glutation-Sepharose 4B por 2hrs a 4°C. Las esferas de glutation-Sepharose se lavarán con PBS 1x y se les agregará 10U de Trombina (Sigma Aldrich) en PBS 4 hrs a temperatura ambiente. Se centrifugarán las esferas a 500g por 5 minutos a 4°C y el sobrenadante se recolectará y se medirá la concentración de Gal-8 por ensayo Bradford (Sigma Aldrich).

Lisis celular: Las células EAhy926 serán lisadas con Buffer de lisis clásico (Heper 50mM, NaCl 150mM, MgCl₂ 2mM, EDTA 1mM, Tritón X100 1%, suplementado con los inhibidores de proteasa leupeptin (1μL/mL) (Merck, 103476-89-7), PMSF (10μL/mL) (Cell signaling, 8553) y Ortovanadato (10μL/mL) (Sigma Aldrich, 13721-39-6). La cantidad de proteína será calculada utilizando el método de Bradford con el reactivo Bio-Rad Protein Assay Dye Reagent Concentrate (5000006).

Aislamiento de leucocitos polimorfonucleares (PMN): Se realizará en condiciones estériles utilizando una técnica de centrifugación de densidad en gradiente. Se extraerá sangre entera de donantes en citrato de sodio/dextrano (6% p7v; Sigma Aldrich), después de 20 minutos, el plasma se centrifugará y el sedimento celular será colocado cuidadosamente en capas sobre una solución de Percoll al 50% en gradiente (Sigma-Aldrich) para separar los neutrófilos (Aguilar, et al., 2021).

Ensayo de adhesión: En células EAhy926 tratadas con Gal-8 en presencia o ausencia de LNMA, se incubarán con una suspensión de leucocitos con medio DMEM durante 30min a 37°C. Luego se lavarán 3 veces para eliminar leucocitos no unidos y se analizará la actividad de mieloperoxidasa agregando solución salina balanceada de Hanks 3,3',5,5'-tetrametilbencidina y H₂O₂. El producto será medido espectrofotométricamente a 460nm (Aguilar, et al., 2021).

Transfección con lipofectamina: La transfección de células adherentes se realizará utilizando Lipofectamine 2000 Transfection Reagent (Invitrogen, 10696153), siguiendo el protocolo recomendado por el fabricante. Se analizará la expresión del transgén de interés por fluorimetría medidas por FRAP.

Transfección de siRNA de eNOS y VCAM-1: La transfección de células adherentes se realizará utilizando Lipofectamine 2000 Transfection Reagent (Invitrogen, 10696153), siguiendo el protocolo recomendado por el fabricante. Se realizará análisis de Western Blot para confirmar agotamiento eNOS y VCAM-1 (Aguilar, et al, 2021).

Ensayo de biotilación: El ensayo de biotilación se realizará a 4°C. En las células endoteliales control y tratadas con Gal-8 en presencia o ausencia del inhibidor LNMA, se realizarán lavados con PBS con Ca⁺/Mg²⁺ para posteriormente agregar 2,5ul de biotina por 1ml de PBS Ca⁺/Mg²⁺ durante 30 minutos en agitación constante. Se eliminará la solución y se agregará 1ml de cloruro de amonio (NH₄Cl) durante 10 minutos en agitación constante. Luego se lavará 3 veces con PBS Ca⁺/Mg²⁺ con agitación, se elimina la solución y las proteínas marcadas con biotina se aislarán mediante una columna se estreptavidina agarosa. Se detectarán mediante Inmunoblot, se utilizará actina como control de carga y densiométricamente usando el programa ImageJ.

InmunoBlot: Se separarán las muestras de proteínas en un gel de poli(acrilamida) al 10%. Luego las proteínas serán transferidas en semi-seco a una membrana de polifluoruro de vinilideno (PVDF) previamente activada con metanol (Meró) en tampón de transferencia (25mM Tris-HCl, 192 mM glicina y 10% metanol) por 15 minutos. La transferencia se realizará en semi-seco en la cámara Bio-Rad Trans-blot SD (Bio-Rad Laboratories Inc., California, USA) limitando el voltaje a un máximo de 20V. Posteriormente las membranas se lavarán con TS-Tween (0,5%) y bloquean con solución TS-Tween con BSA 5%, durante 1 hora con agitación constante a temperatura ambiente. Después de 3 lavados de 5 minutos con TS-Tween 0,5% se incubarán con el anticuerpo monoclonal de ratón VCAM-1 (1:1000, Abcam), anticuerpo monoclonal de conejo GAPDH (1:5000, Santa cruz) como control de carga. Después de 6 lavados de 5 minutos, las membranas serán incubadas con el anticuerpo secundario anti-ratón para VCAM-1 1:10000 y anti-conejo para GAPDH 1:15000 por 1 hora en agitación constante a temperatura ambiente. Luego de realizar 6 lavados de 5 minutos, las membranas serán reveladas con sustrato de quimioluminiscencia según las instrucciones del proveedor y serán visualizadas utilizando el sistema de detección ECL.

Análisis estadístico: Los experimentos se realizarán con un mínimo de cinco repeticiones (n=5). Los datos se expresan como media ± SD. Se evaluará la significación estadística de las diferencias aparentes utilizando el software GraphPad Prism. Se aceptará la significación a P < 0,05.

PLAN DE TRABAJO

PLAN DE TRABAJO		1° Semestre						2° semestre					
Objetivos		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1. Determinar si el óxido nítrico inducido por Galectina-8 genera un aumento de la adhesión de leucocitos al endotelio.	1.1 Se determinará el rol de eNOS en la adhesión de leucocitos al endotelio inducido por Gal-8 recombinante mediante silenciamiento e inhibición farmacológica.												
	1.2 Se evaluará la producción de óxido nítrico inducido por Gal-8 recombinante mediante una sonda fluorescente (DAF-FM) en células EAhy 926 silvestres y silenciadas para eNOS o tratadas con el inhibidor L-NMA.												
2. Determinar si el aumento de VCAM-1 en la superficie celular es dependiente de óxido nítrico.	2.1 Se evaluará los niveles de VCAM-1 en la superficie en células EAhy 926 silvestres y silenciadas para eNOS o tratadas con inhibidor el L-NMA mediante ensayos de biotilación.												
3. Determinar si la adhesión de leucocitos inducida por Galectina-8 recombinante extracelular depende del aumento de VCAM-1 en la superficie celular.	3.1 Se evaluará los niveles de VCAM-1-GFP en la superficie celular en células endoteliales EAhy 926 en respuesta al tratamiento con Gal-8 recombinante mediante FRAP (fluorescence recovery after photobleaching) y se analizará la adhesión de leucocitos al endotelio.												
	3.2 Se evaluará la adhesión de leucocitos al endotelio inducida por Galectina-8 en células silvestres y silenciadas para VCAM-1 mediante ensayo de adhesión.												

TRABAJO ADELANTADO POR EL(LA) INVESTIGADOR(A) RESPONSABLE

No aplica.

RECURSOS DISPONIBLES

El desarrollo del presente proyecto se realizará en las instalaciones del laboratorio CEBICEM.

Uso general de laboratorio: El laboratorio consta de un sector de oficinas y salas especiales para biología molecular, cámara fría, autoclave, entre otros.

Cultivo celular: Se dispone de cuatro campanas laminares de seguridad biológica, cuatro incubadoras térmicas con CO₂ regulado, microscopio de fase/luz, centrífuga de bajo rango, baño maría y autoclave. Además, una sala independiente para cultivo organotípico.

Microscopía: Se dispone de Microscopio confocal espectral Leica SP8 equipado con láser de estado sólido de 405 nm y láser de gas argón-neón para excitación de 476, 488, 514, 545 y 640 nm. Dos detectores PTM y un híbrido para la adquisición de imágenes a alta velocidad. Controladores y hardware AOBS y FRAP-booster para experimentos FRET (interacción molecular) y FRAP-FLIP (dinámica molecular y de orgánulos).

Equipamiento general: Se dispone de congeladores de -20, -80 y -150 °C, sistemas de electroforesis, agitadores, secadoras de gel, máquinas de hielo, espectrofotómetro, sistema de agarosa y transiluminador UV, electroporador Bio-Rad GenePulser Xcell. Cyclon Phosphoimager. Scanner Molecular Imager FX Bio-Rad (phosphoimager) y Phosphoscreen para la cuantificación de radioisótopos. PCR en tiempo real (Rotor-Gene Q, Qiagen), contador gamma automático (Wizard2, PerkinElmer), FACS (BDFACSVerse), Nanodrop (SynergyHT, BioTeK), espectrofotómetro (BioSpecmini, SHIMADZU), unidad central 4D Nucleofector.

Además, se dispone de computadores y de acceso a internet en todo el laboratorio, escáneres e impresoras.

XI. DETALLE Y JUSTIFICACIÓN DE RECURSOS SOLICITADOS.

Universidad San Sebastián/Facultad de Medicina y Ciencia/ Escuela de Bioquímica/CEBICEM

INSTITUCIÓN PATROCINANTE (Universidad/Facultad/Departamento)

XI.1. DETALLE DE LOS RECURSOS SOLICITADOS

DESGLOSE PRESUPUESTARIO	MONTOS (m\$)		
	Semestre 1	Semestre 2	TOTAL
Investigador(a) Responsable	3.500	3.300	6.800
Becas para tesis y/o memoristas	0	0	0
Personal técnico y/o de apoyo	0	0	0
1. SUBTOTAL PERSONAL	3.500	3.300	7.200
Total Viáticos Nacionales	0	600	600
Total Viáticos Extranjero	0	700	700
Total Pasajes Nacionales	0	140	140
Total Pasajes Extranjero	0	1.300	1.300
1. SUBTOTAL VIAJES DEL PROYECTO		2.740	2.740
Total Viáticos Cooperación	0	0	0
Total Pasajes Cooperación	0	0	0
2. SUBTOTAL VIAJES COOP. INT.	0	0	0
3. GASTOS DE OPERACIÓN	-	-	-
4. BIENES DE CAPITAL	0	0	0
Total Solicitado	3.500	6.040	

*Recuerde que el máximo a solicitar es m\$30.000 (treinta millones de pesos).

XI.2. JUSTIFICACIÓN DE RECURSOS SOLICITADOS:

Justifique los montos solicitados para cada año de ejecución en cada uno de los ítem. No se considerarán solicitudes sin una adecuada justificación. Asegúrese que los montos totales de cada ítem coincidan con los ingresados en la tabla Detalle de los Recursos Solicitados. El máximo a solicitar incluyendo todos los ítems es de \$ 30.000.000

PERSONAL TÉCNICO Y/O DE APOYO:

Describa claramente, si corresponde, las funciones del **personal técnico y/o de apoyo** para los cuales solicita financiamiento. Este debe estar directamente relacionado con el logro de los objetivos del proyecto. Por ejemplo: Laboratoristas, ayudantes de programación, etc. No incluya en este ítem, recursos para la contratación de personal ocasional, ejemplo: traducción de documento.

Personal Técnico y/o de apoyo	Horas de dedicación		Meses de dedicación			Remuneración / Honorarios
	Semana	Mes	Año 1	Año 2	Año 3	
Personal 1	-	-	-	-	-	-
Personal 2	-	-	-	-	-	-

Describa aquí las labores de cada personal técnico y/o de apoyo:

Personal 1 No aplica

Personal 2 No aplica

BECAS PARA TESISTAS/ MEMORISTAS:

Informe las tesis de pre y postgrado que pretende financiar a través del proyecto.

No aplica

VIAJES PARA EL PROYECTO:

Se financian viajes nacionales y/o internacionales solo para actividades directamente relacionadas con la ejecución del proyecto, presentación de sus resultados y difusión a la sociedad. **Todo viaje requiere una clara justificación.** Detalle los destinos tentativos, número de días y montos solicitados para cada viaje. Asegúrese que los montos anuales indicados en esta tabla corresponden a los ingresados en Detalle de los Recursos Solicitados.

VIAJES AL EXTRANJERO DEL PROYECTO:

Solo se aceptarán pasajes en **clase económica**. Para mayor información consulte las **Instrucciones** para postular.

	Montos totales por Año (m\$)		Propósito/Justificación	Nº Días
	Pasajes	Viáticos		
Semestre 1	-	-		-
semestre 2	1.300	800	Presentación de resultados en ICBMB 2022: International Conference on Biochemistry and Molecular Biology	4

VIAJES NACIONALES DEL PROYECTO:

En la justificación de las salidas a terreno, asistencia a reuniones científicas nacionales y viajes dentro del país, incluya el medio de transporte a utilizar. Para mayor información consulte las **Instrucciones** para postular.

	Montos totales por Año (m\$)		Propósito/Justificación	Nº Días
	Pasajes	Viáticos		
semestre 1	-	-		-
semestre 2	140	500	Presentación de resultados en Reunión anual sociedad de Biología Celular de Chile (SBCCH)	4

VIAJES COOPERACIÓN INTERNACIONAL:

Justifique su solicitud de recursos para actividades de cooperación internacional. Indique de qué manera su propuesta se verá fortalecida en el logro de sus objetivos al invitar a un(a) investigador(a) residente en el extranjero. Recuerde que solo se aceptarán pasajes en clase económica. Para mayor información consulte las **Instrucciones** para postular.

Justificación (para cada año)

	Nombre Prof. Visitante (si está definido)	Viáticos			Pasajes	
		Nº Días	Miles \$/ día	Total (miles \$)	Itinerario	Costo (miles \$)
Semestre 1	-	-	-	-	-	-
Semestre 2	-	-	-	-	-	-
TOTAL:					TOTAL:	

Fundamente su solicitud:

No aplica

GASTOS DE OPERACIÓN:

Indique en la siguiente tabla, el costo anual estimado para cada uno de los subítem necesarios para una exitosa ejecución del proyecto. Inserte tantas filas como requiera. **Justifique su solicitud en el espacio provisto.**

Subítem	Total (miles de \$)	
	semestre 1	semestre 2
Artículos de Oficina	110	110
Insumos Computacionales	240	100
Reactivos e Insumos de laboratorio	5000	5210
Adquisición de libros, revistas, suscripciones y membresías	100	100
Inscripciones en congresos	500	500
Compra de servicios	0	0
Contratación de personal auxiliar ocasional y obrero	0	0
Costo publicaciones científicas	0	0
Software y licencias	200	200
Costo de Encuestas	0	0
Costo Focus Group	0	0
Actividad(es) de Difusión a público general	100	100
Otros: Especificar		
TOTAL:	6.250	6.320

Fundamente su solicitud:

Artículos de Oficina: incluye hojas blancas tamaño carta, tintas de impresora, y materiales de oficina, como lápices, clips, corchetes, etc.

Insumos Computacionales: incluye la compra de discos de almacenamiento de datos y pendrives.

Reactivos e Insumos de laboratorio: considera la compra de anticuerpos, reactivos y material de laboratorio, como tubos eppendorf, puntas, pipetas, etc.

Adquisición de libros, revista, suscripciones y membresías: considera la suscripción a revistas de impacto internacional como Nature y Science.

Inscripción en Congresos: considera la inscripción a congresos nacionales e internacionales.

Costo publicaciones científicas: costo de publicación de resultados en revistas en impacto internacional.

Software y licencias: incluye licencias a programas como Illustrator, Photoshop, etc.

Actividad(es) de Difusión a público general: costo operacional en actividades relacionadas a la vinculación con el medio (VcM) de la Universidad San Sebastián.

BIENES DE CAPITAL:

Cada uno de los bienes solicitados requiere una clara justificación con respecto a los objetivos y metodología propuesta. Describa detalladamente las características, componentes y especificaciones técnicas de cada uno de ellos, indicando el nombre del proveedor consultado. El monto solicitado debe incluir los costos de transporte, flete, seguros, IVA y derechos de internación. No incluya en este ítem equipamiento menor no inventariable, incluido elementos informáticos.

Se permite la compra de mobiliario y/o acondicionamiento menor de espacios físicos que correspondan a la naturaleza y ejecución adecuada del proyecto.

Fundamente su solicitud:

No aplica

XII. ANEXOS

- **CARTAS DE CONSENTIMIENTO INFORMADO, PROTOCOLO ANIMAL, CERTIFICADOS DE ÉTICA/BIOÉTICA, BIOSEGURIDAD, PERMISOS Y OTROS**, si corresponde: Si las certificaciones/Autorizaciones se encuentran en proceso, el(la) postulante debe indicar en la sección Objeto de Estudio esta situación.
- **INSTITUTO ANTÁRTICO CHILENO - PROYECTOS EN LA ANTÁRTICA**, si corresponde: El(La) postulante debe adjuntar el “Certificado Cumplimiento Normativa Ambiental” y “Carta de Certificación Logística”.
- **CERTIFICACIÓN DE PUBLICACIONES ACEPTADAS/EN PRENSA**, si corresponde: El(La) postulante debe anexar cartas, correos electrónicos u otros que acrediten por parte de la revista/comité editorial, el estado del manuscrito.
- **COTIZACIONES, FACTURAS PRO FORMA Y OTROS DOCUMENTOS**, El(La) postulante debe anexar manuscritos en proceso de revisión, cotización(es) del(de los) bien(es), insumos y reactivos a adquirir, carta de compromiso de instituciones colaboradoras, entre otros.



Universidad Austral de Chile

Escuela de Tecnología Médica

CONSENTIMIENTO INFORMADO

El presente consentimiento informado se establece con la finalidad de contar con la aceptación formal de los estudiantes para la extracción de muestras de sangre venosa en estudiantes, muestra que será utilizada ÚNICAMENTE con fines académicos, lo que contribuirá a desarrollar el proyecto titulado "Rol de galectina-8 en la adhesión de leucocitos al endotelio dependiente de óxido nítrico".

La venopunción es la técnica por lo cual se perfora una vena por vía transcutánea con una aguja o catéter; el objetivo de este procedimiento es la extracción de sangre para su posterior análisis.

El protocolo de recolección de muestra de sangre se lo realiza en una vena visible o palpable en la región del antebrazo, procediendo a la extracción de la sangre con debidas medidas de asepsia y antisepsia.

En algunas ocasiones se pueden producir algunos riesgos con este procedimiento como son:

- Un ligero sangrado, será necesario esperar a que cese.
- Aparición de un ligero hematoma (acumulación de sangre debajo de la piel), lo que comúnmente se denomina "morado", el mismo que se resolverá sin tratamiento al cabo de algunos días.
- Riesgo leve de infección.
- En casos difíciles de extracción de sangre serán necesarias otras punciones adicionales.
- La cantidad total de sangre que se extraiga estará a criterio de cada docente responsable, el cual guiará la práctica de laboratorio.



Universidad Austral de Chile

Escuela de Tecnología Médica

Yo, _____ Cédula de Identidad _____ he sido informado de manera amplia, precisa, clara y sencilla sobre los riesgos y beneficios de someterme a la toma de muestra de sangre. Por lo anterior declaro que he comprendido las explicaciones, me han sido aclaradas todas mis dudas y estoy satisfecho con la información recibida. Conozco el alcance de los riesgos. Firmo este consentimiento, por mi libre voluntad, sin haber estado sujeto a ningún tipo de presión. AUTORIZO a la persona encargada la toma de la muestra. La Coordinación de Laboratorios NO tendrá NINGUNA responsabilidad sobre este procedimiento.

Dra. Mª Isabel Jaramillo L.
Directora
Escuela Tecnología Médica



Firma del alumno

Cart

Account:

This cart was printed on 27-Jun-2022.

Artículo	Disponibilidad	Cant.	Precios (CLP)
Sulfo-NHS-biotina EZ-Link™  Número de catálogo: 21217 Tamaño de la unidad: 50 mg	-	1	Precio: 218.880 Precio total: 218.880

Resumen del carrito

Precio del producto - 218.880
1 artículo(s)

Envíos/otros ⓘ

Total CLP 218.880
sesión

